Penurunan produksi enzim eksoprotease *Aeromonas hydrophila* oleh ekstrak buah tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Reduction of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila* by tomato fruits extract (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

NUR AINI, SUTARNO, ARI SUSILOWATI

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A
Surakarta 57126. Tel./Fax. +62-271-663375

Diterima: 11 Oktober 2005. Disetujui: 24 Agustus 2006.

Abstract. *Aeromonas hydrophila* is pathogenic bacteria in fish. One of its virulence factors is exoprotease. A quorum-sensing system controls the production of exoprotease. Quorum sensing is an intercellular communication of bacteria using a signal molecule of C4-HSL. The exoprotease production of *A. hydrophila* can be blocked using quorum sensing inhibitors. The inhibition of quorum sensing of *A. hydrophila* can be conducted by C4-HSL analogs molecules. In this research, the molecules predicted as quorum sensing inhibitors and act as C4-HSL analog molecules were furanone from tomato fruits. The inhibition of the quorum sensing of *A. hydrophila* could be shown by reducing exoprotease production. This research aimed to determine the reduction of exoprotease production of *A. hydrophila* by extracts of n-hexane, ethyl acetate, and methanol of tomato fruits with the concentrations of 0%, 2%, 4%, 6%, and 8%, respectively. The qualitative exoprotease assay result showed that n-hexane extract of tomato did not affect growth and exoprotease production of *A. hydrophila*. As much as 4% of ethyl acetate extract of tomato fruits could inhibit exoprotease production but affect *A. hydrophila* growth. Meanwhile, 4% methanol extract of tomato fruits could inhibit exoprotease production without affecting *A. hydrophila* growth. The quantitative exoprotease assay result showed that 4% of methanol extract could inhibit exoprotease production by 71.68% without affecting the growth of *A. hydrophila*.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, exoprotease production, quorum sensing, reduction, tomato fruits

PENDAHULUAN

Aeromonas hydrophila ditemukan paling banyak di perairan air tawar, bersifat patogen terhadap ikan, dan hampir semua ikan air tawar rentan terhadap serangan bakteri ini (Noga, 1995). *Aeromonas hydrophila* menyebabkan penyakit *Motile Aeromonad Septicemia* (MAS) (Fryer and Bartholomew, 1996). Di Jawa, bakteri ini secara luas menyebabkan kematian pada ikan budi daya, yang dilaporkan pertama kali pada tahun 1980 dan mengakibatkan kerugian sangat besar pada perikanan air tawar (Afrianto dan Liviawati, 1992). Oleh sebab itu, perlu adanya tindakan penanganan yang efektif untuk mengatasi patogenisitas dari *A. hydrophila*.

Aeromonas hydrophila mampu menghasilkan endotoksin dan produk ekstraseluler seperti hemolisin, sitotoksin, enterotoksin, leukosidin, dan protease (Allan dan Stevenson, 1981). Enzim eksoprotease merupakan faktor virulensi utama yang bersifat proteolitik dan dapat mendegradasi jaringan otot, sehingga dapat merusak jaringan tubuh inang dan menimbulkan infeksi pada jaringan inang tersebut (Secades and Guijarro, 1999).

Produksi eksoprotease *A. hydrophila* diatur oleh suatu molekul sinyal *N-Butanoyl-L-Homoserine Lactone* (C4-HSL). Molekul sinyal ini juga berfungsi sebagai alat komunikasi antar sel pada suatu populasi bakteri sehingga disebut sistem *quorum sensing* (Swift *et al.*, 1997). Dengan adanya molekul sinyal, bakteri mampu mengetahui kehadiran bakteri lain di lingkungannya. Konsentrasi molekul sinyal sebanding dengan jumlah bakteri yang ada. Semakin banyak populasi bakteri, semakin tinggi konsentrasi C4-HSL di lingkungan, dan apabila telah mencapai kepadatan tertentu, C4-HSL ini akan mengaktifkan gen penyandi enzim eksoprotease (Taga and Bassler, 2003). Dengan demikian, sistem *quorum sensing* tersebut merupakan target utama dalam upaya pengendalian infeksi *A. hydrophila*, yaitu dengan merusak sistem *quorum sensing*-nya, sehingga produksi enzim eksoprotease menurun dan patogenisitas *A. hydrophila* menurun tanpa harus membunuh bakteri tersebut.

Perusakan sistem *quorum sensing* dapat dilakukan oleh senyawa kemoterapeutik yaitu dengan menghambat aktivitas molekul sinyal C4-HSL (Hentzer and Givskov, 2003). Dengan ter-

hambatnya aktivitas C4-HSL maka produksi enzim eksoprotease menurun, sehingga patogenisitas *A. hydrophila* dapat diturunkan (Lynch, 2002).

Berdasarkan penelitian Rasmussen *et al.* (2000), halogen furanon yang merupakan metabolit sekunder dari makroalga laut *Delisea pulchra*, mampu menghambat molekul sinyal *N-Butanoyl-L-Homoserine Lactone* pada *Serratia liquefaciens* sehingga menghambat motilitas *S. liquefaciens*. Furanon juga dapat menghambat *Acyl Homoserine Lactone* yang mengontrol produksi faktor virulensi dan patogenisitas *Pseudomonas aeruginosa* (Hentzer and Givskov, 2003). Selain sebagai metabolit sekunder pada *D. pulchra*, senyawa furanon tersebut juga terdapat secara alami sebagai senyawa cita rasa (*flavour compound*) pada tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Martinelli *et al.*, 2004; Buttery *et al.*, 2001). Hal ini menjadi dasar untuk melakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak buah tomat terhadap produksi C4-HSL *A. hydrophila*. Penghambatan C4-HSL pada *A. hydrophila* dapat dibuktikan dengan penurunan produksi enzim eksoprotease yang dihasilkan. Produksi enzim eksoprotease dapat diketahui dengan cara mengukur aktivitasnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengukur aktivitas enzim eksoprotease dari *A. hydrophila* setelah pemberian ekstrak buah tomat dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol.

Tujuan penelitian ini adalah: (1) mengetahui adanya penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* setelah pemberian ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol buah tomat (*L. esculentum*) dengan variasi konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, dan 8%, serta (2) mengetahui jenis dan konsentrasi ekstrak buah tomat yang tepat untuk menurunkan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juli 2006 di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat FMIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Alat dan Bahan

Alat untuk ekstraksi: timbangan elektrik, blender, pisau (*cutter*), erlenmeyer, freezer, gelas beker, gelas ukur, aluminium foil, kertas saring, dan *rotary evaporator*.

Alat untuk pemeliharaan kultur A. hydrophila: tabung reaksi, inkubator, dan *hot plate*.

Alat untuk pengujian kualitatif aktivitas enzim eksoprotease A. hydrophila: cawan petri, jarum ose, laminar air flow, bunsen Büchner, tabung reaksi, vortek, dan *hot plate*.

Alat untuk pengukuran pertumbuhan dan pengukuran aktivitas enzim eksoprotease A. hydrophila: spektrofotometer, kuvet, shaker, mikropipet dan tip, laminar air flow, gelas ukur, erlenmeyer, *hot plate*, dan sentrifus.

Alat sterilisasi: autoklaf.

Bahan yang digunakan meliputi: buah tomat (*L. esculentum* var *commune*), kultur murni *A. hydrophila* yang diperoleh dari Laboratorium Penyakit Ikan (*Fish Disease*) Jurusan Teknologi Perikanan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Medium Luria Bertani (LB) Agar, Luria Bertani (LB) Broth, azocasein (Sigma), susu skim, trichloroacetic acid (TCA), NaOH 0,5 M, dan buffer fosfat pH 8, serta pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol.

Cara Kerja

Pembuatan ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat, dan ekstrak metanol buah tomat

Buah tomat yang masak dicuci bersih, kemudian diiris tipis dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 80°C. Irisan buah tomat yang sudah kering diblender hingga menjadi serbuk dan disimpan dalam wadah tertutup. Serbuk dilarutkan dalam n-heksan (100 mg serbuk/100 ml n-heksan), dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak kemudian disaring dan diambil filtratnya. Filtrat dipekatkan dalam *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak n-heksan buah tomat. Selanjutnya, ampas yang diperoleh dari penyaringan dilarutkan dalam etil asetat, dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya. Filtrat dipekatkan dalam *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak etil asetat buah tomat, sedangkan ampasnya dilarutkan dalam metanol, dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Filtrat dipekatkan dalam *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak metanol buah tomat.

Pemeliharaan Kultur A. hydrophila

Kultur *A. hydrophila* ditumbuhkan pada agar miring NA pada suhu 30°C.

Penentuan Kurva Standar A. hydrophila

Penentuan kurva standar dilakukan untuk mengetahui waktu yang tepat *A. hydrophila* mencapai kepadatan 10^7 - 10^8 CFU/ml. Penentuan kurva standar bakteri dilakukan dengan cara memindahkan isolat bakteri berumur 24 jam ke dalam 200 ml medium LB Broth, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C dan dikocok dengan *shaker*. Pengukuran pertumbuhan bakteri dilakukan setiap 2 jam sekali mulai jam ke-0 dan selanjutnya setiap 2 jam selama 24 jam. Sebanyak 10 ml suspensi bakteri diambil dan diukur pertumbuhannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sehingga diketahui nilai OD (*Optical Density*). Hubungan antara nilai OD dengan jumlah bakteri per ml didapatkan melalui pembuatan kurva standar dengan menentukan plot, antara nilai OD dengan jumlah sel bakteri per ml pada hitungan cawan. Dari kurva standar ini dapat diketahui nilai OD *A. hydrophila* yang memenuhi kepadatan 10^7 - 10^8 CFU/ml.

Pengujian Kualitatif Aktivitas Enzim Eksoprotease

Uji ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kualitatif setelah perlakuan ekstrak buah tomat. Medium yang digunakan adalah Luria-Bertani (LB) Agar yang ditambah dengan 2% susu skim. Sterilisasi medium dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan sterilisasi susu skim dilakukan pada suhu 110°C selama 30 menit. Cawan petri diisi dengan 12 ml medium dengan penambahan ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol buah tomat dengan konsentrasi 0% (kontrol), 2%, 4%, 6%, dan 8%. Isolat *A. hydrophila* yang telah ditumbuhkan dalam media LB Broth diinokulasikan pada cawan petri yang berisi medium LB Agar padat dengan menggunakan metode titik (*spot plate*) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Masing-masing perlakuan dilakukan dengan tiga kali ulangan. Aktivitas enzim eksoprotease dapat dilihat dengan adanya zona bening pada medium (Swift et al., 1999). Luas zona bening pada masing-masing perlakuan dihitung, kemudian dibandingkan dengan luas zona bening pada kontrol.

$$\text{Luas zona bening} = \pi R^2 - \pi r^2$$

Keterangan:

R = jari-jari lingkaran total (koloni bakteri + zona bening) (dalam cm)

r = jari-jari lingkaran koloni bakteri (dalam cm)

n = 3,14

Luas zona bening dalam cm^2

Pengukuran Pertumbuhan *A. hydrophila*

Uji ini dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan *A. hydrophila* pada perlakuan ekstrak buah tomat. Isolat *A. hydrophila* berumur 24 jam ditumbuhkan pada 200 ml LB Broth yang telah diberi ekstrak buah tomat, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C dan dikocok dengan *shaker*. Pengukuran pertumbuhan bakteri dilakukan setiap 2 jam sekali mulai jam ke-0 dan selanjutnya setiap 2 jam selama 24 jam, yaitu 10 ml suspensi bakteri diambil dan diukur pertumbuhannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sehingga diketahui nilai OD (*Optical Density*). Sebagai kontrol, dilakukan pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila* dalam medium LB Broth yang tidak diberi perlakuan ekstrak buah tomat.

Pengujian Kuantitatif Aktivitas Enzim Eksoprotease *A. hydrophila*

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif pada perlakuan ekstrak buah tomat. Prinsip pengujian aktivitas enzim eksoprotease berdasarkan metode Hanlon dan Hodges (1981), yaitu kemampuan enzim eksoprotease untuk menghidrolisis *azocasein*. Residu *azocasein* yang tidak dapat terhidrolisis oleh enzim eksoprotease akan diendapkan oleh *trichloro acetic acid* (TCA). Endapan selanjutnya dipisahkan dari filtrat. Filtrat akan membentuk warna apabila direaksikan dengan NaOH. Intensitas warna yang terbentuk diukur

dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm. Pengujian secara kuantitatif hanya dilakukan pada ekstrak yang menunjukkan pengurangan aktivitas proteolitik terbesar yang ditunjukkan dengan luas zona bening paling kecil dibandingkan kontrol pada pengujian secara kualitatif aktivitas enzim eksoprotease. Sebanyak 10 ml suspensi bakteri yang telah diukur pertumbuhannya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 10 menit. Filtratnya diambil sebanyak 1 ml, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 3 ml larutan *buffer* fosfat (pH 8). Campuran ini kemudian diletakkan di atas penangas air hingga suhunya mencapai 37°C. Setelah itu, ditambahkan 2 ml *azocasein* yang sebelumnya telah dipanaskan pada penangas air hingga suhunya mencapai 37°C, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan 4 ml *trichloro acetic acid* (TCA) 10%, sehingga terbentuk endapan kuning yang dipisahkan dengan disentrifugasi. Filtrat sebanyak 5 ml diambil, lalu ditambah dengan 5 ml larutan NaOH 0,5 M dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 440 nm. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan setiap 2 jam sekali selama 24 jam sebanyak 3 kali ulangan. Satu unit aktivitas enzim eksoprotease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan kenaikan pengukuran absorbansi sebesar 0,01 setiap jam pada kondisi pengukuran. Unit aktivitas enzim eksoprotease yang digunakan dalam penelitian ini dinyatakan dalam U/ml, dan ditetapkan dengan rumus: unit aktivitas enzim/ml sampel (U/ml) = (absorbansi/0,01) x 2 (Hanlon and Hodges, 1981).

Analisis Data

Penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat dilihat dari aktivitas enzim eksoprotease secara kualitatif dan kuantitatif. Hasil pengujian kualitatif aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* yang dinyatakan dalam luas zona bening (dalam cm^2) pada masing-masing perlakuan dibandingkan dengan luas zona bening pada kontrol. Perlakuan yang mempunyai luas zona bening terkecil dilanjutkan pada pengujian kuantitatif aktivitas enzim eksoprotease.

Hasil pengukuran aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* berupa unit aktivitas enzim/ml sampel (U/ml) pada perlakuan yang menunjukkan aktivitas enzim eksoprotease terendah dibandingkan dengan aktivitas enzim eksoprotease pada kontrol dan penurunannya dinyatakan dalam persentase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kepadatan *A. hydrophila* yang Memenuhi Quorum Sensing

Aeromonas hydrophila mempunyai faktor virulensi utama berupa produksi enzim eksoprotease yang diatur oleh sistem *quorum sensing*. Dengan demikian untuk mendeteksi adanya produksi enzim eksoprotease, sistem

quorum sensing *A. hydrophila* harus berjalan terlebih dahulu. Sistem *quorum sensing* dapat berjalan apabila bakteri telah mencapai kepadatan tertentu. Pada *A. hydrophila*, dari kepadatan 10^7 - 10^8 CFU/ml, sistem *quorum sensing* mulai berjalan (Gram *et al.*, 1999). Dengan bekerjanya sistem *quorum sensing* maka *A. hydrophila* telah mampu memproduksi enzim eksoprotease. Dalam penelitian ini, penentuan kepadatan *A. hydrophila* yang mampu mencapai *quorum* dilakukan dengan cara membuat kurva standar *A. hydrophila*. Suspensi *A. hydrophila* diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm sehingga dihasilkan nilai OD yang kemudian dikorelasikan dengan jumlah bakteri pada hitungan cawan. Nilai OD dan jumlah bakteri dalam hitungan cawan dapat diikuti dalam Tabel 1.

Dari nilai OD dan jumlah bakteri hasil hitungan cawan, selanjutnya dibuat kurva standar *A. hydrophila*, sehingga didapatkan persamaan $Y = 2,947X + 5,7774$ yang diperoleh melalui analisis regresi linier sederhana (Gambar 1).

Berdasarkan kurva standar tersebut, kepadatan *A. hydrophila* sebesar 10^7 - 10^8 CFU/ml dicapai pada nilai OD lebih besar atau sama dengan 0,415. Dari hasil tersebut, maka inokulum yang digunakan untuk perlakuan adalah inokulum yang mempunyai nilai OD lebih besar atau sama dengan 0,415.

Produksi Enzim Eksoprotease *A. hydrophila* secara Kualitatif

Enzim eksoprotease merupakan enzim protease yang disekresikan oleh *A. hydrophila* ke lingkungan. Enzim eksoprotease ini merupakan faktor virulensi utama pada bakteri patogen sehingga perlu diturunkan produksinya. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dikontrol oleh suatu sistem komunikasi bakteri yang disebut sistem *quorum sensing*, dengan molekul sinyal berupa C4-HSL. Untuk menurunkan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat dilakukan dengan cara menghambat sistem *quorum sensing*-nya.

Dalam penelitian ini, senyawa yang diduga mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila* adalah senyawa furanon dalam buah tomat. Senyawa furanon mempunyai struktur mirip dengan molekul sinyal C4-HSL sehingga berperan sebagai C4-HSL analog dan mampu mengganggu *quorum sensing*. Untuk mendapatkan senyawa yang terkandung dalam buah tomat, pada penelitian ini dilakukan ekstraksi bertingkat buah tomat menggunakan pelarut nonpolar, semipolar, dan polar yaitu n-heksan, etil asetat, dan metanol.

Uji kualitatif produksi enzim *A. hydrophila* dilakukan dengan metode titik (*spot plate*) pada media Luria Bertani (LB) Agar yang ditambah 2% susu skim dan pada perlakuan ditambah dengan ekstrak buah tomat dengan berbagai variasi konsentrasi. Inokulum yang digunakan adalah inokulum *A. hydrophila* yang telah mencapai kepadatan 10^7 dari hasil pembuatan kurva standar *A. hydrophila* (Gambar 1). Media Luria Bertani digunakan dalam uji kualitatif produksi enzim eksoprotease karena Luria Bertani mengandung

tripton (asam amino triptofan) sehingga dapat memacu aktivitas enzim proteolitik. Penambahan susu skim dimaksudkan untuk menunjukkan adanya produksi enzim eksoprotease melalui terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri *A. hydrophila*. Zona bening ini menunjukkan adanya aktivitas enzim eksoprotease yang menghidrolisis ikatan peptida protein susu skim menjadi asam amino (Poernomo dan Purwanto, 2001). Penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kualitatif dapat diketahui dengan tidak adanya zona bening atau terjadinya pengurangan luas zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila*.

Apabila produksi enzim eksoprotease secara kualitatif terhambat oleh salah satu jenis ekstrak tanpa menghambat pertumbuhan bakteri maka dilanjutkan dengan uji kuantitatif produksi enzim eksoprotease untuk mengetahui persentase penurunan produksi enzim eksoprotease.

Produksi Enzim Eksoprotease *A. hydrophila* pada Perlakuan Ekstrak n-heksan Buah Tomat (*L. esculentum*)

Pelarut n-heksan merupakan pelarut nonpolar yang digunakan untuk melarutkan senyawa nonpolar dalam buah tomat. Kandungan nonpolar dalam buah tomat antara lain likopen yang termasuk golongan karotenoid (Sauriasari, 2006). Ekstrak n-heksan buah tomat ditambahkan pada media Luria Bertani Agar dengan variasi konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, dan 8%. Pada semua konsentrasi ekstrak masih terdapat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila* yang menunjukkan adanya aktivitas enzim eksoprotease dalam menghidrolisis ikatan peptida susu skim. Berkurangnya zona bening diikuti juga dengan pengurangan koloni bakteri yang tumbuh (Gambar 2).

Bakteri tetap tumbuh yang ditunjukkan dengan diameter koloni *A. hydrophila* yang cukup besar dan mampu memproduksi enzim eksoprotease, terbukti dengan terukurnya luas zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila*. Diameter koloni *A. hydrophila* dan luas zona bening setelah perlakuan dengan ekstrak n-heksan buah tomat dapat dilihat pada Tabel 2.

Gambar 1. Kurva standar *A. hydrophila*.

Tabel 1. Nilai OD dan jumlah bakteri *A. hydrophila* pada hitungan cawan.

Jam ke-	Optical Density (OD)	Jumlah Bakteri/ml	Log Jumlah Bakteri
4	0,0697	$3,1 \times 10^5$	5,49136
6	0,5310	$1,6 \times 10^8$	8,21085
8	0,9040	$2,3 \times 10^8$	8,36173
10	1,1930	$9,9 \times 10^8$	8,99564

Tabel 2. Diameter koloni *A. hydrophila* dan luas zona bening pada perlakuan dengan ekstrak n-heksan tomat (*L. esculentum*).

Konsentrasi ekstrak	Rata-rata Diameter Koloni (cm)	Rata-rata Luas Zona Bening (cm ²)
Kontrol (0%)	0,467	0,429
2%	0,380	0,110
4%	0,425	0,149
6%	0,316	0,081
8%	0,250	0,077

Tabel 3. Diameter koloni *A. hydrophila* dan luas zona bening pada perlakuan dengan ekstrak etil asetat buah tomat (*L. esculentum*).

Konsentrasi ekstrak	Rata-rata Diameter Koloni (cm)	Rata-rata Luas Zona Bening (cm ²)
Kontrol (0%)	0,467	0,429
2%	0,483	0,322
4%	0,320	-
6%	0,233	-
8%	0,225	-

Keterangan: Tanda (-) menunjukkan tidak adanya zona bening di sekitar koloni bakteri.

Tabel 4. Diameter koloni *A. hydrophila* dan luas zona bening pada perlakuan dengan ekstrak metanol buah tomat (*L. esculentum*).

Konsentrasi ekstrak	Rata-rata Diameter Koloni (cm)	Rata-rata Luas Zona Bening (cm ²)
Kontrol (0%)	0,467	0,429
2%	0,367	0,264
4%	0,308	0,048
6%	0,236	-
8%	0,216	-

Keterangan : Tanda (-) menunjukkan tidak adanya zona bening di sekitar koloni bakteri.

Pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* mengalami penurunan, namun penurunan produksi enzim eksoprotease dan pertumbuhannya relatif kecil. Hal ini diduga karena senyawa-senyawa aktif nonpolar yang terkandung dalam ekstrak buah tomat tidak mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*. Ekstrak yang bersifat nonpolar menyebabkan ekstrak tersebut kurang larut dalam media LB Agar yang menggunakan pelarut air yang bersifat polar. Dalam ekstrak n-heksan buah tomat diduga senyawa furanon tidak terekstrak sehingga tidak

mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*, akibatnya perlakuan ekstrak n-heksan buah tomat ini tidak dilanjutkan pada pengukuran pertumbuhan bakteri dan pengujian kuantitatif aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

Produksi Enzim Eksoprotease *A. hydrophila* pada Perlakuan Ekstrak Etil Asetat Buah Tomat (*L. esculentum*)

Etil asetat merupakan pelarut semipolar yang digunakan untuk melarutkan senyawa nonpolar dalam buah tomat. Ekstrak etil asetat buah tomat ditambahkan pada media Luria Bertani Agar dengan variasi konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, dan 8%. Produksi enzim eksoprotease setelah penambahan ekstrak etil asetat buah tomat mengalami penghambatan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan. Hal ini dapat terlihat dari terbentuknya zona bening yang ada di sekitar koloni bakteri. Demikian juga dengan pertumbuhan *A. hydrophila*, semakin tinggi konsentrasi ekstrak, pertumbuhan *A. hydrophila* semakin terhambat. Adapun produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* setelah penambahan ekstrak etil asetat buah tomat dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan Gambar 3.B, apabila dilihat dari koloni bakteri yang tumbuh dan zona bening yang terbentuk dapat dikatakan bahwa pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease pada konsentrasi 2% relatif sama dengan pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease pada kontrol *A. hydrophila*. Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut belum mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*. Pada konsentrasi ekstrak 4% (Gambar 3.C) menunjukkan adanya penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* yang ditunjukkan dengan tidak adanya zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila* meskipun hanya terjadi sedikit penurunan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Sementara itu pada konsentrasi 6% (Gambar 3.D) dan 8% (Gambar 3.E) tidak memperlihatkan adanya zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila* yang menunjukkan tidak terdapatnya produksi enzim eksoprotease. Adanya penghambatan pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease secara rinci dapat dilihat dari hasil pengukuran diameter koloni dan luas zona bening pada Tabel 3.

Pada Tabel 3 terlihat bahwa pada kontrol dan perlakuan ekstrak etil asetat buah tomat sebesar 2%, diameter koloni cukup besar yaitu 0,467 dan 0,483 dengan diameter zona bening yang juga cukup besar. Berbeda dengan konsentrasi 4%, meskipun diameter koloni yang dihasilkan relatif besar ternyata tidak terdapat zona bening di sekitar koloni bakteri. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat buah tomat sebesar 4% mampu menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Terhambatnya produksi enzim eksoprotease pada pemberian ekstrak etil asetat buah tomat sebesar 4% diduga disebabkan oleh kandungan semipolar buah tomat mampu

menghambat *quorum sensing* *A. hydrophila*. Semakin besar konsentrasi ekstrak, semakin kecil diameter bakteri yang terbentuk. Hal ini terlihat pada konsentrasi ekstrak 6% dan 8% yang mempunyai diameter relatif kecil. Diameter koloni yang kecil tersebut menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*. Dengan demikian terjadinya penurunan produksi enzim eksoprotease disebabkan oleh adanya

penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*. Senyawa semipolar buah tomat diduga bersifat antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* sehingga menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Pada perlakuan ekstrak etil asetat buah tomat dengan konsentrasi 4% dilanjutkan pada uji pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.

Gambar 2. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada perlakuan ekstrak n-heksan buah tomat. 1 = Koloni bakteri, 2 = zona bening (zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan adanya produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*), a = kontrol (media LB Agar), b = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 2%, c = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 4%, d = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 6%, dan e = LB Agar ditambah ekstrak n-heksan buah tomat 8%.

Gambar 3. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada perlakuan ekstrak etil asetat buah tomat. 1 = Koloni bakteri, 2 = zona bening (zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan adanya produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*), a = kontrol (media LB Agar), b = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 2%, c = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 4%, d = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 6%, dan e = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 8%.

Gambar 4. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada perlakuan ekstrak metanol buah tomat. 1 = Koloni bakteri, 2 = zona bening (zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan adanya produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*), a = kontrol (media LB Agar), b = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 2%, c = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 4%, d = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 6%, dan e = LB Agar ditambah ekstrak n-heksan buah tomat 8%.

Produksi Enzim Eksoprotease *A. hydrophila* pada Perlakuan Ekstrak Metanol Buah Tomat (*L. esculentum*)

Metanol merupakan pelarut polar, sehingga mampu melarutkan senyawa furanon dalam tomat. Ekstrak metanol buah tomat diduga mengandung senyawa furanon yang mempunyai aktivitas sebagai penghambat sistem *quorum sensing* (*quorum sensing inhibitor*) sehingga mampu menghambat produksi enzim eksoprotease yang merupakan faktor virulensi *A. hydrophila*.

Ekstrak metanol buah tomat ditambahkan pada media Luria Bertani Agar dengan variasi konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, dan 8%. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada perlakuan ekstrak metanol buah tomat ini juga menunjukkan adanya penurunan. Semakin besar konsentrasi ekstrak yang ditambahkan, semakin kecil produksi enzim eksoprotease yang dihasilkan. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* setelah penambahan ekstrak metanol buah tomat dapat dilihat pada Gambar 4.

Dari Gambar 4.A dapat diketahui bahwa pada kontrol terjadi produksi enzim eksoprotease yang cukup besar yang ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila*. Pada konsentrasi 2% (Gambar 4.B) masih menunjukkan adanya produksi enzim eksoprotease, terlihat dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila*. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak 2% belum mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*. Pada konsentrasi ekstrak 4% (Gambar 4.C) masih menunjukkan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*, namun sangat sedikit dibandingkan dengan kontrol. Pada konsentrasi ekstrak 4%, tidak tampak adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri, sedangkan pada konsentrasi 6% (Gambar 4.D) dan 8% (Gambar 4.E), tidak terlihat adanya zona bening di sekitar koloni bakteri yang menunjukkan tidak terjadi produksi enzim eksoprotease. Koloni bakteri yang tumbuh relatif kecil yang menunjukkan terjadinya aktivitas penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*.

Berdasarkan hasil pengukuran diameter koloni bakteri dan luas zona bening seperti yang disajikan pada Tabel 4, dapat dilihat bahwa pada konsentrasi ekstrak 4%, produksi enzim eksoprotease relatif kecil, yaitu sebesar 0,048 cm², apabila dibandingkan dengan kontrol yang mempunyai luas zona bening 0,429 cm². Adanya penurunan produksi enzim eksoprotease tersebut tidak disertai dengan aktivitas penghambatan pertumbuhan, terlihat dari diameter zona bening yang relatif besar. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*.

Pada Tabel 4 juga menunjukkan bahwa pada konsentrasi 6% dan 8% tidak menunjukkan adanya produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*, namun disertai aktivitas penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*. Hal ini terlihat dari diameter koloni *A. hydrophila* yang kecil, sehingga terjadinya aktivitas penghambatan produksi enzim diduga disebabkan

oleh terhambatnya pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.

Gambar 5. Kurva pertumbuhan *A. hydrophila*. A = Kontrol negatif (media LB Broth), B = kontrol positif (media LB Broth + pelarut etil asetat 4%), C = kontrol positif (media LB Broth + pelarut metanol 4%), D = media LB Broth + ekstrak etil asetat buah tomat 4%, serta E = media LB Broth + ekstrak metanol buah tomat 4%.

Gambar 6. Kurva produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. A = Kontrol ditambah dengan pelarut metanol sebesar 4%, B = perlakuan dengan penambahan ekstrak metanol buah tomat sebesar 4%, serta C = kontrol.

Gambar 7. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada jam ke-4. A = Perlakuan ekstrak metanol buah tomat sebesar 4%, B = kontrol.

Penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada penelitian ini diduga disebabkan oleh adanya penghambatan sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*. Berdasarkan penelitian Swift *et al.* (1999), penghambatan *quorum sensing* dapat dilakukan dengan menambahkan senyawa analog C4-HSL pada kultur *A. hydrophila*. Penghambatan *quorum sensing* dapat dilakukan oleh senyawa yang mirip dengan molekul sinyal sebagai *quorum sensing inhibitors* (QSI). Pada perlakuan ekstrak metanol buah tomat yang telah dilakukan, senyawa yang diduga mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*, sehingga mampu menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*, adalah senyawa furanon dalam ekstrak buah tomat.

Dalam buah tomat, furanon terdapat dalam bentuk *furaneol* (4-hidroksi-2,5-dimetil-3-(2H)-furanon) (Buttery *et al.*, 2001). Berdasarkan hasil penelitian Rasmussen *et al.* (2000), halogen furanon yang merupakan metabolit sekunder dari makroalga laut *Delisea pulchra* mampu menghambat molekul sinyal *N-Butanoyl-L-Homoserine Lactone* pada *Serratia liquefaciens* sehingga menghambat motilitas *Serratia liquefaciens*.

Senyawa yang bertindak sebagai QSI mampu menghambat *quorum sensing* dalam konsentrasi yang relatif kecil (Hentzer and Givskov, 1999). Apabila diberikan dalam konsentrasi yang lebih besar, senyawa QSI bersifat sebagai antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Rasch *et al.*, 2004). Dalam penelitian ini terbukti bahwa pada konsentrasi 4%, senyawa dalam ekstrak metanol buah tomat mampu menurunkan produksi enzim eksoprotease tanpa menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Pada saat ekstrak metanol buah tomat diberikan pada konsentrasi lebih besar, yaitu 6% dan 8%, terjadi aktivitas penghambatan produksi enzim eksoprotease, namun disertai penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*. Dengan demikian, berdasarkan prinsip *quorum sensing inhibitors* (QSI) yang mampu menghambat faktor virulensi bakteri, dalam penelitian ini adalah produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*, tanpa menghambat pertumbuhan bakteri itu sendiri maka perlakuan yang dilanjutkan ke tahap pengujian produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif adalah ekstrak metanol buah tomat dengan konsentrasi 4%. Penelitian ini terfokus pada senyawa QSI, bukan pada antibakteri karena pada umumnya senyawa antibakteri mempunyai dampak negatif yaitu munculnya resistensi bakteri dan timbulnya strain bakteri yang baru, sehingga penggunaan senyawa antibakteri menjadi kurang efektif.

Pertumbuhan *A. hydrophila* pada Perlakuan Ekstrak Buah Tomat (*L. esculentum*)

Pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* setelah pemberian ekstrak buah tomat dapat diketahui dengan membuat kurva pertumbuhan. Pengukuran pertumbuhan digunakan untuk mengetahui bahwa aktivitas penghambatan produksi enzim

eksoprotease *A. hydrophila* tidak disebabkan oleh terhambatnya pertumbuhan *A. hydrophila*, namun disebabkan oleh terhambatnya sistem *quorum sensing* yang mengontrol sintesis enzim eksoprotease tersebut. Pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila* hanya dilakukan pada perlakuan yang menunjukkan penurunan produksi enzim eksoprotease secara kualitatif tanpa terhambat pertumbuhannya yaitu pada perlakuan ekstrak metanol buah tomat sebesar 4% dan ekstrak etil asetat tomat sebesar 4%.

Gambar 5 menunjukkan pertumbuhan *A. hydrophila* setelah perlakuan ekstrak metanol buah tomat sebesar 4% dan ekstrak etil asetat buah tomat sebesar 4%. Selain itu, dilakukan juga pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila* dengan penambahan pelarut etil asetat dan metanol ke dalam media LB cair untuk mengetahui pengaruh pelarut yang digunakan untuk mengekstrak buah tomat terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*. Secara umum, kurva pertumbuhan menunjukkan pertumbuhan bakteri yang terdiri dari fase lag, fase eksponensial, dan fase stasioner.

Berdasarkan Gambar 5, fase lag tidak begitu kelihatan. Hal ini diduga disebabkan bakteri sudah mampu beradaptasi dengan media cair yang digunakan. Pada fase lag, sel bakteri mengalami perubahan dalam komposisi kimiawi dan bertambah ukurannya, namun belum ada penambahan populasi bakteri. Pada fase eksponensial, terjadi penambahan massa sel dengan cepat (Pelzar and Chan, 1992). Fase eksponensial *A. hydrophila* pada penelitian ini berlangsung pada jam ke-0 sampai jam ke-10. Pada fase stasioner, terjadi penumpukan produk beracun dan terjadi kekurangan nutrient, sehingga beberapa sel mati, sedangkan sel-sel yang lain tetap tumbuh, sehingga jumlah sel hidup menjadi tetap (Pelzar and Chan, 1992). Pada penelitian ini fase stasioner berlangsung pada jam ke-12 sampai jam ke-24.

Pada perlakuan ekstrak metanol buah tomat sebesar 4% dan kontrol positif yang ditambah pelarut metanol, pertumbuhan *A. hydrophila* berlangsung dengan normal, tidak terjadi penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*, terlihat dengan nilai *Optical Density* (OD) yang relatif sama dengan kontrol. Sementara itu pada kontrol yang ditambah pelarut etil asetat, hasil yang diperoleh menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*. Etil asetat mengandung asam asetat. Asam mampu menyebabkan denaturasi protein sel bakteri, sehingga terjadi koagulasi protein sel bakteri dan akhirnya bakteri mati, kemudian sel bakteri menjadi menggumpal dan cenderung turun ke bawah dasar erlenmeyer saat pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila*. Pada perlakuan ekstrak etil asetat buah tomat sebesar 4%, terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Hal ini diduga terjadi akibat adanya kandungan senyawa semipolar dalam buah tomat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Sehubungan dengan terhambatnya pertumbuhan *A. hydrophila* setelah penambahan ekstrak etil asetat buah tomat sebesar 4% maka perlakuan ini tidak

dilanjutkan ke tahap uji kuantitatif aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

Penurunan Produksi Enzim Eksoprotease *A. hydrophila* secara Kuantitatif

Di dalam sel, jumlah enzim yang tersedia hanya sedikit, sehingga pengukuran kadar enzim dalam ekstrak jaringan akan menjadi sangat sulit. Oleh karena itu, pengukuran produksi enzim dalam suatu ekstrak jaringan atau cairan biologik lain dilakukan dengan mengukur aktivitas katalisis enzim. Jumlah molekul atau massa enzim yang ada sukar ditentukan, sehingga hasil pengukurannya dinyatakan dalam bentuk unit aktivitas enzim (Murray *et al.*, 1997).

Pengukuran produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif hanya dilakukan pada perlakuan yang menunjukkan penurunan aktivitas proteolitik pada uji kualitatif dan tidak menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Hal ini sesuai dengan prinsip *quorum sensing inhibitors* yang mampu menghambat ekspresi gen penyandi faktor virulen, tanpa menghambat pertumbuhan bakteri itu sendiri. Pada penelitian ini, hanya ekstrak metanol buah tomat 4% yang diuji secara kuantitatif aktivitas enzim eksoprotease.

Uji aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan *azocasein* sebagai substratnya. *Azocasein* akan dihidrolisis oleh enzim eksoprotease menjadi peptida dan asam amino yang akan membentuk warna apabila ditambah dengan NaOH. Intensitas warna yang terbentuk dapat diukur nilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm.

Produksi enzim eksoprotease setelah pemberian ekstrak metanol buah tomat sebesar 4% dibandingkan dengan kontrol untuk mengetahui persentase penurunan produksi enzim eksoprotease. Untuk memastikan bahwa penurunan produksi enzim eksoprotease disebabkan oleh kandungan senyawa dalam buah tomat dan bukan pelarut metanol, dilakukan juga uji aktivitas enzim eksoprotease secara kuantitatif pada media LB broth dengan penambahan pelarut metanol sebesar 4%. Adapun produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* selama 24 jam dapat dilihat pada Gambar 6.

Berdasarkan Gambar 6, produksi enzim eksoprotease sudah terdeteksi sejak jam ke-0. Hal ini terjadi karena kepadatan bakteri pada jam tersebut telah memenuhi *quorum* untuk berjalannya *quorum sensing A. hydrophila* (Gambar 5). Produksi enzim eksoprotease cenderung stabil setelah jam ke-12 (fase stasioner). Pada kontrol yang ditambah pelarut metanol tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan produksi enzim eksoprotease. Pelarut metanol tidak menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* karena metanol tidak mampu menghambat sistem *quorum sensing A. hydrophila*. Pada penelitian Rasmussen *et al.* (2005), pelarut metanol tidak menunjukkan aktivitas sebagai *quorum sensing inhibitors*.

Pada pemberian ekstrak metanol buah tomat, hasil yang diperoleh menunjukkan adanya penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* (Gambar 6). Produksi enzim eksoprotease pada perlakuan tersebut dibandingkan dengan kontrol untuk memperoleh persentase penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Pada kontrol, produksi enzim eksoprotease terbesar terjadi pada jam ke-4 dan hasil ini dianggap 100%, sehingga penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dihitung dengan membandingkan produksi enzim eksoprotease setelah pemberian ekstrak metanol buah tomat dengan kontrol pada jam ke-4. Persentase produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 7.

Penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada pemberian ekstrak metanol buah tomat 4% sebesar 71,68%. Adanya penurunan produksi enzim eksoprotease ini diduga disebabkan oleh adanya aktivitas senyawa furanon dalam ekstrak metanol buah tomat yang bertindak sebagai C4-HSL analog. Senyawa furanon mempunyai struktur mirip dengan C4-HSL sehingga berkompetisi dengan C4-HSL untuk berikatan dengan protein *LuxR* dan menghambat induksi gen penyandi enzim eksoprotease (Manifield *et al.*, 1999). Gao *et al.* (2003) dan Bauer and Robinson (2002) menyebutkan bahwa tanaman tomat mengeluarkan senyawa yang mampu meniru aktivitas molekul sinyal AHL pada sistem *quorum sensing* bakteri, dan mempunyai efek yang spesifik terhadap *quorum sensing* bakteri.

KESIMPULAN

Terjadi penurunan produksi enzim eksoprotease setelah pemberian ekstrak metanol buah tomat sebesar 4%. Ekstrak metanol buah tomat tersebut mampu menurunkan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* sebesar 71,68%, tanpa menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*.

DAFTAR PUSTAKA

- Afianto, E.A. dan E. Liviawaty. 1992. *Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Allan, B.J. and R.M. Stevenson. 1981. Extracellular virulence factors of *A. hydrophila* in fish infection. *Can. J. Microbiol.* 27: 1114-1122.
- Bauer, W.D. and J.B. Robinson. 2002. Disruption of bacterial quorum sensing by other organism. *Current Opinion Biotechnology* 13: 234-237.
- Buttery, R.G., G.R. Takeda, M. Naim, H. Rabinowitch, and Y. Nam. 2001. Analysis of furaneol in tomato using dynamic headspace sampling with sodium sulfate. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 4349-4351.
- Fryer, J.L. and J.L. Bartholomew. 1996. Established and emerging infectious disease of fish. *ASM News* 62: 592-594.
- Gao, M., M. Teplitski, J.B. Robinson, and W.D. Bauer. 2003. Production of substances by **Medicago**

- truncatula** that affect bacterial quorum sensing. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 16(9): 827-834.
- Gram, L., A.B. Christensen, L. Ravn, S. Molin, and M. Givskov. 1999. Production of acylated homoserine lactones by psychrotrophic members of the Enterobacteriaceae isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(8): 3458-3463.
- Hanlon, G. and N.A. Hodges. 1981. Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of **Bacillus licheniformis** on poorly utilized carbon and nitrogen sources. *J. Bacteriol.* 162(2): 427-431.
- Hentzer, M. and M. Givskov. 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infection. *J. Clint. Invest.* 112: 1300-1307.
- Lynch, M.J. 2002. The regulation of biofilm development by quorum sensing in **Aeromonas hydrophila**. *Environ. Microbiol.* 4: 18-28.
- Manefield, M., R. de Nys, N. Kumar, R. Read, M. Givskov, P. Steinberg, and S. Kjelleberg. 1999. Evidence that halogenated furanones from **Delisea pulchra** inhibit Acylated Homoserine Lactone (AHL) mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiol.* 145: 283-291.
- Martinelli, D., G.U. Sequin, H. Brandl, R. Bachosen. 2004. Effect of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in **Chromobacterium violaceum**. *BMC Microbiol.* 4: 25.
- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell. 1997. *Biokimia* (Diterjemahkan oleh: Hartono, A.). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Noga, E.J. 1995. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company.
- Pelzar, J.M. and E.C.S. Chan. 1992. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Purnomo, A.T. dan D.A. Purwanto. 2001. *Karakterisasi Enzim Proteolitik Bacillus subtilis FNCC 0059*. Surabaya: Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.
- Rasch, M., C. Buch, B. Austin, W.J. Slierendrecht, K.S. Ekmann, J.L. Larsen, C. Johansen, K. Riedel, L. Eberl, M. Givskov, and L. Gram. 2004. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortality caused by vibriosis in rainbow trout (**Oncorhynchus mykiss**, Walbaum). *Syst. Appl. Microbiol.* 24(3): 350-359.
- Rasmussen, T.B., M. Manefield, J.B. Anderson, L. Eberl, U. Anthoni, C. Christophersen, P. Steinberg, S. Kjelleberg, and M. Givskov. 2000. How **Delisea pulchra** furanones affect quorum sensing and swarming motility in **Serratia liquefaciens** MG1. *Microbiol.* 146: 3237-3244.
- Rasmussen, T.B., T. Bjarnsholt, M.E. Skindersoe, M. Hentzer, P. Kristoffersen, M. Kote, J. Nielson, L. Eberl, and M. Givskov. 2005. Screening for quorum sensing inhibitors by use of a novel genetic system the quorum sensing selector. *J. Bacteriol.* 185(5): 1755-1814.
- Sauriasari, R. 2006. Mengenal dan menangkal radikal bebas. *Berita Iptek*. www.beritaiptek.com.
- Secades, D. and J.A. Guijarro. 1999. Purification and characterization of an extracellular proteases from fish pathogen **Yersinia ruckeri** and effect of cultures condition and production. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9): 3969-3975.
- Swift, S., A.V. Karlyshev, L. Fish, E.L. Durant, M.K. Winson, S.R. Chhabra, P. Williams, S. Macintyre, and G.S. Stewart. 1997. Quorum sensing in **Aeromonas hydrophila** and **Aeromonas salmonicida** identification of the *LuxRI* homologs and *AsaRI* and their cognate N-acyl homoserine lactone signal molecules. *J. Bacteriol.* 179(17): 5271-5281.
- Swift, S., M.J. Lynch, L. Fish, D.F. Leink, J.M. Thomas, C.J.A.B. Stewart, P. Williams. 1999. Quorum sensing-dependent regulation and blockade of eksoprotease production in **Aeromonas hydrophila**. *Infect. Immun.* 4: 18-28.
- Taga, M.E. and B.L. Bassler. 2003. Chemical communication among bacteria. *PNAS* 100(2): 14549-14554.