

EFEKTIVITAS EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI (*Loligo sp.*) SEBAGAI BAHAN
ANTI VIBRIOSIS TERHADAP DAYA HAMBAT *Vibrio alginolyticus* SECARA
IN VITRO

SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Oleh :
ASMAUL KHUSNAH
NIM. 0810850030



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013

EFEKTIVITAS EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI (*Loligo sp.*) SEBAGAI BAHAN
ANTI VIBRIOSIS TERHADAP DAYA HAMBAT *Vibrio alginolyticus* 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*

Oleh :
ASMAUL KHUSNAH
NIM. 0810850030



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013

SKRIPSI

EFEKTIVITAS EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI (*Loligo sp.*) SEBAGAI BAHAN ANTI VIBRIOSIS TERHADAP DAYA HAMBAT *Vibrio alginolyticus* SECARA IN VITRO

Oleh:
ASMAUL KHUSNAH
NIM. 0810850030

Telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 27 Juni 2013
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Penguji I

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

Dosen Penguji II

Dr.Ir.Anik Martinah H., M.Sc
NIP. 19610310 198701 2 001
Tanggal:

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Mohammad Fadjar, MSc.
NIP. 19621014 198701 1 001
Tanggal:

Dosen Pembimbing II

Ir. Heny Suprastyani, MS
NIP.19620904 198701 2 001
Tanggal:

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
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.

Penelitian ini merupakan payung penelitian yang diketahui oleh Dr. Ir. M.Fadjar, M.Sc dan dibiayai oleh Dirjen Dikti, Kemendikbud melalui DIPA UB no: 0636/023-04.2.16g15/2012, tanggal 9 Desember 2011, dan berdasarkan SK Rektor UB no: 419/SK/2012 tanggal 27 September 2012.

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

Malang, 27 Juni 2013

Mahasiswa

Asmaul Khusnah

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyadari bahwa penulisan ini tidak terlepas dari dukungan moril dan materiil dari semua pihak. Melalui kesempatan ini, dengan kerendahan hati perkenankan penulis menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- Kedua orang tua dan kakak yang selalu memberikan do'a, semangat, dan motivasi.
- Bapak Dr. Ir. Mohammad Fadjar, M.Sc selaku dosen pembimbing 1 dan Ibu Ir. Heny Suprastyani, MS selaku dosen pembimbing 2 yang sudah banyak memberikan saran, bimbingan, arahan dan nasehat yang berguna bagi penulis.
- Teman-teman Bajak Tambak"2008 tercinta yang telah memberikan dukungan dan semangat.
- Teman-teman penelitian Guntur, Ayu, Mas Faisal.
- Mbak Titin yang sudah membantu dalam jalannya penelitian ini.
- Serta teman-teman kos kertosariro no 30, sudah memberikan semangat dan terima kasih banyak.

Malang, 27 Juni 2013

Penulis

RINGKASAN

ASMAUL KHUSNAH. Efektivitas Ekstrak Tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) Sebagai Bahan Anti Vibriosis Terhadap Daya Hambat *Vibrio alginolyticus* Secara in vitro. Di bawah bimbingan Dr. Ir. **MOHAMMAD FADJAR, MSc** dan Ir. **HENY SUPRASTYANI, MS**

Salah satu kendala yang sering dihadapi dalam budidaya ikan adalah serangan penyakit. Serangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan kendala utama dalam budidaya perikanan. *Vibrio alginolyticus* merupakan salah satu penyakit pada ikan yang dibudidayakan maupun ikan yang hidup di perairan bebas. Timbulnya penyakit pada ikan dapat disebabkan oleh infeksi patogen yang dapat berupa bakteri, virus, jamur atau parasit. Penyakit meliputi penyakit infeksi dan bukan infeksi. Penyakit infeksi merupakan masalah utama, meliputi penyakit-penyakit yang disebabkan oleh virus, bakteri, fungi dan parasit.

Pencegahan terhadap serangan bakteri pada umumnya dilakukan dengan pemberian antibiotik dan bahan kimia. Akan tetapi, penggunaan antibiotik ternyata dapat menimbulkan efek samping terhadap ikan yang dipelihara dan dapat mencemari lingkungan perairan yang mengakibatkan kualitas air menjadi turun. Salah satu alternatif yang digunakan untuk mengatasi permasalahan serangan penyakit adalah mengganti penggunaan antibiotik dengan bahan alami seperti hasil laut yang dapat dijadikan sebagai antibakteri.

Cumi-cumi termasuk keluarga *Cephalopoda*, dikenal menghasilkan tinta berpigmen hitam sebagai defensif taktik melawan predator. Dalam kedokteran, Tinta telah dilaporkan menunjukkan nilai positif dalam berbagai terapi. Tinta mentah ekstrak dari berbagai jenis *cephalopoda* telah dipelajari sebagai antimikroba terhadap bakteri biofilm, *Staphylococcus aureus*, klinis Isolat bakteri dan ragi patogen, bersifat pengawet, Aktifitas antioksidan dan anti-retroviral. Tinta juga dipelajari memiliki bioaktif berbagai protein dan memiliki sifat *cytolytic*, fraksi antitumor juga berpotensi antimikroba.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi-cumi dengan dosis yang berbeda sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* secara *in vitro*. Penelitian ini dilaksanakan bulan September - Januari 2013 di Laboratorium Penyakit dan Parasit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Metode penelitian yang dilakukan adalah metode eksperimen, dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan 1 kontrol dengan 3 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah pemanfaatan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan konsentrasi perlakuan K (0 ppm), A (312,5 ppm), B (362,5 ppm), C (412,5 ppm). Parameter utama adalah pengukuran daerah hambatan ekstrak supernatan tinta cumi-cumi terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* pada setiap perlakuan yang terlihat di sekitar kertas cakram serta Parameter penunjang adalah suhu inkubator dan pH media.

Hasil dari penelitian in vitro didapatkan data diameter daerah hambatan diperoleh pada perlakuan perlakuan K (0 ppm) yakni perlakuan kontrol (menggunakan kertas cakram tanpa direndam dengan ekstrak tinta cumi-cumi) hambatan 0 mm, kemudian pada perlakuan A (312,5 ppm) didapatkan hasil rata-rata diameter daerah hambatan sebesar 11 mm; perlakuan B (362,5 ppm) menghasilkan rata-rata diameter daerah hambatan sebesar 11,27 mm; perlakuan C (412,6 ppm) menghasilkan rata-rata diameter daerah hambatan sebesar 12,7 mm. Jadi, pada kontrol dengan perlakuan(A, B, dan C) hasilnya berbeda nyata sedangkan antara tiap perlakuan (A, B, dan C) tidak berbeda nyata sehingga semakin tinggi tingkat konsentrasi antibakteri yang digunakan maka semakin

cepat bakteri akan terbunuh, namun tidak efektif menggunakan konsentrasi yang terlalu tinggi dalam pengobatan.

Ekstrak tinta cumi-cumi terbukti mampu berperan sebagai antibakteri terhadap bakteri *V. alginolyticus*. Pada konsentrasi 312,5 ppm hingga 412,5 ppm bersifat bakteriosid (membunuh bakteri). Hubungan antara konsentrasi ekstrak tinta cumi-cumi dengan diameter daerah hambatan berbentuk linear dengan persamaan garis = $0,016x + 5,980$ dan nilai $R^2 = 0,868$.

Dari hasil penelitian ini dapat disarankan untuk menggunakan ekstrak tinta cumi-cumi dengan dosis terendah sebesar 312,5 ppm untuk menghambat bakteri *V. alginolyticus* secara *in vitro* dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis yang efektif dan aplikasinya dalam usaha budidaya ikan.



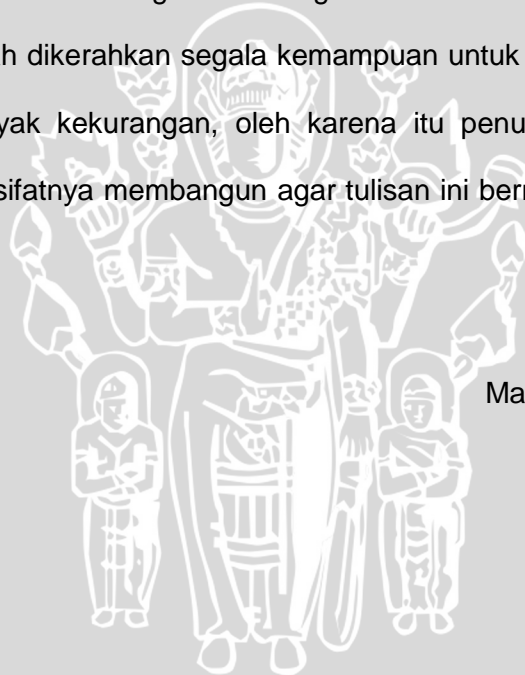
KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyajikan skripsi yang berjudul **“Efektivitas Ekstrak Tinta cumi-cumi (*Loligo Sp.*) Sebagai Bahan Anti Vibriosis Terhadap Daya Hambat *Vibrio Alginolyticus* Secara in vitro.** “. Skripsi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih diteliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang sifatnya membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 27 Juni 2013

Penulis



DAFTAR ISI

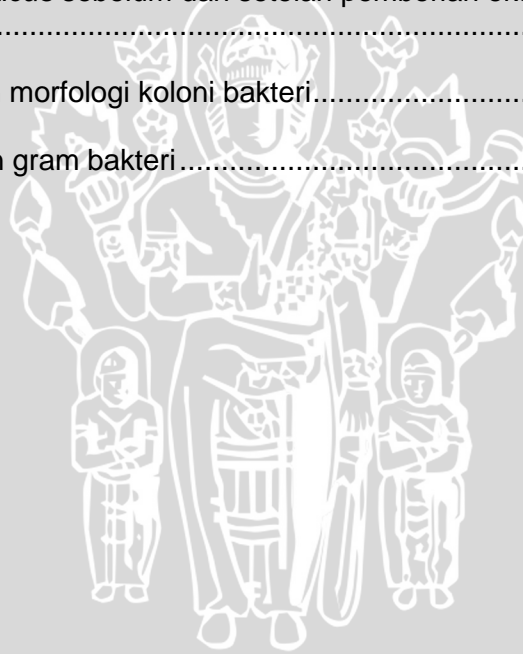
	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	ii
UCAPAN TERIMAKASIH	iii
RINGKASAN	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Kegunaan Penelitian	5
1.5 Hipotesis	5
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Biologi Cumi-Cumi (<i>Loligo sp.</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi dan Biologi	6
2.1.2 Deskripsi Cumi-Cumi	6
2.1.3 Pemanfaatan Cumi-Cumi (<i>Loligo sp.</i>) dan Khasiat sebagai Bahan Obat	8
2.2 Ekstrak Bioaktif	9
2.3 Senyawa Asam Oleat (<i>Oleic Acid</i>)	10
2.4 <i>Vibrio alginolyticus</i>	11
2.4.1 Klasifikasi	11
2.4.2 Morfologi <i>V.alginolyticus</i>	11
2.4.3 Habitat dan Penyebarannya	12
2.4.4 Infeksi dan Tanda-Tanda Penyerangan	13
2.5 Antimikroba	14
2.5.1 Antibiotik	15
2.5.2 Mekanisme Kerja Anti Mikroba	16
2.6 Uji Aktivitas Anti Mikroba In Vitro	17
3. METODOLOGI	19
3.1 Materi Penelitian	19

3.1.1	Alat.....	19
3.1.2	Bahan	20
3.2	Metodologi Penelitian dan Rancangan Penelitian	21
3.2.1	Metode Penelitian	21
3.2.2	Rancangan Percobaan.....	21
3.3	Prosedur Penelitian(Pra Penelitian)	23
3.3.1	Pembuatan Supernatan Tinta Cumi-Cumi.....	23
3.3.2	Sterilisasi Alat dan Bahan	23
3.3.3	Ekstrak Tinta Cumi-Cumi	24
3.4	Penelitian Pendahuluan	25
3.4.1	Pembuatan Media	25
3.4.2	Cara Memperoleh Bakteri 10^7 CFU/ml	27
3.4.2.1	Pembuatan Biakan Bakteri Uji	27
3.4.2.2	Perhitungan Jumlah Bakteri.....	27
3.4.2.3	Mengetahui Pelarut yang Efektif Sebagai Antibakteri	28
3.5	Penelitian Inti	29
3.5.1	Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)	29
3.6	Parameter Uji.....	31
3.6.1	Parameter Utama.....	31
3.6.2	Parameter Penunjang	32
3.7	Analisa Data	32
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1	Pembiakan Kultur Murni <i>V.alginolyticus</i>	34
4.2	Ekstraksi Supernatan Tinta Cumi-Cumi (<i>Loligo sp.</i>).....	35
4.3	Hasil Daya Hambat dengan Uji Cakram	36
4.4	Karakter dan Struktur Bakteri yang Dihambat Ekstrak Tinta Cumi-cumi ..	41
4.6	Lingkungan Hidup Bakteri <i>V.alginolyticus</i>	43
4.6.1	pH	43
4.6.2	Suhu	43
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	44
5.1	Kesimpulan	44
5.2	Saran	44
	DAFTAR PUSTAKA.....	45
	LAMPIRAN.....	49

DAFTAR GAMBAR

Halaman

1. Cumi-Cumi (<i>Loligo sp.</i>).....	7
2. Bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i>	12
3. Pembagian Zona pada Uji Mic Meode cakram.....	18
4. Denah Percobaan.....	23
5. Metode Penanaman Bakteri dengan Spread dan Metode Pengujian Antibiotik Kirby-Bauer	31
6. Grafik Linier Daerah Hambat Pertumbuhan Bakteri <i>V. Alginolyticus</i>	40
7. Bakteri <i>V.algynoliticus</i> sebelum dan setelah pemberian ekstrak tinta cumi.....	42
8. Cara pengamatan morfologi koloni bakteri.....	49
9. Bahan pewarnaan gram bakteri.....	50



DAFTAR TABEL

Halaman

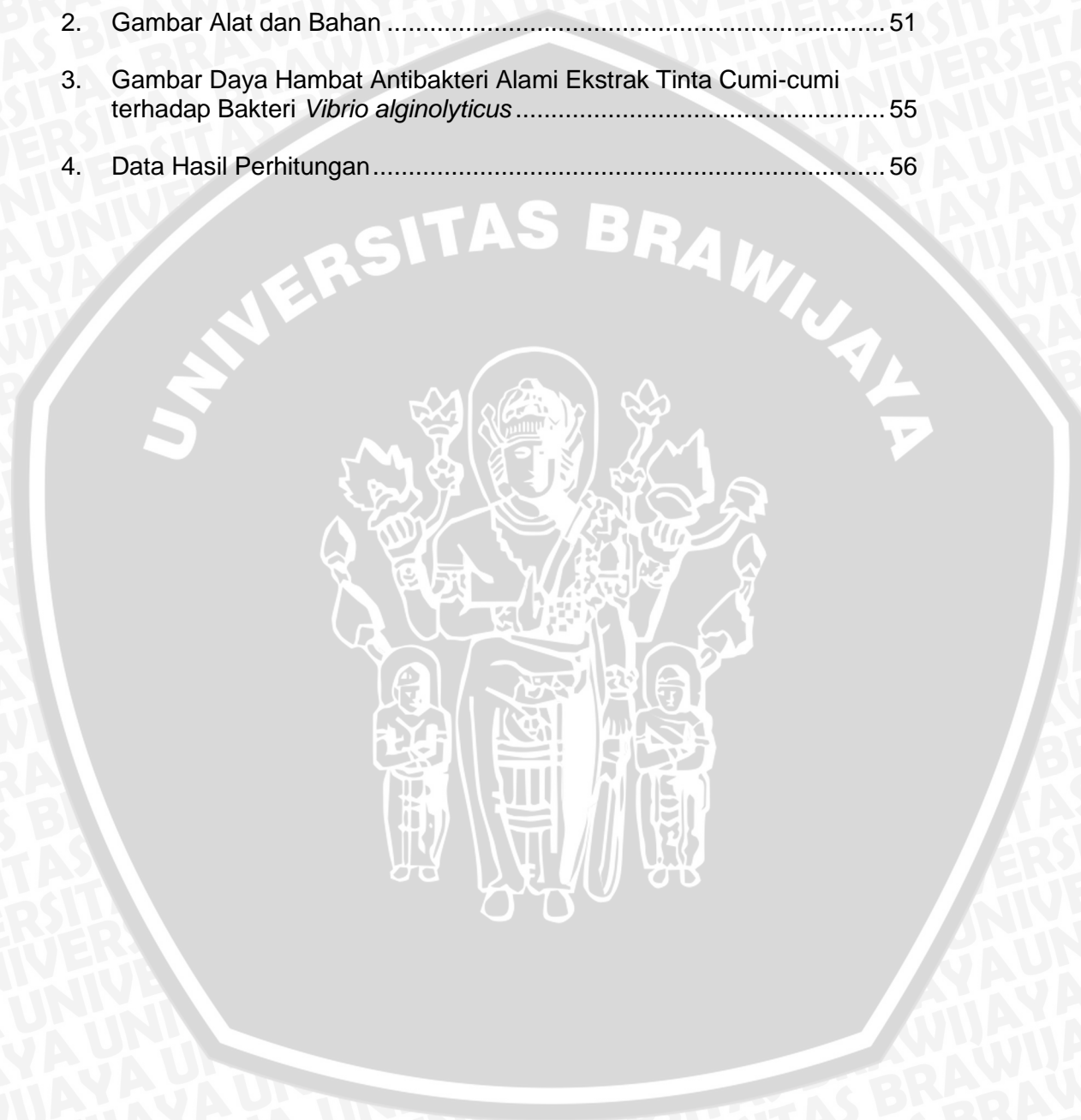
1. Larutan Standart Mc Farland	28
2. Hasil Identifikasi Bakteri dengan Microbact.....	34
3. Data Jumlah Daya Hambat pada Uji Cakram.....	37
4. Klasifikasi Respon Hambatan	38
5. Perhitungan rata-rata dan 95% selang kepercayaan	38
6. Perhitungan Lavene statistic.....	38
7. Perhitungan Hasil Penelitian.....	39
8. Hasil Tukey.....	40



DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

1. Cara Identifikasi Bakteri.....	49
2. Gambar Alat dan Bahan	51
3. Gambar Daya Hambat Antibakteri Alami Ekstrak Tinta Cumi-cumi terhadap Bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i>	55
4. Data Hasil Perhitungan.....	56



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah negara kepulauan terbesar di dunia dengan jumlah pulau kurang lebih 17.000-an pulau besar dan kecil, juga memiliki panjang pantai terpanjang kedua di dunia. Sebagai negara kepulauan yang dikelilingi laut, Indonesia mempunyai sumber daya hayati maupun non-hayati (Kordi, 2004). Sehingga Indonesia berpotensi pada perikananannya.

Perikanan merupakan salah satu sumber devisa negara yang sangat potensial. Pengembangan budidaya air payau di Indonesia untuk waktu yang akan datang sangat penting bagi pembangunan di sektor perikanan serta merupakan salah satu prioritas yang diharapkan menjadi sumber pertumbuhan di sektor perikanan (Badaruszaman, 2012).

Salah satu produk perikanan laut yang merupakan komoditas ekspor unggulan adalah ikan kerapu. Produksi kerapu selama ini didominasi dari hasil tangkapan dan budidaya keramba di laut. Data terakhir pada tahun 2008 produksi ikan kerapu mencapai 267,19 ton. Jenis ikan kerapu yang merupakan komoditas ekspor adalah ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*), kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), dan kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*), napoleon (*Heilinus undulates*) (Sukadi, 2005).

Salah satu species ikan kerapu adalah kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), merupakan harapan budidaya karena mempunyai nilai ekonomis yang tinggi. Kerapu macan banyak diincar eksportir karena paling laris dan harganya mahal, dengan harga berkisar antara US \$ 20–25 per kilogram hidup dan US \$ 5–12 per kilogram mati, dan jumlah ekspor ikan segar sampai tahun 2003 sebesar 48.909.833 kg (Anonymous, 2012).

Permintaan pasar akan komoditas ini stabil bahkan cenderung meningkat dari tahun ke tahun. Dengan demikian pengembangan usaha budidaya ikan kerapu ini mempunyai prospek yang cukup baik. Namun kendala utama dalam budidaya ikan kerapu ini adalah tingkat mortalitas yang tinggi ketika dalam proses pemeliharaan sampai panen. Salah satu penyebab utama kematian yang tinggi pada budidaya ikan kerapu adalah karena serangan penyakit ikan yang dapat menyebabkan kematian secara masal (Prajitno, 2008).

Timbulnya penyakit pada ikan dapat disebabkan oleh infeksi patogen yang dapat berupa bakteri, virus, jamur atau parasit. Penyakit meliputi penyakit infeksi dan bukan infeksi. Penyakit infeksi merupakan masalah utama, meliputi penyakit-penyakit yang disebabkan oleh virus, bakteri, fungi dan parasit (Irianto, 2005). Penyakit didefinisikan sebagai suatu keadaan fisik, morfologi, dan atau fungsi yang mengalami perubahan dari kondisi normal karena beberapa penyebab, dan terbagi atas dua kelompok yaitu penyebab dari dalam (internal) dan luar (eksternal). Penyakit ikan umumnya adalah eksternal. Penyakit internal : genetik, sekresi internal, imunodefisiensi, saraf dan metabolik (Yuasa,dkk., 2003).

Pengendalian penyakit dapat dilakukan dengan penggunaan berbagai jenis antibiotika seperti chloramfenikol, eritromisin dan oksitetrasiklin. Sifat lain yang tidak kalah penting adalah sifat proteolitik yang berkaitan dengan mekanisme infeksi bakteri (Fahri, 2009). Pemakaian antibiotik atau bahan kimia lainnya sebenarnya dapat berdampak negatif bagi lingkungan sekitar maupun ikan itu sendiri, disamping itu harga bahan kimia tersebut terlampaui mahal. Penggunaan dari antibiotik harus tepat sesuai dosis yang dibutuhkan.

Jika penggunaannya tidak tepat maka dapat mengakibatkan muncul dan menyebarnya antimikroba resistensi yang mengancam untuk merusak kemampuan kita untuk mengobati infeksi demi menyelamatkan hasil produk perikanan. Dengan seiring banyaknya ilmuwan maupun peneliti mencari cara

agar tidak tergantung terhadap antibiotik, maka dalam mengobati maupun mencegah penyakit pada produk perikanan yaitu dengan memanfaatkan hasil dari laut salah satunya tinta cumi-cumi yang ternyata mengandung antimikroba yaitu senyawa *Oleic Acid* (asam oleat atau asam lemak tak jenuh). Menurut Setyaningsih (2012), Jenis asam lemak yang bersifat antimikroba adalah jenis asam palmitat dan asam oleat. Lipid membunuh mikroorganisme dengan menembus sel dan mengganggu sintesis asam lemak membran seluler.

Cumi-cumi di bawah keluarga *Cephalopoda*, dikenal menghasilkan tinta berpigmen hitam sebagai defensif taktik melawan predator. Dalam kedokteran, Tinta telah dilaporkan menunjukkan nilai positif dalam berbagai terapi. Tinta mentah ekstrak dari berbagai jenis *cephalopoda* telah dipelajari sebagai antimikroba terhadap bakteri biofilm, *Staphylococcus aureus*, klinis Isolat bakteri dan ragi patogen, bersifat pengawet, Aktifitas antioksidan dan anti-retroviral. Tinta juga dipelajari memiliki bioaktif berbagai protein dan memiliki sifat *cytolytic*, fraksi antitumor juga berpotensi antimikroba (Girija, 2011).

Sedangkan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hiroki University Jepang, tinta cumi-cumi dan sotong mempunyai banyak kegunaan, yaitu dapat mengaktifkan sel darah putih untuk memerangi tumor. Hal tersebut telah diujicobakan pada 15 ekor tikus yang mengidap penyakit tumor ganas. Tikus itu diberikan suntikan tiga dosis cairan tinta sotong, dan hasilnya, hanya tiga tikus yang mati, sisanya tetap hidup (Najib, 2012).

Maka dari itu efektivitas ekstrak tinta cumi-cumi diharapkan dari penelitian ini dapat memberikan kegunaan yang baik terutama bagi dunia perikanan. Penelitian mengenai penggunaan dari tinta *Cephalopoda* untuk jenis *Loligo sp.* masih jarang diteliti. Berdasarkan uraian diatas diperlukan upaya penelitian tentang pengaruh pemberian tinta cumi-cumi sebagai daya hambat bakteri *Vibrio alginolyticus* yang akan diinfeksi pada benih ikan kerapu macan.

1.2 Rumusan Masalah

Bakteri *Vibrio alginolyticus* merupakan bakteri virulen pada budidaya air laut. Bakteri *Vibrio* bersifat patogen oportunistik pada budidaya air payau dan laut karena dapat bertindak sebagai patogen primer dan sekunder. Sebagai patogen primer, bakteri masuk ke dalam tubuh udang melalui kontak langsung. Sedangkan sebagai patogen sekunder, bakteri menginfeksi udang yang telah terserang penyakit lain. (Fiegel, 1992 dalam Prajitno, 2007).

Usaha pengendalian penyakit bakterial pada budidaya ikan kerapu selama ini masih tertumpu pada penggunaan bahan kimia dan obat-obatan antibiotik. Penggunaan obat-obatan atau antibiotik mempunyai beberapa keuntungan bila tepat diagnosis dan dosisnya, mudah didapat dan efeknya lebih cepat teramati, namun demikian, penggunaan obat-obatan atau antibiotik secara terus-menerus akan menimbulkan masalah, yaitu timbulnya resistensi, adanya residu pada tubuh ikan, dan mencemari lingkungan yang akhirnya mematikan organisme bukan sasaran. Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah ini dilakukan dengan memanfaatkan senyawa bioaktif dari tinta yang dihasilkan oleh cumi-cumi sebagai bahan anti vibriosis.

Hal ini diketahui bahwa tinta cumi-cumi adalah multifungsi dari hasil bioaktif laut yang tidak hanya meningkatkan trombosit dan membunuh sel-sel kanker, juga sebagai antioksidan, anti-radiasi, anti-retrovirus dan antibakteri. Dan dalam beberapa tahun terakhir, tinta cumi-cumi ternyata bisa memperbaiki cedera yang disebabkan oleh kemoterapi siklofosamid pada hewan tikus (Liu, et al. 2011).

Dengan adanya pembuatan ekstrak tinta cumi-cumi diharapkan mampu menghambat aktifitas bakteri yang diinginkan. Pemberian konsentrasi yang berbeda diharapkan dapat mengetahui konsentrasi optimal dalam proses

menghambat aktifitas bakteri *V. alginolyticus* yang nantinya akan dilanjutkan dengan mengaplikasikan ke media ikan kerapu macan.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi-cumi dengan dosis yang berbeda sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* secara *in vitro*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terhadap pembaca terutama para pembudidaya ikan kerapu macan yang berguna untuk kemajuan dunia perikanan ramah lingkungan dengan menggunakan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) sebagai bahan anti vibriosis.

1.5 Hipotesis

H_0 : Diduga konsentrasi ekstrak tinta cumi-cumi tidak dapat menghambat aktifitas bakteri *V. alginolyticus*.

H_1 : Diduga konsentrasi ekstrak tinta cumi-cumi dapat menghambat aktifitas bakteri *V. alginolyticus*.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan bulan September - Januari 2013 di Laboratorium Penyakit dan Parasit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Cumi-cumi (*Loligo sp.*)

Cumi-cumi merupakan hasil perikanan yang cukup penting. Cumi-cumi memiliki kandungan gizi yang cukup tinggi dan sangat baik untuk kesehatan. Daging yang putih bersih merupakan salah satu kelebihan tersendiri pada cumi-cumi sehingga cukup disukai masyarakat.

2.1.1 Klasifikasi dan Biologi cumi-cumi

Klasifikasi cumi-cumi adalah sebagai berikut (Kreuzer, 1984 dalam Hakim 2001):

Phylum : Mollusca

Kelas : Cephalopoda

Ordo : Teuthoidea

Sub ordo : Myopsida

Famili : Loliginidae

Genus : *Loligo*

2.1.2 Deskripsi Cumi-cumi

Suku Loliginidae terdiri dari 8 marga, 3 marga diantaranya bernilai ekonomis, yaitu *Loligo*, *Sepioteuthis* dan *Uroteuthis*. Beberapa jenis dari ketiga marga tersebut banyak tersebar dan bernilai ekonomis di perairan Indonesia yaitu *Loligo duvauceli*, *Loligo edulis*, *Loligo singhalensis*, *Sepioteuthis lessoniana* dan *Uroteuthis bartschi* (Roper et al., 1984 dalam Hakim, 2011).

Cumi-cumi merupakan binatang lunak dengan tubuh berbentuk silindris. Sirip-siripnya berbentuk trianguler atau radar yang menjadi satu pada ujungnya. Pada kepalanya di sekitar lubang mulut terdapat 10 tentakel yang dilengkapi dengan alat penghisap (*sucker*). Tubuh terdiri dari isi rongga tubuh (*visceral mass*) dan mantel. Lapisan isi rongga tubuh berbentuk silinder dengan dinding

sebelah dalam tipis dan halus. Mantel yang dimilikinya berukuran tebal, berotot, dan menutupi isi rongga tubuh pada seluruh isi serta mempunyai tepi yang disebut leher (Pelu, 1989 *dalam* Zee, 2011). Untuk gambar cumi-cumi disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Cumi-cumi (*Loligo sp.*)

Pada waktu berenang kaki cumi-cumi berada di depan. Bila mantel mengendur, air akan masuk ke dalam rongga mantel tepi leher dan bila mantel mengerut maka air akan keluar melalui *siphon*. Dengan demikian hewan akan bergerak berlawanan dengan arah semprotan air. Selain itu cumi-cumi mempunyai sifat khas yaitu adanya kantong tinta yang terdapat di atas usus besar dan bermuara di dekat anus. Ketika cumi-cumi diserang musuh, kantong tinta berkontraksi dan mengeluarkan cairan berwarna gelap hitam. Tinta menyebabkan terbentuknya awan hitam di sekitarnya, sehingga cumi-cumi terhindar dari serangan musuh (Hegner dan Engemann, 1968 *dalam* Hakim, 2001).

Menurut Voss (1963) dan Roper *dalam* Asti (2011), daerah penyebaran cumi-cumi adalah di perairan Pasifik Barat, Australia Utara, Pulau Filipina, bagian utara Laut Cina Selatan sampai Jepang. Penyebaran cumi-cumi (*Loligo sp.*) di seluruh perairan Indonesia hampir merata, yaitu dari Barat Sumatera sampai ke selatan Irian Jaya, dari Selat Malaka ke timur sampai ke perairan Timur Sumatera, Laut Jawa, Laut Banda, dan perairan Maluku/ Arafura.

2.1.3 Pemanfaatan Cumi-cumi (*Loligo sp.*) dan khasiat sebagai Bahan Obat

Cumi-cumi merupakan salah satu jenis hewan yang tak bertulang belakang yang sangat digemari oleh masyarakat. Cumi-cumi merupakan komoditas yang bernilai jual cukup tinggi. Ditinjau dari nilai gizi, cumi-cumi memiliki kandungan gizi yang luar biasa karena kandungan proteinnya cukup tinggi, yaitu 17,9 gr/100 gr cumi segar. Daging cumi-cumi memiliki kelebihan dibanding dengan hasil laut lain, yaitu tidak ada tulang belakang, mudah dicerna, memiliki rasa dan aroma yang khas, serta mengandung semua jenis asam amino esensial yang diperlukan oleh tubuh. Asam amino esensial yang dominan adalah leusin, lisin, dan fenilalanin. Sementara kadar asam amino non esensial yang dominan adalah asam glutamate dan asam aspartat (Anggriawan, 2011).

Cairan bewarna gelap pada tinta cumi ini mengandung butir-butir melanin atau figmen hitam. Melamin alami adalah melano protein yang mengandung 10-15% protein. Melanin juga mengikat protein melalui asam amino yang mengandung sulfur yaitu sistein (Kompas, 2011). Tinta cumi-cumi sendiri sudah sangat populer sekali di Jepang, kantong tinta cumi-cumi (*sepio melanin*) yang bewarna hitam dipakai sebagai pengawet dan peningkat cita rasa.

Sedangkan menurut Fardha (2000), kandungan lemak dari cumi-cumi diketahui sebesar 6,7% dan kandungan proteinnya 16,1%, yang ternyata kandungan lemak lebih dari 5% dan protein antara 15-20% tergolong tinggi. Keistimewaan lemak dari cumi-cumi ini terletak pada asam lemak omega-3 yang dikandungnya. Omega-3 diduga dapat mencegah penyakit degeneratif, seperti jantung koroner, diabetes, tekanan darah tinggi, stroke dan kanker.

Cumi-cumi juga mengandung beberapa jenis mineral mikro dan makro dalam jumlah yang sangat tinggi. Kadar mineral yang terkandung pada cumi-cumi sangat bervariasi walaupun dalam satu spesies yang sama. Variasi ini tergantung pada keadaan lingkungan tempat hidup, ukuran, dan umur.

Mineral penting pada cumi-cumi adalah natrium, kalium, fosfor, kalsium, magnesium, dan selenium. Fosfor dan kalsium berguna untuk pertumbuhan kerangka tulang, sehingga penting untuk pertumbuhan anak-anak dan mencegah osteoporosis di masa tua. Selain kaya akan protein, cumi-cumi juga merupakan sumber vitamin yang baik, seperti vitamin B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B12, niasin, asam folat, serta vitamin larut lemak (A, D, E, K) (Natasya, 2011).

2.2 Ekstraksi Bioaktif

Proses ekstraksi adalah proses pengeluaran sesuatu zat dari campuran zat, dengan jalan menambahkan bahan ekstraksi yang tepat pada waktunya. Pemisahan yang diinginkan dapat terjadi karena adanya perbedaan dalam sifat yaitu dapat larutnya antara bagian-bagian campuran dari suatu campuran zat pada bahan pelarut.

Sedangkan menurut Harbone, (1987) dalam Dirjen POM, (1986), Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Zat-zat aktif terdapat di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dengan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya. Dalam proses ekstraksi terjadi peralihan dari fase yang satu ke fase yang lain, yang diperoleh dengan jalan penambahan bahan pelarut yang disebut *solvent* (Rahayu, 2009). Senyawa bioaktif didefinisikan sebagai sesuatu yang bisa meningkatkan keuntungan bagi meningkatkan keuntungan bagi kesehatan manusia seperti menurunkan kadar kolesterol dan menurunkan tekanan darah. Senyawa bioaktif diimplikasikan terhadap pencegahan penyakit (Lang and Bhatt, 2007).

2.3 Senyawa Asam Oleat (*Oleic Acid*)

Asam oleat adalah monounsaturated omega-9 asam lemak yang ditemukan dalam berbagai hewan dan lemak nabati. Ia memiliki rumus $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$. Ini adalah tidak berwarna, tidak berbau minyak, walaupun sampel komersial mungkin kekuningan. Para isomer trans dari asam oleat disebut asam elaidic (maka nama elaidinization untuk reaksi yang switch isomer cis untuk isomer trans). Istilah "oleat" berarti berkaitan dengan atau berasal dari, minyak atau zaitun. Sebagai eksipien di farmasi, asam oleat digunakan sebagai agen pengemulsi atau pelarut dalam produk aerosol (Ensiklopedia, 2010 dalam Anonymous, 2013).

Salah satu kelompok pangan yang kaya dengan asam lemak tak jenuh rantai panjang adalah ikan. Spesies dengan jumlah lemak paling banyak memiliki paling tidak dua pertiga asam lemak tak jenuh. Lemak dari daging ikan mengandung asam lemak jenuh antara 17-21% dan asam lemak tidak jenuh antara 78-83%. Asam lemak jenuh (SAFA=Saturated Fatty Acid) meliputi miristat (C4:0), asam palmitat (C16:0) dan asam stearat (C18:0). Asam lemak tidak jenuh tunggal (MUFA= Mono Unsaturated Fatty Acid) meliputi palmitoleat/ heksadekamonoenoat (C16:1, n-7), asam oleat (C18:1, n-9), asam eiosamonoenoat (C20:1, n-7) dan asam dokosamonoenoat (C22:1, n-9 dan C22:1, n-11). Di antara asam lemak tidak jenuh tunggal (MUFA), asam oleat paling banyak dijumpai di alam. Kandungan asam lemak tak jenuh jamak yang dibutuhkan tubuh untuk mengatasi penyakit arterosklerosis terdapat dalam jumlah yang cukup banyak pada tubuh cumi-cumi (Fardha, 2000).

Asam oleat adalah termasuk asam lemak tidak jenuh, seperti pernyataan Ardiana (2007), asam lemak tak jenuh berantai panjang (misalnya oleat, linoleat, linolenat) merupakan komponen asam-asam lemak omega 3,6 dan 9 yang sangat bermanfaat bagi kesehatan. Asam lemak dapat menghambat

pertumbuhan sel bakteri gram positif *staphylococcus aureus* dan *S. pyogenes*, serta bakteri gram negatif *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Pada tinta cumi ini bersifat larut dengan air, karena tinta cumi mengandung asam lemak tak jenuh yang bersifat polar cenderung larut dalam pelarut polar. Asam lemak yang tidak jenuh lebih mudah larut dibanding asam lemak jenuh dengan panjang rantai yang sama, dengan demikian asam lemak yang derajat ketidajenuhannya lebih tinggi lebih mudah larut.

2.4 *Vibrio Alginolyticus*

2.4.1 Klasifikasi

Klasifikasi bakteri *V. alginolyticus* menurut Pacini (1854) dalam Fahri (2009) adalah sebagai berikut:

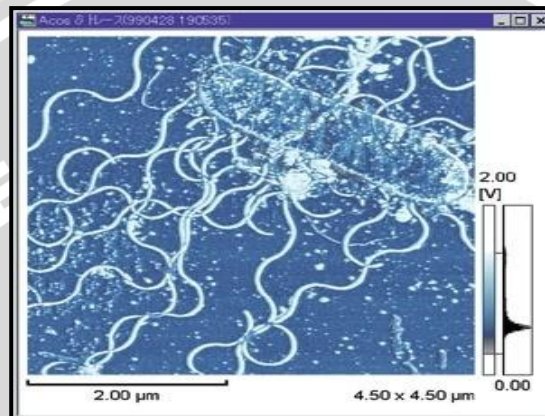
Kindom : Bacteria
Phylum : Proteobacteria
Class : Gamma Proteobacteria
Order : Vibrionales
Family : Vibrionaceae
Genus : *Vibrio*
Species : *Vibrio alginolyticus*



2.4.2 Morfologi *V.alginolyticus*

Vibrio sp. merupakan salah satu bakteri patogen yang tergolong dalam divisi bakteri, klas *Schizo-micetes*, ordo *Eubacteriales*, Famili *Vibrionaceae*. Bakteri ini bersifat gram negatif, fakultatif anaerobik, fermentatif, bentuk sel batang dengan ukuran panjang antara 2-3 μm , menghasilkan katalase dan oksidase dan bergerak dengan satu *flagella* pada ujung sel (Austin, 1988 dalam Feliatra, 1999).

Ada 2 bakteri penting yang diketahui menyerang ikan laut yaitu : *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio sp.* mempunyai sifat gram negatif, sel tunggal berbentuk batang pendek yang bengkok (koma) atau lurus, berukuran panjang (1,4 – 5,0) μm dan lebar (0,3 – 1,3) μm dan mempunyai flagella polar (Tamiang, 2009). Untuk bakteri *V. alginolyticus* disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. *Vibrio alginolyticus*

Bakteri *V. alginolyticus* semula diketahui sebagai *V. parahaemolyticus* biotype II, tetapi dalam Bergey's Manual of Determinative Bacteriology edisi kedelapan tahun 1984 bakteri ini dikenal sebagai *V. alginolyticus* (Maftuch, 2006). Koloni berukuran 0.8-1.2 μm yang berwarna kuning pada media TCBSA. Ciri lain merupakan gram negatif, motil, bentuk batang bengkok. Fermenter glukosa, laktosa, sukrosa dan maltose. Bakteri *V. alginolyticus* memiliki flagelata yang bercabang ke samping dan bergerombol dalam media padat kompleks (Noel *et al*, 1984).

2.4.3 Habitat dan Penyebarannya

V. alginolyticus sangat umum dijumpai di air payau dan laut. Sebagian bersifat saproba namun ada beberapa spesies yang menyebabkan penyakit vibriosis pada hewan akuatik termasuk ikan. Penyakit bakterial utama terutama pada benih yang dapat menimbulkan kematian sampai 100 % dalam waktu 2 minggu (Desrina, 2006). Selain itu *V.alginolyticus* merupakan vibrio halopilik

hidup, dapat diisolasi dari perairan pantai maupun sedimen, hidup pada temperatur antara 17°C dan 35°C. isolate *V.alginolyticus* menunjukkan gram negatif, motile, pleomorphic sebagian besar membentuk *coccus basilus rods*. Tumbuhnya tidak berpigmen, basah (moist) dan bentuk koloni menyebar. Faktor virulensi yang menonjol dari *V.alginolyticus* adalah ekstrasellular (Leon *et al*, 2005 dalam Laminem, 2007). Ciri khasnya bakteri ini tumbuh pada pH yang sangat tinggi 8,5 - 9,5 dan dengan cepat dapat dibunuh oleh asam (Widiyanti, 2009).

Saat ini bakteri *V. alginolyticus* dilaporkan banyak ditemukan pada bahan makanan laut (seafood) di Hongkong dan selalu didapatkan dalam jumlah yang lebih besar daripada bakteri *V. parhaemolyticus* dan *V. vulnificus*. Selanjutnya dikemukakan, bahwa hasil pengamatan populasi bakteri pada kerang-kerangan lebih banyak daripada jenis makanan laut lainnya (Chan *et al.*, 1989).

2.4.4 Infeksi dan Tanda-Tanda Penyerangan

Menurut Martutik (2005), *Vibrio harveyi* dan *Vibrio alginolyticus* merupakan bakteri penyebab penyakit pada udang yang mampu menyerang bagian-bagian tubuh udang baik di luar maupun di dalam tubuh. Menurut Inglis *et al.*, (2003), *V. alginolyticus* juga menyerang ikan-ikan laut ketika stress atau traumatik, yaitu kondisi tersebut di bawah pengawasan budidaya dan dalam dunia liar, bakteri vibrio dimungkinkan dapat menyebabkan infeksi dimana berbentuk bisul fokal hemoragik pada mulut atau permukaan kulit, atau luka nekrosis fokal lain di dalam otot, lingkaran atau sekitar tepi sirip-sirip. Dimana luka adalah sub-epidermis, daerah terlalu hitam yang tampak pada kulit, dan jika hal ini menjadi borok, dangkal, tapi luas, borok hemoragik dengan putih disekelilingnya (kulit kolagen) dan sebuah lingkaran pigmentasi hitam dihasilkan.

Gejala umumnya dimulai dengan kelesuan dan hilangnya selera makan. Penyakit vibriosis juga ditandai dengan kulit menjadi buram (discolored), merah

dan nekrosis (mati), sakit seperti melepuh dapat terlihat pada permukaan tubuh, adakalanya pecah pada permukaan kulit menghasilkan luka terbuka. Bintik-bintik darah (Erythema) umum terjadi di sekitar sirip dan mulut. Ketika penyakit menjadi sistemik, dapat menyebabkan exophthalmia ("pop-eye"), dan saluran usus dan dubur menjadi berdarah dan terisi dengan cairan. semua gejala ini dapat disebabkan oleh penyakit bakterial lainnya, dan bukan hanya oleh Infeksi Vibrio. (Reed and Floyd, 1994 dalam Fahri, 2009).

Umumnya ikan yang diserang vibriosis memperlihatkan gejala-gejala : ikan kehilangan nafsu makan (anorexia), kulit ikan menjadi gelap, insang ikan pucat, sering terjadi pembengkakan pada kulit yang lama-kelamaan akan pecah menjadi luka (bisul) dan mengeluarkan cairan nanah berwarna kuning kemerah-merahan, terjadi pendarahan pada dinding perut dan permukaan jantung, jika dilakukan pembedahan akan terlihat pembengkakan serta kerusakan pada jaringan hati, ginjal dan limpa (Afrianto, 1992).

Tingkat perbedaan tingkat keganasan juga disebabkan karena perbedaan target organ dan kemampuan berkembang ditarget organ. Semakin banyak organ vital yang diserang, semakin tinggi suhu air diatas optimal dan semakin kecil ukuran ikan akan semakin tinggi tingkat kematiannya (Kamiso, 1996).

2.5 Antimikroba

Antimikroba adalah obat-obat yang digunakan untuk memberantas infeksi mikroba pada manusia (Dalimunthe A., 2009). Sedangkan menurut Utami, (2012), Antimikroba adalah obat yang digunakan untuk memberantas infeksi mikroba pada manusia maupun hewan. Secara garis besar antimikroba dibagi menjadi dua jenis yaitu yang membunuh kuman (bakterisid) dan yang hanya menghambat pertumbuhan kuman (bakteriostatik).

2.5.1 Antibiotik

Antibiotik berasal dari bahasa Yunani yang terdiri dari dua kata yaitu “anti” yang berarti melawan, dan “biotikos” yang berarti kemampuan untuk hidup. Antibiotik merupakan agen kemoterapi yang mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme seperti bakteri, jamur, atau protozoa (Serrano, 2005). Antibiotik adalah senyawa kimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang dapat membunuh atau menghambat perkembangan bakteri dan organisme (Dalimunthe A.,2009). Banyak antibiotik yang berasal dari mikroorganisme, beberapa dihasilkan oleh spesies fungi biasa, misalnya *Penisilin*; tetapi kebanyakan diperoleh dari bermacam-macam bakteri yang menyerupai fungi (*mold like*). Sedikit sekali yang dihasilkan oleh bakteri asli, kecuali yang berasal dari spesies *Bacillus* (Irianto, 2002).

Menurut daya kerjanya, antibiotik dapat digolongkan menjadi dua, yaitu antibiotik bakteristatik dan antibiotik bakterisid. Antibiotik bakteristatik bekerjanya menghambat pertumbuhan dan perkembangan bakteri, misalnya menghambat sintesis protein bakteri. Sedangkan antibiotik bakterisid bekerjanya mematikan bakteri, seperti menghambat biosintesis sel bakteri. Daya kerja antibiotik ini juga ditentukan oleh besar kecilnya dosis yang diberikan. Apabila antibiotik bakterisid diberikan dalam dosis rendah, maka itu dapat bersifat bakteristatik. Sebaliknya, antibiotik bakteristatik bisa bersifat bakterisid kalau diberikan pada dosis tinggi (Kordi, 2004). Antibiotik bisa berupa zat kemoterapi dengan sifat-sifat khusus. Antibiotik bersifat selektif dan menghambat ataupun menghancurkan mikroorganisme patogenik (Toxic selektif). Pemilihan antibiotik untuk menghasilkan terapi yang baik tergantung banyak faktor yang saling mempengaruhi terutama antibiotik harus benar-benar efektif terhadap pathogen, dianjurkan dan banyak tersedia di pasaran (Zonneveld, 1991 dalam Laminem, 2007)

Sampai saat ini metode yang banyak digunakan untuk menanggulangi penyakit pada ikan budidaya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik. Cara ini sangat berisiko karena dapat menimbulkan resistansi terhadap bakteri, memerlukan biaya yang cukup mahal, serta dapat mencemari lingkungan. Antibiotik biasanya diberikan melalui makanan, perendaman, atau penyuntikan, sehingga residu antibiotik dapat terakumulasi pada ikan (Mariyono, 2002).

2.5.2 Mekanisme Kerja Anti Mikroba

Reaksi suatu antimikroba dapat bersifat bakterisida atau bakteriostatik. Antibiotik yang bereaksi bakteriostatik menghambat replikasi sel bakteri, sehingga tidak langsung mematikan organisme tersebut. Antibiotik yang bereaksi sebagai bakterisida semua menyebabkan kematian dan lisis sel bakteri (Bintang, 1997). Keefektifan penghambatan merupakan salah satu kriteria pemilihan suatu senyawa antimikroba. Semakin kuat penghambatannya semakin efektif digunakan. Kerusakan yang ditimbulkan komponen antimikroba dapat bersifat mikrosidal (kerusakan tetap) atau mikrostatik (kerusakan sementara yang dapat kembali). Suatu komponen akan bersifat mikrosidal atau mikrostatik tergantung pada konsentrasi dan kultur yang digunakan. Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain: (1) gangguan pada senyawa penyusun dinding sel, (2) peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, (3) menginaktivasi enzim, dan (4) destruksi atau kerusakan fungsi material genetik (Anonymous, 2010).

Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat berupa perusakan dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan

makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Di bidang farmasi, bahan antibakteri dikenal dengan nama antibiotik, yaitu suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. Senyawa antibakteri dapat bekerja sebagai bakteristatik, bakterisidal dan bakterilitik (Pelezar & Chan 1986).

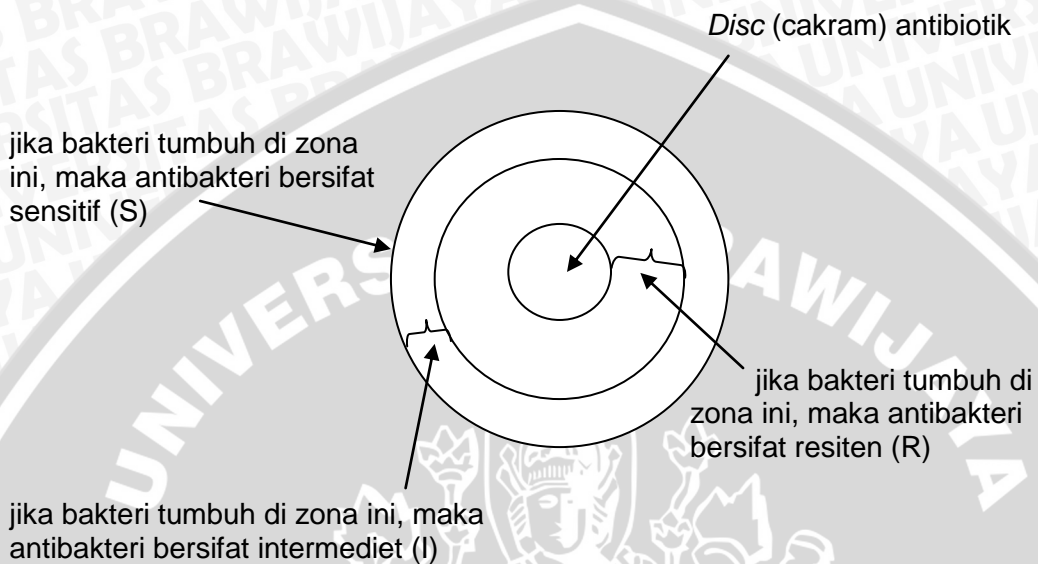
2.6 Uji Aktivitas Anti Mikroba In Vitro (Metode Cakram Agar)

Pada uji antibakteri dapat dilakukan dengan dua metode yaitu metode difusi (metode cakram) dan dilusi. Menurut Kusmiati dan Ni Wayan (2006), Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Cara cakram adalah cara yang paling banyak digunakan untuk menentukan kepekaan kuman terhadap berbagai macam obat-obatan (Bonang dan Koeswardono, 1982). Kertas cakram yang telah direndam larutan ekstrak tinta cumi-cumi dengan konsentrasi berbeda sesuai dengan perlakuan diletakkan diatas lempengan media agar yang telah diberi bakteri *V.alginolyticus*.

Uji cakram pertama kali diperkenalkan oleh William Kirby dan Alfred Bauer pada tahun 1966. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan diatas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme. Adapun cara peletakan kertas cakram yaitu kertas cakram dengan *petridisc* minimal 15 mm dan jika jumlah cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram minimal 24 mm (Lay, 1994).

Lebar daerah hambatan ini tergantung pada konsentrasi obat yang digunakan. Cara cakram ini bisa untuk menggolongkan pengaruh obat antimikroba yaitu *sensitif* (S), *resisten* (R), *intermediate* (I). Saat meletakkan

kertas cakram tidak boleh ada pergeseran sedikitpun dan pengukuran diameter daerah hambatan dalam millimeter (Bonang dan Koeswardono, 1982 dalam Roihanah, 2011). Untuk pembagian zona pada uji MIC metode cakram disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Pembagian Zona Pada Uji MIC Metode Cakram

Metode *disc* dilakukan dengan bulatan kertas saring dengan diameter 5 mm direndam larutan antibakteri dengan konsentrasi yang berbeda (Tuney, et al., 2006). Media agar yang telah ditaburi bakteri secara merata kemudian *disc* dari masing-masing konsentrasi diletakkan di atasnya dengan cara menekan dan diinkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam.

3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Cawan petri
- Tabung reaksi
- Rak tabung reaksi
- Beaker glass
- Erlenmeyer
- Gelas ukur
- Mikro pipet
- Jarum ose
- Pipet volum
- Penjepit
- Pinset
- Bunsen
- Lemari pendingin
- *Hot plate*
- Inkubator
- *Autoclave*
- Sentrifuge
- Timbangan analitik
- Spektrofometer
- *Rotary vacuum evaporator*
- Vortex



- Triangle
- Camera digital
- Sput
- Sprayer
- Jangka sorong
- Colony counter
- Corong

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Tinta Cumi-cumi
- Biakan murni *V. alginolyticus*
- TCBSA (*Thiosulfat Citrate Bilesalt Sucrose Agar*)
- NB (*Nutrient Broth*)
- NA (*Nutrient Agar*)
- Pepton
- Aquades
- Alkohol 70%
- NaCl
- Eppendorf
- Kertas label
- Tissue
- Aluminium foil
- Kapas
- Kertas saring
- Kertas cakram (*paper disc*)
- Cotton swap

- Spiritus
- Benang

3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode eksperimen. suatu metode yang mengadakan kegiatan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal.

Pada dasarnya tujuan daripada eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat serta seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberi perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimen dan menyediakan kontrol perbandingan. Teknik pengumpulan data dilakukan dengan observasi langsung dan pengamatan langsung yaitu cara pengumpulan data dengan menggunakan mata tanpa ada pertolongan alat standar lain (Nazir, 1988).

3.2.2 Rancangan penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu rancangan yang digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen. Menurut Surakhmad (1980), model umum untuk RAL adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}; \quad \begin{array}{l} i = 1, 2, \dots, t \\ j = 1, 2, \dots, t \end{array}$$

Keterangan :

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

μ = nilai tengah umum

T_i = pengaruh perlakuan ke- i

ϵ_{ij} = pengaruh galat dari perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

$l = 1, 2, 3$ (perlakuan)

$j = 1, 2, 3$ (ulangan)

Untuk tahapan penelitian, yaitu : 1) uji MIC dan 2) ujiantang dengan bakteri *V. alginolyticus*. Penelitian ini terdiri dari 3 perlakuan, 3 kali ulangan dan 1 kontrol.

Pada penelitian uji MIC, sebagai perlakuan adalah pemberian supernatan tinta cumi-cumi dengan konsentrasi yang berbeda untuk mengetahui diameter daerah hambat bakteri patogen. Sedangkan pada penelitian selanjutnya adalah dosis hasil terbaik dari penelitian uji MIC dipergunakan sebagai patokan dosis penelitian. Adapun perlakuan tersebut adalah 3 perlakuan dan 1 kontrol masing-masing tiga kali ulangan

- A = konsentrasi 312,5 ppm
- B = konsentrasi 362,5 ppm
- C = konsentrasi 412,5 ppm
- K = kontrol (tanpa perlakuan)

Untuk penentuan dosis 312,5 ppm, yaitu diawali dengan penelitian pendahuluan yaitu :

- 1ml (ependof) setara dengan 1 gr
- 1ml (ependof) setara dengan 1000 mg
- Ppm = mg/L

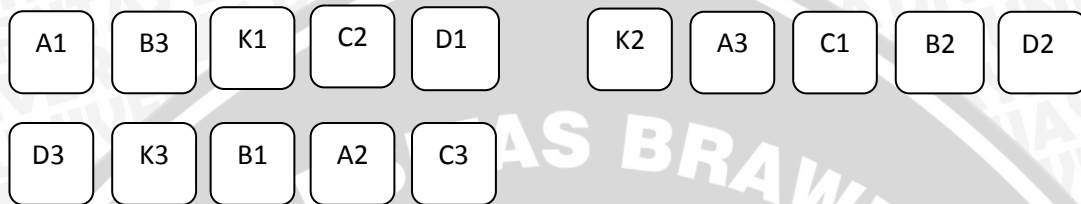
Yang dibutuhkan 20 tabung, dalam tiap tabung berisi 5ml pepton maka membutuhkan 100 ml pepton, jadi

$$\frac{1\text{ml}}{100\text{ml}} = \frac{1000\text{mg}}{0,1\text{L}}$$

$$= 10.000\text{ ppm(dosis awal)}$$

Jadi pada dosis 10.000 ppm membutuhkan 10 ml ekstrak tinta cumi. Selanjutnya dosis tersebut diturunkan karena didapatkan dosis minimum yang bisa menghambat yaitu 412,5 ppm, 362,5 ppm dan 312,5 ppm.

Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah percobaan seperti pada Gambar 4. berikut ini.



Gambar 4. Denah Percobaan

Keterangan:

A, B, C, D, = perlakuan

K = kontrol

1,2,3 = ulangan

3.3 Prosedur Penelitian (pra penelitian)

3.3.1 Pembuatan Supernatan Tinta cumi-cumi

Prosedur pelaksanaannya adalah sebagai berikut :

1. Cumi-cumi disiapkan sebagai bahan uji
2. Cumi-cumi ditimbang terlebih dahulu sebelum diambil kantong tintanya.
3. Pengambilan kantong tinta dari tubuh cumi-cumi, lalu dilakukan penimbangan kantong tinta.
4. Sampel tinta cumi-cumi dipindahkan pada Eppendorf dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit.
5. Sampel tinta yang sudah disentrifugasi disimpan dalam lemari pendingin

3.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Rangkaian proses sterilisasi alat dan bahan sebagai berikut:

1. Alat-alat yang akan disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas koran, kemudian diikat dengan menggunakan benang.

2. Air secukupnya dituang dalam autoclave, kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan dalam autoclave dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara silang.
3. Saklar dinyalakan kemudian tombol sirine yang berwarna merah diputar sampai batas lampu yang berwarna merah.
4. Ditunggu 15 menit, setelah mencapai 121°C sirine akan berbunyi lalu dimatikan.
5. Ditunggu beberapa saat sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0.
6. Saklar listrik dimatikan dan buka tutup autoclave.
7. Alat dan bahan yang sudah disterilisasi diambil dari autoclave. Alat yang telah steril disimpan dalam inkubator, sedangkan bahan yang telah steril disimpan dalam lemari pendingin.

3.3.3 Ekstrak Tinta Cumi-Cumi

A. Uji Kelarutan Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*)

Prosedur pelaksanaannya adalah sebagai berikut :

1. Tabung reaksi dan bahan pelarut aquades disiapkan terlebih dahulu.
2. Sepernatan tinta cumi-cumi (*loligo sp*) disiapkan
3. Masing - masing bahan pelarut diambil dengan menggunakan mikropipet
4. Dicampurkan dengan perbandingan 1:1 (tinta cumi-cumi : Aquadest)
5. Bahan divortek sampai tercampur
6. Dibiarkan selama 3x24 jam
7. Diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator*
8. Diamati

3.4 Penelitian Pendahuluan

3.4.1 Pembuatan Media

Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *Vibrio alginolyticus* yaitu media cair NB (Nutrient Broth) dan media padat TCBSA (*Thiosulfat Citrate Bilesalt Sucrose Agar*), sedangkan untuk NA (*Natrium Agar*) dan Pepton+NaCl untuk uji MIC

A. NA (*Natrium Agar*)

Prosedur pelaksanaannya adalah sebagai berikut :

1. NA dosis pakai 28 gr/L.
2. NA ditimbang 28 gr dan dimasukkan dalam erlenmeyer berisi 1L aquadest.
3. Pada kondisi hangat di atas hotplate, diaduk sampai tercampur rata.
4. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan aluminium foil kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
5. Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.
6. NA dituang pada cawan petri, ditunggu dingin dan dapat langsung digunakan atau disimpan pada lemari pendingin dengan diberi label.
7. Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin. Dipanaskan lagi apabila akan digunakan kembali.

B. NB (*Nutrient Broth*)

Prosedur pelaksanaannya adalah sebagai berikut :

1. NB dosis pakai 1,3 gr/L.
2. NB ditimbang 1,3 gr dan dimasukkan dalam erlenmeyer berisi 1L aquadest.
3. Pada kondisi hangat di atas hotplate, diaduk sampai tercampur rata.

4. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan alumunium foil kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
5. Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.
6. Dituang pada cawan petri, ditunggu dingin dan dapat langsung digunakan atau disimpan pada lemari pendingin dengan diberi label
7. Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin. Dipanaskan lagi apabila akan digunakan kembali.

C. TCBSA (*Thiosulfat Citrate Bilesalt Sucrose Agar*)

Prosedur pelaksanaannya adalah sebagai berikut :

1. TCBSA ditimbang 1,32 gram dan dimasukkan dalam erlenmeyer berisi 150 ml aquadest.
2. Pada kondisi hangat diatas hotplate, diaduk sampai tercampur rata.
3. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan alumunium foil kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.
4. Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ (suam-suam kuku) karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.
5. Dituang pada cawan petri ± 10 ml, ditunggu dingin dan langsung digunakan atau disimpan pada lemari pendingin dengan diberi media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin.
6. Apabila akan digunakan kembali dipanaskan lagi.

D. Pepton

Prosedur pelaksanaannya adalah sebagai berikut :

1. Pepton dosis pakai 19,7 gr/L

2. Pepton ditimbang 1,6 gram dan 1% NaCl lalu dimasukkan dalam erlenmeyer berisi 85 ml aquadest.
3. Pada kondisi hangat diatas hotplate, diaduk sampai tercampur rata.
4. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan alumunium foil kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.
5. Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ (suam-suam kuku) karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.
6. Dituang pada cawan petri ± 10 ml, ditunggu dingin dan langsung digunakan atau disimpan pada lemari pendingin dengan diberi media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin.
7. Apabila akan digunakan kembali dipanaskan lagi.

3.4.2 Cara memperoleh bakteri *V.alginolyticus* 10^7 CFU/ml

3.4.2.1 Pembuatan Biakan Bakteri Uji

1. Biakan bakteri murni disiapkan yang telah dikultur setelah 18-24jam.
2. NB dibuat dan diletakkan pada Erlenmeyer sesuai dengan kebutuhan.
3. Biakan bakteri murni yang telah disiapkan tadi dimasukkan kedalam tabung Erlenmeyer berisi NB dengan bantuan jarum ose yang telah disterilkan.
4. Tabung Erlenmeyer yang sudah berisi bakteri tersebut diinkubasi 18-24 jam suhu 37°C . Untuk cara identifikasi bakteri disajikan pada Lampiran 1.

3.4.2.2 Perhitungan Jumlah Bakteri

Perhitungan jumlah bakteri yang ada pada media Nutrient Broth (NB) dapat dilakukan menggunakan metode Mc Farland dengan cara :

1. 10 tabung reaksi yang bersih disiapkan terlebih dahulu.
2. Membuat larutan H_2SO_4 murni dalam 1%.
3. Membuat larutan BaCl_2 dalam 1%.

4. Kedua jenis larutan tersebut dicampurkan dalam tabung berdasarkan perbandingan yang ada pada tabel. Sehingga isi dari satu tabung tersebut menjadi 10 ml larutan. Kemudian tutuplah tabung-tabung tersebut dengan aluminium foil.
5. Suspense larutan yang terdapat dalam tabung tersebut sama dengan jumlah suspense sel *V.alginolyticus* per ml seperti dalam tabel 1. berikut :

Tabel 1. Larutan Standart Mc Farland

Nomor Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaCl ₂ (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
H ₂ SO ₄ (ml)	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9
Kepadatan sel <i>V.alginolyticus</i> (x 10 ⁸)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Bakteri yang digunakan tersebut dapat dihitung dengan menggunakan rumus perhitungan pengenceran yaitu : $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$

Dimana :

N₁ : Kepadatan populasi dalam media NB (sel/ml)

N₂ : Kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (sel/ml)

V₁ : Volume suspense bakteri dalam NB yang dibutuhkan (ml)

V₂ : Volume yang dikehendaki (ml)

3.4.2.3 Mengetahui Pelarut yang Efektif Sebagai Antibakteri

A. Metode

Uji pendahuluan digunakan untuk mengetahui pelarut yang efektif digunakan sebagai bahan antibakteri dengan menggunakan metode cakram yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi disekitar kertas cakram yang sudah diberi ekstrak tinta cumi-cumi.

B. Uji Cakram

Adapun tahapan-tahapan dalam pelaksanaan uji cakram :

1. Cawan petri yang steril disiapkan terlebih dahulu.

2. Media TCBSA dituang diatas permukaan cawan petri sampai merata
3. Media yang telah disiapkan ditunggu hingga dingin.
4. Kapas lidi (Cotton swab) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji (*Vibrio alginolyticus*) sebanyak 10^7 sel/ml, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung agar cairan tinta menetas dari bagian kapas tersebut.
5. Bakteri disebar pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan, untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar kemudian diputar lempeng agar 80° dan dibuat olesan kedua dengan lempeng agar diputar 45° dan dibuat olesan ketiga.
6. Lempeng agar dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit, kemudian tempatkan kertas cakram steril yang sebelumnya direndam ke dalam ekstrak tinta cumi-cumi selama 15-30 menit pada permukaan lempeng agar dan ditekan agar ekstrak tinta cumi meresap pada media agar dengan baik.
7. Setelah diinkubasi pada suhu ruang (37°C) selama 18-24 jam dibaca hasilnya dengan mengukur daerah hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram.
8. Diameter zona hambat diukur dengan menggunakan jangka sorong.

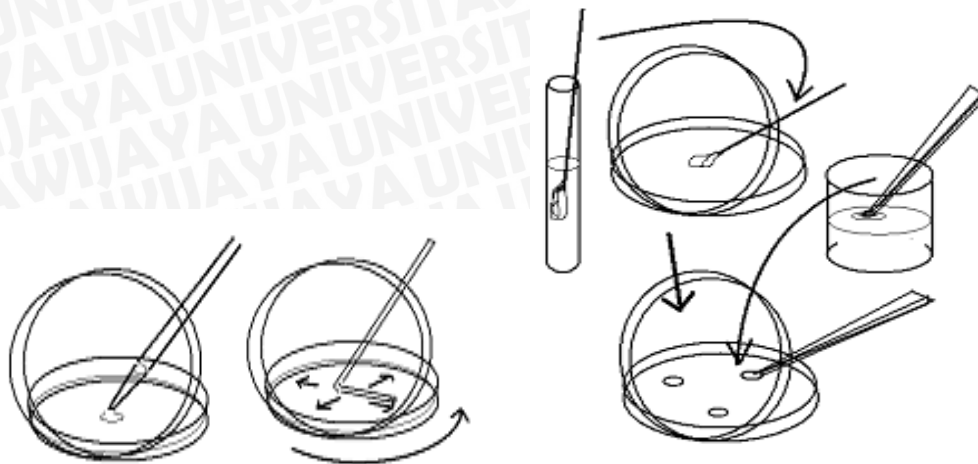
3.5 Penelitian Inti

3.5.1 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Salah satu cara untuk pengujian antimikroba agar dapat diperoleh konsentrasi terendah dilakukan dengan uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Uji MIC adalah konsentrasi terkecil obat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara makroskopik (Edberg, 1983), adapun prosedur pelaksanaannya adalah sebagai berikut :

Setelah didapatkan dosis yang sesuai dilanjutkan dengan mengetahui daya hambat ekstrak tinta cumi-cumi. Adapun tahapan-tahapan dalam pelaksanaan uji cakram :

1. Cawan petri yang telah terdapat media TCBSA disiapkan terlebih dahulu.
2. Kertas cakram steril direndam ke dalam sepernatan tinta cumi-cumi dengan konsentrasi yang sudah didapatkan menghambat bakteri, dibiarkan selama 15-30 menit.
3. Bakteri *V.alginolyticus* diambil 100 μ L (10^7 sel/ml) dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media agar dengan ketebalan \pm 6 mm.
4. Bakteri disebar pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan, untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar kemudian diputar lempeng agar 80° dan dibuat olesan kedua dengan lempeng agar diputar 45° dan dibuat olesan ketiga. Untuk lebih jelasnya metode penanaman bakteri dapat dilihat pada Gambar 5.
5. Setelah 15-30 menit kertas cakram yang telah mengandung ekstrak tinta cumi-cumi diletakkan pada media agar dan ditekan agar ekstrak tinta cumi meresap pada media agar dengan baik.
6. Setelah diinkubasi pada suhu ruang (37°C) selama 18-24 jam, dibaca hasilnya dengan mengukur daerah hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram.
7. Diameter zona hambat diukur dengan menggunakan jangka sorong. Untuk mengetahui sifat dari setiap konsentrasi yang dilakukan, maka setelah pengukuran diameter zona hambat dilakukan inkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 35°C. Apabila pada daerah bening terlihat adanya pertumbuhan bakteri, ini berarti dosis tersebut bersifat bakteristatis; tetapi apabila sebaliknya, berarti dosis tersebut bersifat bakteriosidal.



Gambar 5. Metode penanaman bakteri dengan spread dan metode pengujian antibiotik Kirby- Bauer

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

- Jarak kertas cakram dengan tepi petridisk tidak boleh kurang dari 15 mm.
- Jika jumlah kertas cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram tidak boleh kurang dari 24 mm.
- Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh sedikitpun bergeser, karena mengurangi validasi pengukuran.
- Pengukuran berdasarkan diameter daerah hambatan dalam millimeter.

3.6 Parameter Uji

3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama menggunakan parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari hasil pengukuran daerah hambatan ekstrak tinta cumi-cumi terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* pada setiap perlakuan yang terlihat di sekitar kertas cakram. Daerah bening disekitar cakram sebagai petunjuk bahwa ekstrak supernatant tinta cumi-cumi bekerja menghambat bakteri akan diukur dengan menggunakan jangka sorong dengan ketelitian pengukuran 0,1mm.

3.6.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang pada penelitian ini adalah suhu inkubator dan pH media, yang keduanya merupakan faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri. pH media diukur menggunakan kertas pH dan suhu inkubator dapat dilihat dan diatur pada panel-panel inkubator elektrik.

3.7 Analisis Data

Analisis data daya hambat dilakukan secara statistik mempergunakan program SPSS 16 *for windows*. Data yang didapatkan terlebih dahulu di uji kenormalannya menggunakan uji normalitas (*kolmogorov-smirnov*). Data yang tidak normal perlu dilakukan transformasi. Apabila $\text{sig} > 0,01$ maka dilanjutkan analisis keragaman menggunakan ANOVA sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data hasil penelitian diharapkan rataannya berbeda antar perlakuan (meningkat atau menurun) sedangkan standar deviasinya diharapkan tidak begitu berbeda antar perlakuan (homogen). Analisis Ragam dilakukan untuk menguji pengaruh dosis ekstrak Tinta cumi-cumi terhadap parameter uji, apakah ada pengaruhnya atau tidak terhadap parameter uji. Sedangkan uji setelah analisis ragam diperlukan untuk mengetahui apa ada perbedaan *mean* (rata-rata) parameter uji antara perlakuan dosis ekstrak, yaitu dengan Uji Tukey atau BNT (Beda Nyata Terkecil). Analisis Regresi dilakukan untuk mencari bentuk hubungan antara dosis ekstrak tinta cumi (X) dengan parameter uji (daya hambat) (Y). Perlakuan dosis ekstrak bersifat kuantitatif dengan 4 macam dosis, jadi perlu dilakukan Analisis Regresi dengan derajat polinom maksimum $4-1=3$, dengan praduga Persamaan Garis Regresi kurva linier $Y = c + b_1x$, kurva kudratik $Y = c + b_1x + b_2x^2$ dan kurva kubik $Y = c + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembiakan Kultur Murni *V.alginolyticus*

Bakteri *V.alginolyticus* diremajakan dan diperbanyak dengan metode *streak* (gores) pada media NA di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya. Peremajaan *V.alginolyticus* ditumbuhkan pada agar miring dengan suhu 27-30°C selama 24-48 jam. Tujuan dari metode gores pada NA adalah untuk memperoleh biakan murni dari bakteri. Hal ini sesuai dengan pernyataan Irianto (2006), tujuan penggoresan yaitu untuk membuat garis sebanyak mungkin pada permukaan lempeng medium pembiakan dengan ose atau jarum bahan pemeriksaan yang terlepas pada garis-garis tersebut semakin lama semakin sedikit, sehingga pada garis-garis terakhir koloni-koloni bakteri yang terbentuk akan terpisah agak jauh.

Dengan menumbuhkan bakteri pada media agar (padat) maka akan tampak atau tumbuh beberapa bakteri. Jika terjadi kontaminasi pada media tersebut, maka dapat dipilih atau diambil bakteri yang selanjutnya dapat ditumbuhkan kembali pada media padat (TCBSA atau NA 2%) dan pada media cair NB. Menurut Dwiastuti (2001) dalam Sumargono (2004), menjelaskan bahwa TCBSA merupakan agar pepton dasar dengan perasan ragi, garam empedu, sitrat, sukrosa, ferrisitrat dan sodium thiosulfat. Bahan-bahan yang digunakan pada medium TCBSA ini mempunyai fungsi masing-masing seperti medium selektif lainnya, antara lain sebagai sumber karbon dan nitrat yang diperlukan untuk metabolisme kuman. Karbohidrat berupa sukrosa sebagai sumber energi. Bahan yang memperkaya adalah perasan ragi (untuk pertumbuhan). Sebagai inhibitor adalah garam empedu dan sodium sitrat yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan kuman yang tidak diharapkan. Biru timol brom sebagai indikator pH untuk mengukur perubahan pH pada media yang dihasilkan

metabolisme kuman serta sebagai indikator pada proses fermentasi sukrosa. Indikator tercampur ion ferri untuk mendeteksi produksi H₂S serta bahan kimia dari campuran berbagai jenis, contohnya sodium thiosulfat untuk menyediakan sumber sulfur.

Berdasarkan hasil selama penelitian yang sudah dilakukan, bakteri *V.alginolyticus* tumbuh pada media TCBSA dengan ciri-ciri membentuk koloni, berwarna kuning dan bergerombol pada media padat. Hal ini sesuai dengan pendapat Noel *et al* (1984), Koloni berukuran 0.8 -1.2 μm yang berwarna kuning pada media TCBSA. Ciri lain merupakan gram negatif, motil, bentuk batang bengkok. Fermenter glukosa, laktosa, sukrosa dan maltose. Bakteri *V.alginolyticus* memiliki flagelata yang bercabang ke samping dan bergerombol dalam media padat kompleks.

Sedangkan kepadatan bakteri uji yaitu digunakan 10^7 sel/ml, sesuai pernyataan Agustiyani *et al*, (2004) dalam Puspita (2011), starter bakteri yang digunakan untuk pengujian selanjutnya ialah yang telah mencapai pertumbuhan eksponensial dengan kepadatan sel $10^7 - 10^8$ sel/ml.

Hasil dari identifikasi melalui Microbact™ *identification package* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Identifikasi Bakteri dengan Microbact

No.	Test	Bacteria
		<i>V.alginolyticus</i>
1.	Oxidase	+
2.	Motility	+
3.	Nitrate	+
4.	Lysine	+
5.	Ornithine	-
6.	H ₂ S	+
7.	Glucose	+

8.	Mannitol	+
9.	Xylose	+
10.	ONPG	+
11.	Indole	-
12.	Urease	+
13.	V-P	-
14.	Citrate	-
15.	TDA	-
16.	Gelatin	-
17.	Malonate	-
18.	Inositol	-
19.	Sorbitol	-
20.	Rhamnose	-
21.	Sucrose	+
22.	Lactose	+
23.	Arabinose	-
24.	Adonitol	-
25.	Raffinose	-
26.	Salicin	-
27.	Arginine	-

4.2 Ekstraksi Supernatan Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*)

Pada penelitian ini tinta cumi-cumi disentrifugasi terlebih dahulu dengan kecepatan 15000 rpm selama 15 menit. Kemudian dilanjutkan ekstraksi tinta cumi-cumi menggunakan pelarut Aquades dengan perbandingan 1:1. Mekanisme kerja yang dilakukan dalam mengekstrak tinta cumi-cumi yaitu mencampurkan tinta cumi yang sudah disentrifugasi dengan pelarut yang akan digunakan. Bahan yang digunakan sebagai pelarut untuk mengekstrak tinta cumi adalah *Aquades*.

Kandungan bioaktif yang terdapat pada tinta cumi ternyata mudah larut pada Aquades atau pelarut polar. Menurut Ardiana (2007), asam lemak yang bersifat polar cenderung larut dalam pelarut polar dan asam lemak non polar larut dalam pelarut non polar. Dan pada ekstrak tinta cumi ini terbukti bersifat polar karena larut pada Aquades.

Asam lemak ternyata terbukti dapat bersifat antibakteri. Mekanisme kerja zat antibakteri meliputi: antibakteri yang menghambat dan mengganggu metabolisme sel bakteri, menghambat sintesis dinding sel bakteri, mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, menghambat sintesis protein sel bakteri dan menghambat atau merusak sintesis nukleat sel bakteri (Amir dkk, 1995 dalam Kusdarwati, 2010).

4.3 Hasil Daya Hambat Bakteri dengan Uji Cakram

Uji daya hambat dengan metode disc atau cakram dengan menggunakan lempengan agar yang disemai dengan mikroorganisme pengujian. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan di atas lempengan agar/petridish yang telah disemai dengan mikroorganisme pengujian. Penghambat pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme seperti yang diperkenalkan oleh (William Kirby dan Alfred Batier, 1966; Lay, 1994).

Lebar zona hambatan yang dibentuk ekstrak tinta cumi-cumi tergantung pada daya serapnya ke dalam agar dan kepekaan kuman terhadap antibakteri tersebut. Cara cakram ini menghasilkan kategori sensitivitas terhadap antimikroba berdasarkan difusi antimikroba dari kertas cakram ke dalam agar yang dikemukakan oleh Bonang dan Koeswardono, (1992) dalam Laminem, (2007). Hasil data rata-rata jumlah daya hambat pada uji cakram disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Data Jumlah Daya Hambat Pada Uji Cakram

perlakuan	U 1	U 2	U 3	Total	Rata2	ST DEV
A(312,5 ppm)	12	11	10	33	11	1,00
B(362,5 ppm)	11,8	11,7	11,8	33,8	11,27	1,10
C(412,5 ppm)	11,3	14,7	12,1	38,1	12,7	1,78
K	6,0	6,0	6,0	18	6,00	0,00
Total				122,9		

Pada hasil data rata-rata jumlah daya hambat pada uji cakram dapat dilihat pada dosis dengan konsentrasi 312,5 ppm dengan rata-rata 11; pada konsentrasi 362,5 ppm didapatkan nilai rata-rata 11,27; konsentrasi 412,5 ppm rata-rata diameter hambat 12,7; dan yang terakhir untuk kontrol rata-rata diameter hambat 6,00. Hasil pengamatan juga menunjukkan bahwa ekstrak tinta cumi-cumi dengan metode cakram bersifat bakteristatik. Hal ini dikarenakan daerah hambatan sudah ditumbuhi bakteri setelah dilakukan inkubasi lanjutan selama 48 jam. Menurut Lay (1994), bahan kimia yang mematikan disebut bakteriosidal. Bahan kimia yang menghambat pertumbuhan bakteri disebut bakteristatik. Bahan antimikrobal dapat bersifat bakteristatik pada konsentrasi rendah, namun bersifat bakteriosidal pada konsentrasi tinggi.

Dilihat dari data hasil penelitian yang diperoleh, dosis yang tertinggi yaitu 412,5 ppm dengan rata-rata daya hambat 12,7 mm ternyata dapat menghambat pertumbuhan *V.alginolyticus*. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa dosis yang berbeda memberikan daya hambat yang lebih besar jika dibandingkan dengan kontrol (0%). Sebaliknya semakin tinggi konsentrasi ekstrak tinta cumi yang diberikan maka daya hambat yang terbentuk semakin lebar. Hal ini disebabkan semakin tinggi konsentrasi dari perlakuan maka jumlah senyawa antibakterinya semakin banyak, seperti yang dikemukakan oleh Jawetz *et al.*, (1984), menjelaskan bahwa semakin tinggi konsentrasi antibakteri yang digunakan, maka kemampuan untuk membunuh bakteri semakin cepat.

Dalam penelitian ini dari hasil data yang didapatkan, bahwa ekstrak tinta cumi dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan respon hambatan pertumbuhan lemah. Hal ini bisa dilihat dari Tabel 4.

Tabel 4. Klasifikasi Respon Hambatan (Greenwod, (1995) dalam Riniwati (2012)

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

Pengaruh ekstrak tinta cumi-cumi pada dosis yang berbeda terhadap aktifitas bakteri *V.alginolyticus* dapat diketahui dengan melakukan analisa one way ANOVA. Hasil analisa one way ANOVA dapat dilihat pada Tabel. 5, 6, 7 di bawah ini. Tabel 6. Hasil Perhitungan metode ANOVA one way pada Pengaruh Ekstrak tinta cumi pada Dosis yang Berbeda Terhadap Aktifitas *V.alginolyticus*

Tabel 5. Perhitungan rata-rata dan 95% selang kepercayaan

	N	Rata-rata	Standar deviasi	Standar error	Batas terendah	Batas tertinggi	Minimal	Maximal
312,5	3	11,0000	1,00000	,57735	8,5159	13,4841	10,00	12,00
362,5	3	11,7667	,05774	,03333	11,6232	11,9101	10,70	11,80
412,5	3	12,7000	1,77764	1,02632	8,2841	17,1159	11,30	14,70
Total	9	11,8222	1,25875	,41958	10,8547	12,7898	10,00	14,70

Tabel 6. perhitungan uji levene

F	df1	df2	Sig.
4,521	2	6	,063

Tabel 7. Perhitungan hasil penelitian

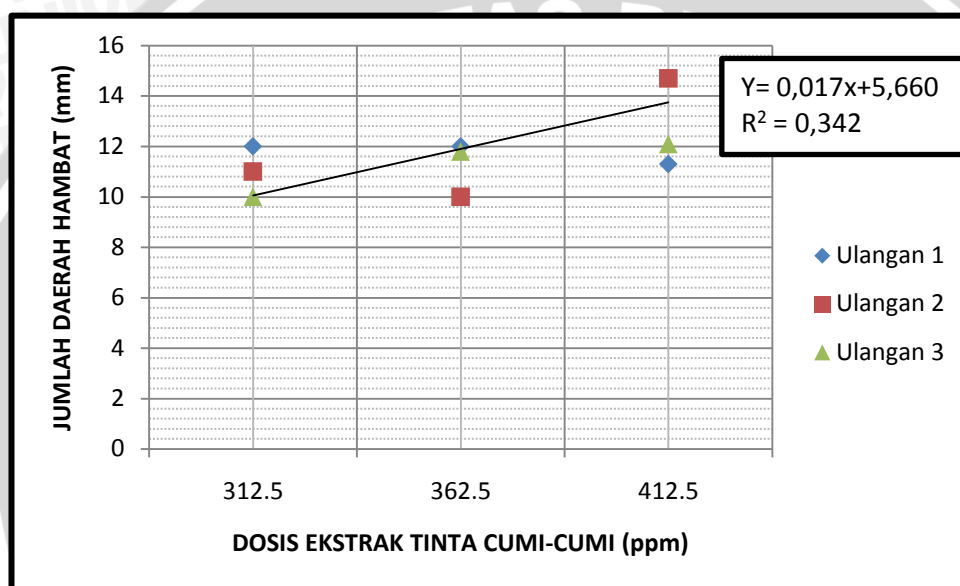
	Jumlah Kuadrat	df	Rata-rata Kuadrat	F	Sig.
Antar kelompok	4,349	2	2,174	1,567	,283
Dalam kelompok	8,327	6	1,388		
Total	12,676	8			

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan metode ANNOVA one way Tabel 6. dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak tinta cumi dengan dosis yang berbeda memberikan hasil berbeda nyata dalam menghambat aktifitas bakteri *V.alginolyticus*. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan, dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf nyata 0,05% (selang kepercayaan 95%) maupun taraf nyata 0,01% (selang kepercayaan 99%).

Hasil uji BNT dengan nilai BNT 5% dan 1%. Dalam uji ANOVA one way, uji tukey adalah uji pemilihan dosis terbaik. Sesuai pada tabel 8, pada kontrol ternyata berbeda nyata antara konsentrasi 312,5 ppm, 362,5 ppm, dan 412,5 ppm. Akan tetapi, antara konsentrasi 312,5 ppm, 362,5 ppm dan 412,5 ppm tidak berbeda nyata maka dari itu dipilih konsentrasi terkecil yang ternyata sudah bisa menghambat yaitu pada konsentrasi 312,5 ppm. Hal ini sesuai dengan pernyataan, Pelczar dan Chan (1986) menyatakan bahwa semakin tinggi tingkat konsentrasi antibakteri yang digunakan maka semakin cepat bakteri akan terbunuh, namun tidak efektif menggunakan konsentrasi yang terlalu tinggi dalam pengobatan. Hal ini sesuai urutan pada tabel yang dibaca dari bawah keatas urutan yang terbaik sampai terendah.

Tabel 8. Hasil Uji Tukey

Konsentrasi ekstrak Tinta Cumi-cumi (ppm)	N	Subset for alpha		Notasi
		1	2	
312,5	3		11,000	a
362,5	3		11,766	a
412,5	3		12,700	a
Sig.			,258	



Gambar 6. Grafik Linear Daerah Hambat Pertumbuhan Bakteri *V.alginolyticus*

Pada gambar 6 menunjukkan bahwa grafik berbentuk linier dengan persamaan $y = 0,017x + 5,660$ dan $R^2 = 0,342$. Hal ini berarti semakin besar konsentrasi ekstrak tinta cumi yang diberikan, maka diameter daerah hambatan yang terbentuk semakin luas. Hal ini didasarkan oleh kandungan ekstrak tinta cumi yang mengandung senyawa antibakteri yaitu asam oleat (Asam lemak tak jenuh). Menurut Setyaningsih (2012), jenis asam lemak yang bersifat antimikroba adalah jenis asam lemak palmitat dan asam oleat. Lipid membunuh

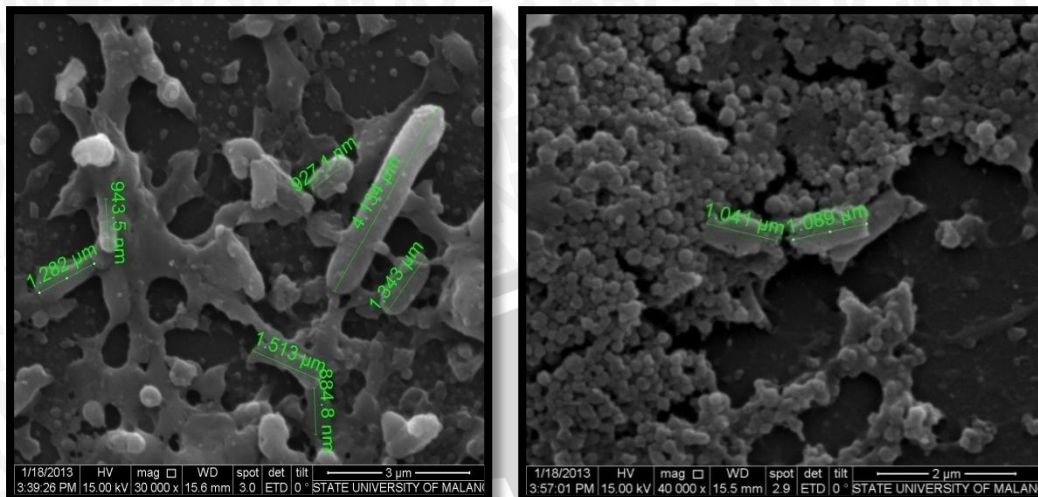
mikroorganisme dengan menembus sel dan mengganggu sintesis asam lemak membrane seluler.

Dari grafik juga menunjukkan bahwa dosis terbaik ekstrak tinta cumi sebagai antibakteri yaitu dosis 312,5 ppm, karena dosis terendah yang sudah bisa menghambat pertumbuhan bakteri *V.alginolyticus*. Untuk perhitungan lengkap daerah hambat pertumbuhan bakteri *V.alginolyticus* dapat dilihat pada Lampiran 4.

4.4 Karakter dan Struktur Bakteri yang Dihambat Ekstrak Tinta Cumi-Cumi

Bakteri vibrio adalah bakteri gram negatif yang berbentuk batang bengkok, oksidase dan katalase positif, memfermentasikan glukosa tanpa menghasilkan gas dan mempunyai flagel polar. Bakteri ini sangat umum dijumpai di air payau dan laut. Sebagian bersifat saproba namun ada beberapa spesies yang menyebabkan penyakit vibriosis pada hewan akuatik termasuk ikan (Desrina, 2006). Dinding sel terdiri dari lipid 11-12% dan lapisan peptidoglikan yang lebih tipis dari bakteri gram positif.

Berdasarkan hasil penelitian dengan ekstrak tinta cumi-cumi terhadap bakteri *V.alginolyticus* terjadinya penghambatan terhadap pertumbuhan sel bakteri diduga disebabkan karena kerusakan yang terjadi pada komponen struktural membran sel bakteri. Gambar kerusakan bakteri yang dihambat oleh ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dapat dilihat pada Gambar 7.



Sebelum

Sesudah

Gambar 7. Bakteri *V.alglnolyticus* sebelum dan setelah pemberian ekstrak tinta cumi

Hasil penelitian diduga ekstrak tinta cumi-cumi dari pelarut aquades mengandung senyawa Asam oleat (*oleic acid*) yaitu termasuk asam lemak tidak jenuh. Asam lemak tak jenuh berantai panjang (misalnya oleat, linoleat, linolenat) merupakan komponen asam-asam lemak omega 3,6 dan 9 yang sangat bermanfaat bagi kesehatan. Asam lemak dapat menghambat pertumbuhan sel bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan *S. pyogenes*, serta bakteri gram negatif *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Pada tinta cumi ini bersifat larut dengan air karena Asam lemak yang bersifat polar cenderung larut dalam pelarut polar. Asam lemak yang tidak jenuh lebih mudah larut dibanding asam lemak jenuh dengan panjang rantai yang sama, dengan demikian asam lemak yang derajat ketidajenuhannya lebih tinggi lebih mudah larut (Ardiana, 2007).

Asam lemak dapat bertindak sebagai surfaktan anionik dan memiliki sifat antibakteri dan antijamur pada pH rendah, selain menjadi selektif terhadap gram positif organisme dengan menargetkan struktur dan fungsi bakteri sel dinding juga membrane (Gehan, 2009).

4.6 Lingkungan Hidup Bakteri *V.alginolyticus*

4.6.1 pH

Berdasarkan pengukuran pH, didapatkan nilai pH media sebesar 7. Kondisi ini baik untuk pertumbuhan bakteri. Disamping nutrisi yang memadai, sejumlah kondisi lain harus dipenuhi untuk menumbuhkan bakteri. Media harus mempunyai pH yang tepat yaitu tidak terlalu asam dan tidak terlalu basa, pada dasarnya tidak satupun bakteri dapat tumbuh baik pada pH lebih dari 8. Sebagian besar bakteri patogen tumbuh baik pada pH netral (pH = 7) atau pada pH yang sedikit basa (Volk dan Wheeler, 1993).

4.6.2 Suhu

Suhu yang diterapkan selama masa inkubasi dapat mempengaruhi laju pertumbuhan bakteri, karena mempengaruhi laju semua reaksi seluler. Suhu yang diukur pada penelitian adalah suhu inkubator. Pada saat penelitian, suhu inkubator yang digunakan sebesar 35°C untuk *V.alginolyticus*. Bauman *et al.* (1984) dalam Prajitno (2008) menyatakan bahwa suhu optimum untuk pertumbuhan Vibrio berkisar antara 30 – 35°C sedangkan pada suhu 4°C dan 45°C bakteri tersebut tidak dapat tumbuh dan pada suhu 55°C akan mati. Dengan demikian suhu yang digunakan dalam penelitian masih berada dalam kisaran yang optimal untuk pertumbuhan bakteri.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dari Efektivitas Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*) sebagai Bahan Anti Vibriosis Terhadap Daya Hambat *V. alginolyticus* Secara In Vitro, maka didapatkan kesimpulan sebagai berikut :

Penggunaan Ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan konsentrasi yang berbeda memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* secara *in vitro*. Dilihat dari rata-rata diameter hambatan pada bakteri *V. alginolyticus* untuk perlakuan K (0 ppm) adalah 0 mm, perlakuan A (312,5 ppm) adalah 11 mm, perlakuan B (362,5 ppm) adalah 11,27 mm. perlakuan C (412,5 ppm) adalah 12,7 mm. Maka dari itu kontrol berbeda nyata dengan perlakuan A(312,5 ppm), B(262,5 ppm), dan C(412,5 ppm) dan tiap perlakuan saling tidak berbeda nyata. Dari hasil tersebut didapatkan hasil yang berbeda nyata terhadap diameter daya hambatan. Sehingga didapatkan dosis terbaik yaitu 312, 5 ppm.

5.2 Saran

- Berdasarkan hasil penelitian Efektivitas Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*) sebagai Bahan Anti Vibriosis Terhadap Daya Hambat *V. alginolyticus* Secara In Vitro, disarankan menggunakan dosis ekstrak tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan dosis terkecil yaitu 312,5 ppm.
- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pemberian dosis Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan dosis yang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggriawan, D. R. 2011. Si Bocum (Brownies Cumi- Cumi) Anti Kanker. PKM Gagasan Tertulis (PKM-GT). Universitas Brawijaya.
- Anonymous. 2010. Mekanisme Kerja Penghambatan Senyawa Antimikroba. <http://www.Netsains.com> diakses 12 November 2012.
- _____. 2012. Perkembangan ekspor komoditi hasil perikanan menurut komoditas utama periode Januari–September 2001–2002. Departemen Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia. www.dkp.go.id.
- _____. 2013. Lilin Lebah. www.Google.com. Diakses tanggal 7 Februari 2013.
- Afrianto, E. dan E. Iviawaty. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Kanisius. Yogyakarta. 88 hal.
- Ardiana, S. Dwi. 2007. Pemisahan Asam Lemak Tak Jenuh Dalam Minyak Nabati Dengan Ekstraksi Pelarut dan Hidrolisa Multistage. *Ekuilibrium*. Vol. 6 No 2 Juli 2007: 59-64.
- Badaruszaman. 2012. Teknik Pembenihan Udang Windu. [Http://blog.unsri.ac.id](http://blog.unsri.ac.id). Diakses 28 Agustus 2012.
- Benson, H. J. 1990. Microbiological Applications. A Laboratory Manual in General Microbiology. Wm. C. Brown Publishers. USA. 367 p.
- Bintang, M. 1997. Kinerja senyawa antimikroba dari *Streptococcus Lactis* Bee 2259 terhadap *Escherichia coli* AB 1360 pBR 325. Staf Pengajar Jurusan Kimia FMIPA. IPB. Bandung. 9 hal.
- Chan, K., M.L. Woo, L.Y. Lenn and G.L. French, 1989. *Vibrio parahaemolyticus* and Other Halophilic Vibrios associated with seafood in Hongkong. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 57-64.
- Dalimunthe, Aminah. 2009. Interaksi Pada Obat Antimikroba. Departemen Farmakologi. Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Desrina, Arief T., Ambariyanto, Suryaningrum, S. 2006. Uji Keganasan Bakteri *Vibrio* pada Ikan Kerapu Macan (Ikan Kerapu Macan). *Ilmu Kelautan*. Vol. 11 (3) : 119 – 125.
- Dwidjoseputro, D. 1998. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Penerbit Djambatan. Jakarta. 214 hal.
- Fahri, Muhammad. 2009. Bakteri Pathogen Pada Budidaya Perikanan *Vibrio Alginolyticus*. <http://www.google-blogger.com>. Diakses 1 November 2012.
- Fardha, Fanny. 2000. Tinjauan Kandungan Asam Lemak Omega-3 Pada Beberapa Jenis Ikan Laut. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB: Bogor.

- Feliatra. 1999. Identifikasi Bakteri patogen (vibrio sp.) Di Perairan Nongsa Batam Propinsi Riau. *Jurnal Natur Indonesia* 1999. II (1) : 28-33.
- Gehan M.Abou-Elela, Abd-Elnaby Hanan. 2009. Marine Natural Products and Their Potential Applications as Anti-Infective Agents. *World Applied Sciences Journal*. 7 (7): 872-880.
- Girija, S., Hariprasad G, Vijayashree Priyadharsini J, Pandi Suba K, Raghuraman R, Gnanavendhan SG. 2011. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LOLDUVIN-S: A NOVEL ANTIMICROBIAL PROTEIN FROM THE INK OF INDIANS QUID LOLIGO DUVAUCELI. *International Journal of Current Research and Review*. Vol. 03 issue 07 July 2011.
- Hakim, Lukman Nur. 2001. Uji Performasi Alat Pengepres Model Penggiling Silinder Dalam Proses Pembuatan Produk Bahan Mentah Cumi-Cumi (Loligo sp.) Kertas. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB: Bogor.
- Inglis, Valerie, Roberts J. Ronald, Bromage R. Niall. 2003. *Bacterial Diseases of Fish*. Institute of Aquaculture. University of Stirling.
- Irianto, Agus. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 256 Hal.
- Irianto, Koes. 2006. *Mikrobiologi Menguak Dunia Mikroorganismes Jilid 1*. Yrama Widya. Bandung. 256 Hal.
- Jawetz, E., J.L. Manik dan E.A Edelberg. 1982. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kedokteran*. CV. E.G.C. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 845 hal.
- Kamiso, H. N. 1996. *Vibriosis Pada Ikan dan Alternatif Cara Penanggulangannya*. UGM J. Fish Sci.), 1 (1): 1-8.
- Kompas. 2011. Cumi-Cumi Jinakkan Tumor. <http://lipsus.kompas.com.grammy/awards/read/2008/110415251969/Cumi.Cumi.Jinakkan.Tumor.htm>. Diakses tanggal 1 November.
- Kordi, M.G.H. 2004. *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan*. PT Rineka Cipta dan PT Bina Adiaksara. Jakarta. 190 Hal.
- Kusmiati, dan Ni Wayan. 2006. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *B I O D I V E R S I T A S* ISSN: 1412-033X Vol 8, Nomor 1 Januari 2007 Halaman: 48-53
- Laminem. 2007. *Kajian Efektifitas Ciprofloxacin Terhadap Infeksi Aeromonas Salmonicida pada Koi (C. Carpio)*. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. UB : Malang.
- Lang, T dan Bhatt, P. 2007. *Health Food From The Sea. Feeding and Healing Human*. 2 (2): 19-22.

- Latifah, Asti. 2011. Karakteristik Morfologi Cumi-Cumi (*Loligo sp.*). <http://marinamoy.blogspot.com/2011/04/karakteristik-dan-morfologi-cumi-cumi.html>. Diakses tanggal 1 November 2012.
- Lay, B. H. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 168 Hal.
- Liu, H., P. Luo, S. Chen, J. Shang. 2011. Effects of Squid Ink on Growth Performance, Antioxidant Functions and Immunity in Growing Broiler Chickens. *Asian-Aust J. Anim. Sci.* Vol. 24 No.12 : 1752-1756.
- Maftuch. 2006. Karakteristik Protein Adhesin Omp *Vibrio Alginolyticus* dan Antibodi Hasil Induksinya serta pengaruhnya Terhadap Respon Imun Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Disertasi. Program Doctor. Program Ilmu Kedokteran. Kekhususan Biomedik. Universitas Brawijaya. Malang.
- Mariyono dan Sundana, A. 2002. Teknik Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Bercak Merah pada Ikan Air Tawar yang Disebabkan oleh Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Buletin Teknik Pertanian*. Vol. 7. No. 1.
- Martutik. 2005. Studi Pertumbuhan Bakteri *Vibrio harveyi* Dan *Vibrio alginilyticus* Pada Media TSA Dengan Penambahan CHITIN. <http://digilib.umm.ac.id> yang diakses pada tanggal 06 April 2013.
- Najib. 2012. Khasiat Cumi-Cumi. <http://www.terbaca.com/2011/10/khasiat-cumi-cumi.html>. Diakses tanggal 1 Oktober 2012.
- Natasyifa, N. 2011. Tinta Cumi Bermanfaat untuk Obat Kanker. http://hobi.ikan.blogspot.com/2011_10_01_archive.html. Diakses tanggal 1 November 2012.
- Noel, R., Krieg and John G. H. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol I. Williams and Wilkins. Baltimore USA. 964 p.
- Pelczar, M. J and Chan E. C. S. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi jilid I*. Penerjemah: R.S Hadioetomo, Teja I, S. Sutarmi, S.L Angka. Penerbit Universitas Indonesia Press. Jakarta. 502 Hal.
- Prajitno, A. 2007. *Penyakit Ikan-Udang : Bakteri*. UM Press. 114 Hal
- _____. 2008. *Penyakit Ikan – Udang Virus*. Universitas Negeri Malang Press. Malang. 106 Hal.
- Pranata, F.Sinung. 1997. Isolasi Alkaloid dari Bahan Alam (Alkaloid Insulation of Natural Materials). *Biota Vol.II (2)*: 96-99.
- Puspita, Nesia E. 2011. Pengaruh Perbedaan Pemberian Konsentrasi Supernatan *Vibrio probioticus* AJ345063 Sebagai Kandidat Probiotik Terhadap AKTIFITAS Bakteri *Vibrio alginolyticus* Secara In-Vitro. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Malang.
- Rahayu, Imbang Dwi. 2009. Isolasi dan Identifikasi Saponin dari Aloe Barbadensis Miller Sebagai Antibiotik Alami : Penanggulangan Mastitis pada Sapi Perah. *GAMMA*, Vol. V No. 1: 28 – 33 Hal.

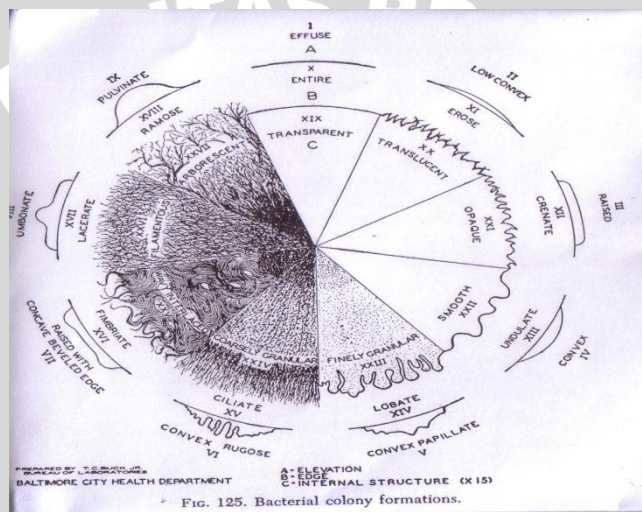
- Rinawati, N . 2012. Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujete* L.) Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*. <http://www.ITS-Undergraduate-13710-Paper-370813>. Diakses tanggal 1 November 2012.
- Roihanah, S. 2011. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria* sp. Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *vibrio harveyi* secara in vitro. Thesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Malang.
- Serrano, P. H. 2005. Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Rome. P: 3, 23.
- Setyaningsih, Iriani. 2012. Antimikroba Dari *Chaetoceros gracilis* Yang Dikultivasi Dengan Lama Penyinaran Berbeda. *Jurnal Akuatika* Vol.III No 2/ September 2012 (180-189) ISSN 0853-2523.
- Sukadi dan Fatuchri. 2005. Profil Perikanan Budidaya (Acuaculture Profile). Departemen Kelautan dan Perikanan. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Jakarta. 38 hal.
- Sumargono. 2004. Pengaruh pemberian Perasan Jahe Merah (*Zingiber officinale*) dengan Konsentrasi yang Berbeda Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Vibrio harveyi* Secara Invitro. Skripsi Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang. Tidak diterbitkan. 71 hal.
- Tamiang. 2009. Laporan Praktikum Pengujian Bakteri *Vibrio* sp. Kuliah Mikrobiologi. [Http://paling-unik-ajaib-teraneh-terindah-didunia.blogspot.com/2011/01/laporan-praktikum-pengujian-bakteri.html.html](http://paling-unik-ajaib-teraneh-terindah-didunia.blogspot.com/2011/01/laporan-praktikum-pengujian-bakteri.html.html). Diakses tanggal 16 September 2012.
- Tuney, I., B.H. Cadirci, D. Nal and A. Sukatar, 2006. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turk. J. Biol.*, 30: 171-175.
- Utami, Eka R. 2012. Antibiotika, Resistensi dan Rasionalitas Terapi. *Sainstis*. Vol. 1 No.1/ April-September 2012.
- Widiyanti, Luluk. 2009. Patogenesis Molekuler Infeksi Bakteri *Vibrio Alginolyticus* pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, UB: Malang.
- Yuasa, K, N. Panigoro, M. Bahnan dan E. Barkat. 2003. Panduan Diagnosa Penyakit Ikan. Balai Budidaya Air Tawar Jambi, Ditjen Perikanan Budidaya, DKP dan JICA. 75 hal.
- Zee. 2011. Cumi-Cumi. [Http://v-behavior-url-default-vmlo.html](http://v-behavior-url-default-vmlo.html). Diakses tanggal 1 November 2012.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Cara Identifikasi Bakteri

a. Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

Pengamatan morfologi koloni bakteri dapat dilihat pada biakan koloni bakteri yang murni. Pengamatan tersebut meliputi warna, bentuk, tepian koloni, elevasi dan struktur dalam. Untuk cara pengamatan morfologi koloni disajikan pada Gambar 8 dibawah ini.



Gambar 8. Cara Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

b. Pengamatan Morfologi Sel Bakteri

Pemeriksaan secara mikroskopik terhadap bakteri bertujuan untuk mengetahui, melihat dan mempelajari morfologi dari bakteri tersebut di bawah mikroskop, yaitu dengan melakukan pewarnaan. Pewarnaan yang umum dilakukan adalah pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram ini dilakukan dengan membuat sediaan oles bakteri pada kaca preparat dan difiksasi diatas api bunsen sampai kering. Kemudian diwarnai dengan Gram A dan didiamkan selama 2 menit. Setelah itu dibilas dengan air mengalir dan ditunggu hingga kering. Selanjutnya ditetesi Gram B dan didiamkan selama 1 menit. Buang sisa Gram B tersebut kemudian ditetesi Gram C dan didiamkan selama 30 detik

sampai zat warna menghilang. Kemudian dibilas dengan air mengalir dan ditunggu hingga kering. Olesan tersebut ditetesi dengan Gram D dan dibiarkan selama 2 menit kemudian sisa zat tersebut dibuang dan dibilas dengan air mengalir. Setelah kering, olesan ditetesi dengan minyak imersi secukupnya dan dapat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Bakteri Gram positif akan terlihat berwarna ungu kebiruan sedangkan bakteri Gram negatif akan terlihat berwarna merah dibawah mikroskop. Untuk bahan pewarnaan Gram, pada Gram A terkandung bahan-bahan dari Kristal violet, Ethanol 95%, Ammonium oxalat, aquades; pada Gram B terkandung bahan-bahan dari Iodine, Kalium, Aquades; pada Gram C terkandung bahan-bahan dari Ethanol dan HCl dan untuk Gram D terkandung bahan-bahan dari Safranin, Ethanol, Aquades. Untuk bahan pewarnaan disajikan pada Gambar 9. dibawah ini.



Gambar 9. Bahan Pewarnaan Gram Bakteri

c. Uji Biokimia dengan Uji Microbact kit TM

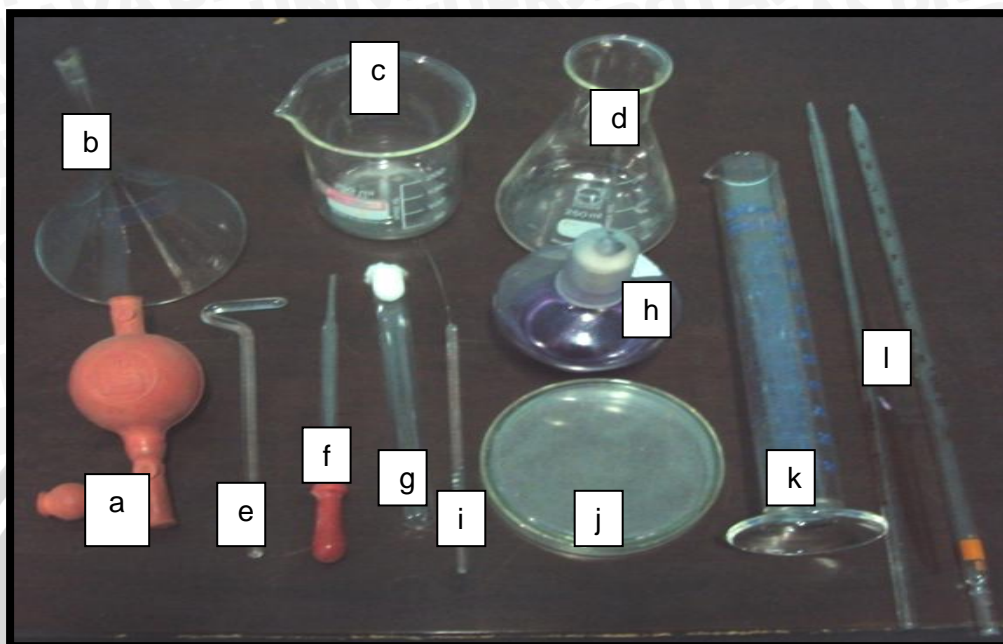
Pembuktian bahwa bakteri ini merupakan bakteri *Vibrio sp.* telah dilakukan dengan menggunakan uji microbact kit TM. Setelah semua telah ditetaskan pada setiap bagian strip, test strip segel ditutup dan diinkubasi pada 35°C selama 18-

24 jam. Hasil ditulis dan diinterpretasikan dengan menggunakan Microbact™
indentification package.



LAMPIRAN

Lampiran 2. Gambar Alat yang digunakan:



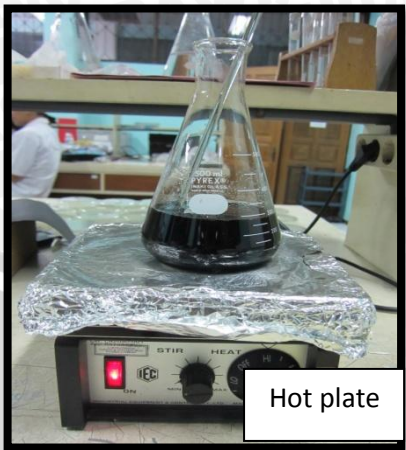
- (a) Bola Hisap
- (b) Corong
- (c) *Beaker Glass*
- (d) Erlenmeyer
- (e) *Triangel*
- (f) Pipet Tetes

- (g) Tabung Reaksi
- (h) Bunsen
- (i) Jarum Ose
- (j) Cawan Petri
- (k) Gelas Ukur
- (l) Pipet volum





Timbangan analitik



Hot plate



Sprit



Mikropipet



Lemari pendingin



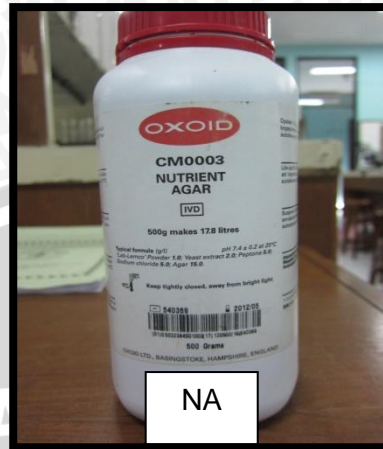
Spektrofotometer



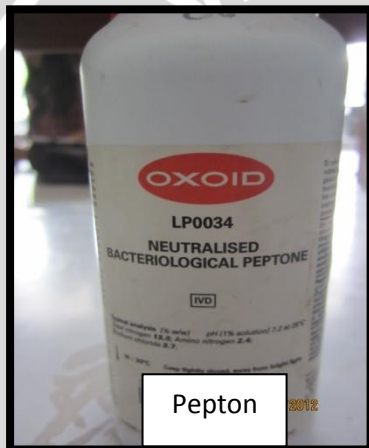
Gambar Bahan yang digunakan :



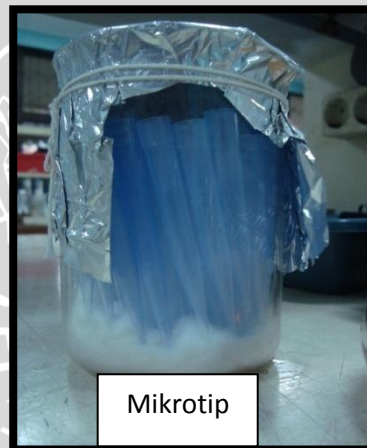
TCBSA



NA



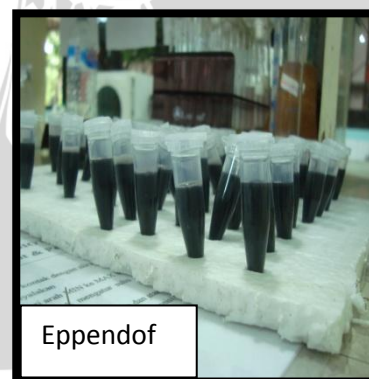
Pepton



Mikrotip



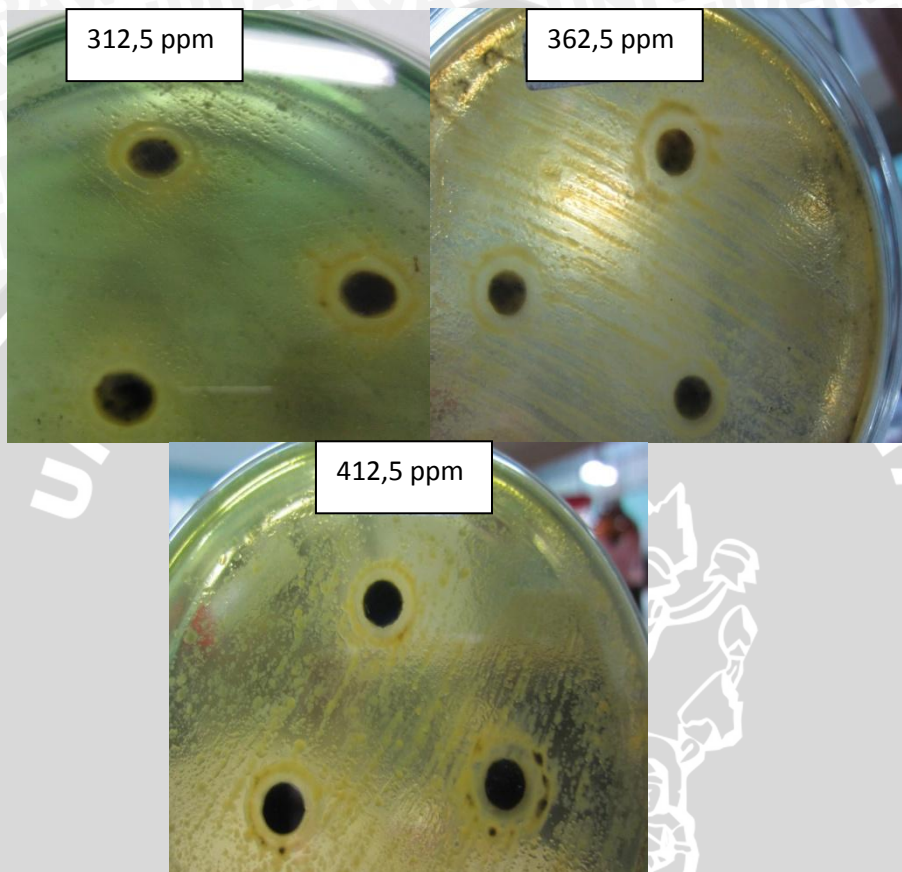
Kertas Cakram



Eppendof

LAMPIRAN

LAMPIRAN 3. Gambar Daya Hambat Antibakteri Alami Ekstrak Tinta Cumi-cumi terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*



Gambar 10. Daerah hambat Ekstrak Tinta Cumi-cumi terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*

LAMPIRAN

Lampiran 4. Data hasil perhitungan jumlah daya hambat pada uji cakram ekstrak tinta cumi-cumi dengan bakteri *V.algynoliticus*

Data Jumlah daya hambat pada uji Cakram

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-Rata
	1	2	3		
Kontrol	6,00	6,00	6,00	18	6,00
312,5	12	11	10	33	11
362,5	11,8	11,7	11,8	33,8	11,27
412,5	11,3	14,7	12,1	38,1	12,7
Total				122,9	

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		cakram
N		9
Normal Parameters ^a	Mean	11,8222
	Std. Deviation	1,25875
Most Extreme Differences	Absolute	,302
	Positive	,302
	Negative	-1,46
Kolmogorov-Smirnov Z		,905
Asymp. Sig. (2-tailed)		,386

a. Test distribution is Normal

Nilai Z = 0.560 ($\alpha > 0,05$) jadi, data diatas normal

Perlakuan

Uji Cakram

Dosis	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error	95% selang kepercayaan untuk rata-rata		minimum	maksimal
					Batas Terendah	Batas Tertinggi		
312,5	3	11,0000	1,00000	,57735	8,5159	13,4841	10,00	12,00
362,5	3	11,7667	,05774	,03333	11,6232	11,9101	10,70	11,80
412,5	3	12,7000	1,77764	1,02632	8,2841	17,1159	11,30	14,70
Total	12	11,8222	1,25875	,41958	10,8547	12,7898	10,00	14,70

ANOVA

Cakram

Sember Keragaman	JK	df	Rata-rata Kuadrat	F	Sig.
Perlakuan	4,349	2	2,174	1,567	,283
Acak	8,327	6	1,388		
Total	12,676	8			

Nilai sig. < α = 0,01 berarti data sangat beda nyata

Beberapa Perbandingan

Hambat

Tukey HSD

(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
312,5	362,5	-,76667	,96187	,718	-3,7179	2,1846
	412,5	-1,70000	,96187	,258	-4,6513	1,2513
362,5	312,5	,76667	,96187	,718	-2,1846	3,7179
	412,5	-,93333	,96187	,620	-3,8846	2,0179
412,5	312,5	1,70000	,96187	,258	-1,2513	4,6513
	362,5	,93333	,96187	,620	-2,0179	3,8846



ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)	4,349	2	2,174	1,567	,283
	Linear Term Contrast	4,335	1	4,335	3,124	,128
	Deviation	,014	1	,014	,010	,924
	Quadratic Term Contrast	,014	1	,014	,010	,924
Within Groups		8,327	6	1,388		
Total		12,676	8			

*. Perbandingan rata-rata adalah signifikan pada tingkat 0,05

* = tidak berbeda nyata

Hasil Uji Tukey HSD

Subset for alpha = 0.05				
PERLAKUAN	N	1	2	Notasi
312,5	3		11,0000	a
362,5	3		11,7667	a
412,5	3		12,7000	a
Sig.			,258	

Ringkasan Model

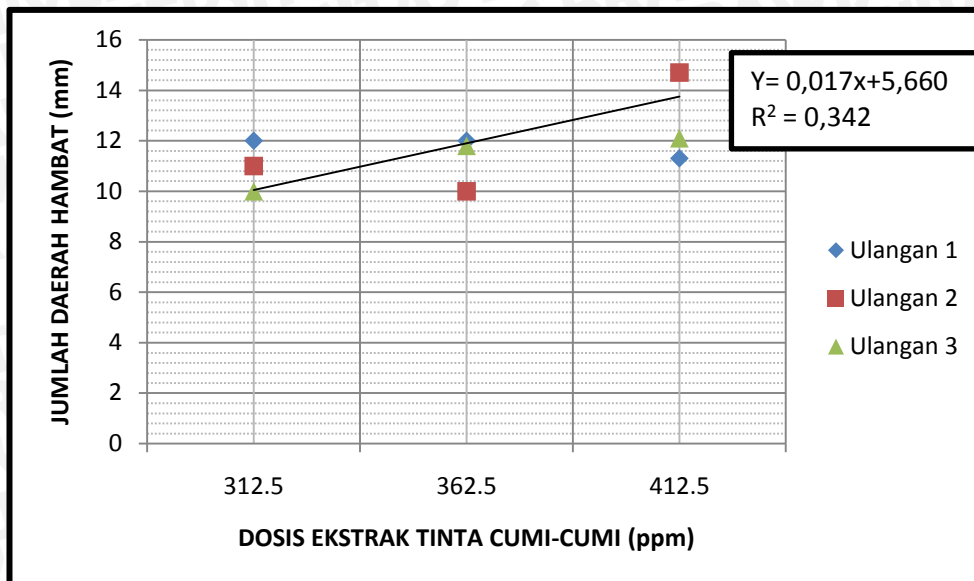
R	R ²	Penyesuaian R ²	Perkiraan Standar Eror
,585	,342	,248	1,092

Koefisien

	Bukan Koefisien Standar		Standar Koefisien	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Dosis	,017	,009	,585	1,907	,098
(Constant)	5,660	3,251		1,741	,125

Didapatkan persamaan $Y = 0,017x + 5,660$





Grafik Linear Daerah Hambat Pertumbuhan Bakteri *V.alginolyticus*

