

Uji aktivitas antibakteri ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*

In vitro testing of antibacterial activity of extracts of seed cardamom (*Amomum compactum*) against by *Aeromonas hydrophila*

SISKA DYAH KUSUMA PUTRI, ARI SUSILOWATI, RATNA SETYANINGSIH

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36a Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 29 Mei 2015. Revisi disetujui: 29 Mei 2012.

Abstract. Putri SDK, SusiLOWATI A, Setyaningsih R. 2016. *In vitro* testing of antibacterial activity of extracts of seed cardamom (*Amomum compactum*) against by *Aeromonas hydrophila*. *Biofarmasi* 14: 10-18. One of the obstacles that hinder the cultivation of common freshwater fish is the presence of pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*. These bacteria cause Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS). One effort against MAS on freshwater fish is the use of cardamom seed (*Amomum compactum*). The purpose of this study was to know the antibacterial activity and get the minimum concentration of cardamom seed extract that was able to inhibit *A. hydrophila* *in vitro*. Cardamom seed extraction was done by stratified maceration using three solvent, i.e., n-hexane, ethyl acetate, and methanol. Antibacterial activity was conducted using disc diffusion method with 100% concentration for each extract, solvents, only bacteria culture without the extract as negative control and positive control for chloramphenicol 3,4%. Minimum Concentration Inhibitory test (MIC) performed using extracts of the most widespread inhibitory zone. The extract concentrations tested 5,71%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,34%, 0,17%(b/v), and 0% as a negative control, while the antibiotic chloramphenicol as a positive control. Data analyzed using Analysis of Variance test (ANOVA) and Duncans Multiple Range test (DMRT) level of 5%. Cardamom seed extracted with n-hexane, ethyl acetate and methanol as a solvent were 11,1 g, 10 g, and 15,1 g extract respectively. Inhibition zone of 100% cardamom seed extract with the solvent n-hexane, ethyl acetate, and methanol were 5,25 mm, 6,25 mm and 5,75 mm respectively. MIC values in the ethyl acetate extract of *A. hydrophila* were 2,70%.

Keywords: *Amomum compactum*, antibacterial, cardamom seed extract, *Aeromonas hydrophila*, *in vitro*

PENDAHULUAN

Potensi budidaya ikan air tawar cukup besar yaitu sekitar 10 ton/tahun. Pada tahun 2006, ekspor perikanan budidaya di Indonesia mencapai 1.329 juta ton. Nilainya mencapai US \$21 miliar atau sekitar Rp. 18,9 triliun (Pasaribu 2006).

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* merupakan salah satu penyakit ikan yang utama di Indonesia. Selain menyerang ikan juga dapat menyerang manusia, meskipun kasus yang terjadi masih langka (Noorastuti 2012). Pada tahun 1980, wabah penyakit yang disebabkan *A. hydrophila* menyebabkan kematian 82.288 ikan di Jawa Barat. Pada tahun 2005, sebanyak 47 ton ikan gurame dan 2,1 juta ekor benih gurame yang siap dipasarkan mati disebabkan oleh penyakit yang disebabkan *A. hydrophila* di Lubuk Pandan, Sumatera Barat (Zainal 2009).

Metode yang banyak digunakan untuk menanggulangi penyakit pada ikan budidaya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik. Penggunaan terapi kimiawi dan antibiotik untuk penanganan penyakit ikan pada akuakultur telah mendapatkan kritikan tajam (FAO 2005). Penanganan yang dilakukan di tingkat petani bergantung pada antibiotik seperti oksitetrasiklin dan hijau malachite (Jangkaru 2007). Penggunaan antibiotik secara berlebihan

dan jenis antibiotik yang tidak tepat mengakibatkan adanya galur resisten dari bakteri *A. hydrophila* dalam budidaya ikan, serta bau antibiotik yang mencemari perairan (Mohammad dan Abasali 2010).

Resistensi bakteri terhadap obat-obatan merupakan salah satu proses alamiah yang dilakukan oleh organisme untuk mengembangkan toleransi terhadap keadaan lingkungan yang baru (Skou dan Jensen 2007). Pada penelitian Kaskhedikar dan Chhabra (2010), cara pengobatan dengan menggunakan kombinasi berbagai antibiotik dapat menimbulkan masalah resistensi yaitu munculnya bakteri yang multiresisten terhadap antibiotik seperti pada isolat *A. hydrophila* yang resisten terhadap antibiotik ampicilin dan kolistin (Tjay dan Rahardja 2002). Meskipun demikian penggunaan antibiotik tidak bisa 100% ditinggalkan sehingga bahan alam bisa digunakan sebagai pengobatan alternatif.

Motile Aeromonas Septicemia (MAS) atau *penyakit merah*, merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *A. hydrophila*. MAS merupakan penyakit bakterial yang bersifat akut, menginfeksi semua umur dan semua jenis ikan air tawar baik yang dibudidayakan seperti: ikan mas, lele, patin, nila, dan gurame maupun ikan yang ada di perairan umum. Tingkat kematian akibat penyakit tersebut dapat mencapai 80% dalam periode yang relatif singkat dengan kerugian ekonomi yang signifikan. Gejala klinis

akibat infeksi bakteri tersebut antara lain: warna tubuh pucat, *haemorrhagic septicemia* atau pendarahan yang meluas di seluruh permukaan tubuh, luka/borok (*ulcer*), perut busung (*dropsy*), sisik terkuak, dan luka pada sirip disertai kematian. Komisi Kesehatan Ikan dan Lingkungan Nasional pada tahun 2006 telah menetapkan jenis penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *A. hydrophila* sebagai salah satu penyakit ikan utama di Indonesia (Choudhury et al. 2006).

Indonesia merupakan negara kaya dengan tumbuhan yang berkhasiat untuk obat. Penggunaan tumbuhan sebagai obat telah dikenal sejak zaman nenek moyang dan telah diwariskan secara turun-temurun (Oswald 1995). Banyak jenis bahan alam mengandung senyawa yang bersifat antibakteri. Sejumlah bahan alam mengandung senyawa bersifat bakterisidal (pembunuh bakteri), dan bakteristatik (penghambat pertumbuhan bakteri). Bahan alam untuk obat banyak diperoleh di pekarangan rumah dan mudah dikerjakan oleh siapa saja dalam keadaan yang mendesak sekalipun. Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi modern ternyata tidak mengesampingkan begitu saja peranan bahan alam tetapi justru saling melengkapi. Hal ini terbukti dari banyaknya peminat bahan alam (Solikhah 2009).

Pemakaian ekstrak biji kapulaga sebagai antibakteri pada ikan belum banyak digunakan dan besarnya aktivitas antibakteri dari bahan-bahan tersebut belum banyak diketahui. Untuk itu perlu dilakukan penelitian tentang antibakteri ekstrak kapulaga terhadap *A. hydrophila* secara *in vitro*. Berdasarkan penelitian Maipiliandari et al. (2008), ekstrak kapulaga memiliki kemampuan menghambat aktivitas bakteri gram negatif yaitu *E. coli* dengan menghasilkan zona hambat sebesar 8,0 mm untuk konsentrasi 250 mg/mL. Permintaan buah kapulaga ini sangatlah laku keras di pasaran Indonesia. Permintaan buah kapulaga untuk obat di Indonesia tahun 1978 sebanyak 97 ton, dan 1979 sebanyak 142 ton. Pada tahun 2006, ketika panen raya pada bulan Juni-Agustus, permintaan melonjak menjadi 3 ton per hari (Yajri 2009).

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah mengetahui besarnya aktivitas antibakteri dari ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap *A. hydrophila* secara *in vitro* dan mengetahui konsentrasi minimum ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) yang mampu menghambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2011 sampai Maret 2012 bertempat di Laboratorium Biologi FMIPA dan Sub Laboratorium Biologi, UPT Laboratorium MIPA Pusat, Universitas Sebelas Maret Surakarta, Jawa Tengah.

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam biakan murni *Aeromonas hydrophila* dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta, Biji kapulaga (*Amomum compactum*) yang

telah diidentifikasi di Balai Besar Penelitian Tanaman Obat dan Obat Tradisional (BBPTO-OT) Tawangmangu Karanganyar, Jawa Tengah; *Trypticase Soy Broth* (TSB) dan *Trypticase Soy Agar* (TSA); pelarut aquades, *Carboxyl Methyl Cellulose* (CMC), metanol, etil asetat dan n-heksana; cakram kertas, dan kloramfenikol.

Alat yang digunakan untuk membiakan bakteri: erlenmeyer 50 mL, tabung reaksi, *shaker*, *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator, cawan petri, bunsen burner, jarum ose, mikropipet 100 μ L-1000 μ L dan mikropipet 20 μ L-200 μ L. Alat yang digunakan untuk ekstraksi: blender, toples maserasi, oven, corong pisah, erlenmeyer, dan *rotary evaporator*. Alat yang digunakan untuk uji penghambatan dengan pengukuran zona bening: jangka sorong, cawan petri, mikropipet 100 μ L-1000 μ L dan mikropipet 20 μ L-200 μ L. Alat yang diperlukan untuk penentuan MIC: Seperangkat alat spektrofotometer, dan tabung reaksi.

Cara kerja

Pembuatan serbuk biji kapulaga

Biji kapulaga dicuci bersih, dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung. Biji kapulaga yang sudah kering dihaluskan menjadi serbuk dan disimpan dalam wadah tertutup. Serbuk digunakan untuk pembuatan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol.

Pembuatan ekstrak kapulaga

Menurut Harmani et al. (2001), ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi bertingkat dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol yang masing-masing bersifat non polar, semi polar, dan polar. Serbuk kapulaga 550 g dilarutkan dalam n-heksana sampai terendam semua ($\pm 2,5$ L), dikocok dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya. Selanjutnya, ampas dilarutkan dengan pelarut etil asetat sampai terendam semua ($\pm 2,5$ L), dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya. Selanjutnya, ampas dilarutkan dengan pelarut metanol sampai terendam semua ($\pm 2,5$ L), dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Masing-masing filtrat dipekatkan dengan cara dievaporasi dengan suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak agak kental. Ekstrak agak kental diuapkan untuk menghilangkan pelarut dan diperoleh ekstrak yang lebih kental. Konsentrasi ekstrak dibuat dengan menambahkan CMC 0,1% sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan.

Penyiapan media untuk pertumbuhan bakteri

Komposisi TSB: *peptonase from casein* 17,0 g, *peptone from soymeal* 3,0 g, D(+) glukosa 2,5 g, sodium chloride 5,0 g, dipotassium hydrogen fosfat 2,5 g, aquades 1000 mL pH akhir 7,3. TSA: TSB ditambahkan *agar bacteriological*. Media TSB dan TSA yang akan digunakan untuk menumbuhkan bakteri beserta peralatan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm.

Pembuatan kurva standar *A. hydrophila*

Hubungan antara nilai absorbansi dan jumlah bakteri per mL didapatkan melalui pembuatan kurva standar

dengan menentukan plot antara nilai absorbansi dan nilai hitung cawan. Sebanyak 1 ose biakan bakteri *A. hydrophila* ditumbuhkan dalam 10 mL media TSB digoyangkan di atas *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam sampai media menjadi keruh. Kemudian, 5 mL biakan bakteri tersebut dipindahkan ke dalam 5 mL media TSB, dilakukan pengenceran berseri sebanyak 5 tabung yang berisi media TSB sehingga diperoleh perbandingan 1: 1/2: 1/4: 1/8: 1/16. Masing-masing tabung reaksi yang berisi media dan biakan bakteri diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Setelah diketahui nilai OD, 1 mL biakan bakteri ditumbuhkan ke dalam 9 mL garam fisiologis 0,85% dalam tabung reaksi dan dihomogenkan dengan *vortek* (pengenceran 10^{-1}). Biakan bakteri diambil 1 mL dari pengenceran 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam garam fisiologis 9 mL dalam tabung reaksi lain (pengenceran 10^{-2}). Seri pengenceran dibuat sampai pengenceran 10^{-5} . Masing-masing biakan dalam tabung reaksi diambil 100 μ L biakan bakteriditetskan pada media TSA dalam cawan petri dan diratakan dengan batang kaca penyebar selama 48 jam kemudian diinkubasi dengan suhu 29°C. Setiap pengenceran diambil 2 kali untuk ditumbuhkan pada cawan petri yang berbeda (2 ulangan). Metode yang digunakan adalah *spread plate*. Jumlah bakteri dihitung jika jumlah koloni yang tumbuh antara 30-300. Jika yang memenuhi syarat 30-300 ada dua tingkat pengenceran maka jika perbandingan lebih dari atau sama dengan 2: 1, dipilih pengenceran yang lebih dulu. Jika perbandingan kurang dari 2: 1, hasilnya dirata-rata. Jika ada kontaminasi yang menutupi lebih dari separuh petri, koloni dalam cawan tersebut tidak dapat dihitung. Jumlah sel per mL dihitung dengan cara membagi jumlah koloni dengan faktor pengenceran dan volume suspensi yang disebar. Kurva standar dapat diperoleh dengan nilai regresi $y = bx + a$, dengan y = nilai absorbansi, x = jumlah sel bakteri.

Pembuatan kurva pertumbuhan *A. hydrophila*

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui fase log bakteri sehingga dapat diketahui waktu yang tepat yaitu fase log untuk melakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *A. hydrophila*. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan cara memindahkan satu ose biakan bakteri ke dalam 10 mL media TSB kemudian digoyangkan di atas *shaker* dengan kecepatan 120 rpm dalam suhu 29°C selama 24 jam. Setelah inkubasi 24 jam, 5 mL biakan bakteri tersebut dipindahkan dalam 95 mL media serupa dan diukur nilai absorbansi setiap 2 jam selama 24 jam pada panjang gelombang 595 nm dengan menggunakan spektrofotometer sehingga didapatkan nilai *optical density* (OD). Media steril digunakan sebagai blangko. Kurva pertumbuhan ditentukan dengan plot antara waktu dan log jumlah bakteri per mL (Grandiosa 2010).

Penyiapan biakan bakteri

Satu ose bakteri *A. hydrophila* ditumbuhkan di media TSB 10 mL, digoyangkan dengan *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam, kemudian 5 mL suspensi bakteri tersebut dipindahkan ke dalam 95 mL media TSB, sehingga diperoleh volume 100 mL biakan bakteri. Biakan bakteri yang digunakan untuk uji aktivitas penghambatan

adalah biakan bakteri pada fase log dengan kepadatan 10^6 - 10^8 cfu/mL ditentukan berdasarkan nilai OD yang didapatkan dari kurva standar.

Uji penghambatan dengan metode difusi cakram

Bulatan cakram kertas berdiameter 5 mm ditetesi dengan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol masing-masing dengan konsentrasi 100%, pelarut n-heksana, etil asetat, metanol, CMC 0,1%, biakan bakteri sebagai kontrol negatif dan kloramfenikol 3,4% yang digunakan sebagai kontrol positif. Cakram kertas ditetesi dengan larutan uji, dikeringanginkan kemudian ditetesi kembali dengan ekstrak sampai ekstrak yang terserap sebanyak 5 μ L. Dengan pinset steril, bulatan cakram kertas yang telah kering tersebut dilekatkan dalam media TSA dalam cawan petri yang sebelumnya telah diinokulasi dengan 0,1 mL suspensi bakteri dengan kerapatan sekitar 10^8 sel/mL. Kemudian biakan disimpan dalam lemari pendingin selama \pm 2 jam agar proses difusi ekstrak kapulaga berjalan dengan baik. Setelah itu, keseluruhan cawan petri diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 jam. Pengujian ini dilakukan dengan empat ulangan. Pengamatan penghambatan pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengukur diameter zona jernih di sekitar cakram kertas dengan menggunakan jangka sorong yang merupakan diameter zona penghambatan (Brooks dan Morse 2005). Ekstrak yang menunjukkan diameter zona penghambatan paling besar terhadap pertumbuhan bakteri kemudian diujikan lebih lanjut.

Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Percobaan MIC dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimal ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri setelah dikontakkan dengan ekstrak dengan beberapa konsentrasi kemudian diinkubasi selama 24 jam. Konsentrasi ekstrak ditentukan berdasarkan hasil uji penghambatan metode difusi. Ekstrak biji kapulaga yang paling luas zona penghambatannya dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi 5,41%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,35%, 0,17% (b/v), dan 0% sebagai kontrol negatif, antibiotik kloramfenikol sebesar 3,4% sebagai kontrol positif. Nilai absorbansi ekstrak biji kapulaga dengan konsentrasi 5,41%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,35%, 0,17% (b/v), tanpa bakteri diukur dan digunakan sebagai pembanding. Penentuan MIC dilakukan dengan metode dilusi/pengenceran, media yang digunakan adalah TSB.

Sebanyak 10 mL TSB ditambahkan pada setiap tabung uji. Sejumlah 400 μ L ekstrak tiap konsentrasi dan 400 μ L kultur bakteri dengan kepadatan 10^7 - 10^8 cfu/mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi berbeda. Ekstrak masing-masing konsentrasi sebanyak 400 μ L ditambahkan dalam media TSB steril untuk digunakan sebagai pembanding. Perlakuan tersebut menggunakan lima ulangan. Pengamatan MIC dilakukan dengan melihat adanya kekeruhan pada media sebagai indikasi adanya pertumbuhan bakteri setelah 24 jam inkubasi pada suhu 29°C dan bila medianya bening diindikasikan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri.

Tabung reaksi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C dalam inkubator, selanjutnya dilakukan pengukuran

nilai OD dengan spektrofotometer (λ 595 nm) (Lukistyowati 2005). Apabila hasil pengukuran terhadap nilai MIC merupakan konsentrasi terendah pada ekstrak uji yang mana hasil penghambatan 100% terhadap pertumbuhan suatu organisme. Formulasi persentasi penghambatan: $1-(OD \text{ Uji}/OD \text{ kontrol})$ (Sherlock et al. 2010).

Analisis data

Analisis data meliputi secara statistik dengan Analysis of Variance (ANOVA) dan dilanjutkan uji Duncans Multiple Range Test (DMRT) taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komponen bioaktif pada biji kapulaga

Pemisahan komponen bioaktif biji kapulaga dengan menggunakan metode ekstraksi bertingkat dengan menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol. Maserasi 550 g berat kering biji kapulaga menghasilkan ekstrak kental sebanyak 2,018% menggunakan pelarut n-heksana, 1,188% menggunakan pelarut etil asetat, dan 2,745% menggunakan pelarut metanol dari massa awal. Ekstrak kental dari masing-masing pelarut dapat dilihat pada Tabel 1.

Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah n-heksana, etil asetat dan metanol. Ekstraksi dengan pelarut n-heksana ini dimaksudkan untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar alami terutama senyawa-senyawa lilin, minyak nabati dan sebagian minyak atsiri yang terkandung dalam biji kapulaga. Ekstraksi dengan pelarut etil asetat dimaksudkan untuk menarik senyawa-senyawa semi polar seperti alkaloid yang terkandung dalam biji kapulaga. Pelarut metanol digunakan untuk menarik senyawa-senyawa polar seperti fenolik, karbohidrat, asam amino dan protein yang terkandung dalam biji kapulaga. Proses maserasi perlu disertai dengan pengadukan agar terjadi interaksi yang merata antara cairan penyari dengan seluruh permukaan masing-masing serbuk dan maserat dapat lebih homogen. Pengadukan juga dapat menimbulkan sirkulasi sehingga ekstraksi dapat berlangsung optimal. Pelarut akan mengalir secara berulang-ulang ke dalam serbuk. Perpindahan pelarut dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah tidak terjadi apabila konsentrasi di dalam dan di luar sel dalam keadaan seimbang. Maserasi dengan n-heksana, etil asetat dan metanol dilakukan dalam waktu 24jam, dengan asumsi bahwa dengan rentang waktu tersebut senyawa yang diinginkan telah terambil.

Hasil maserasi biji kapulaga untuk pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol memiliki nilai rendemen yang tinggi jika dibandingkan dengan biji teratai dan agak rendah jika dibandingkan dengan daging biji kepel. Untuk rendemen maserasi biji teratai dengan pelarut n-heksana sebanyak 0,84%, etil asetat sebanyak 0,95% dan etanol sebanyak 7,34% (Fitrial et al. 2008). Untuk biji kepel (*Stelechocarpus buharol*) rendemen maserasi dengan pelarut metanol sebanyak 18,76% (Sumartini 2008). Jika dibandingkan dengan hasil maserasi biji belimbing dengan menggunakan pelarut metanol rendemennya hanya sekitar

1,41% (Sukadana 2009). Rendemen maserasi biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol lebih besar. Hasil rendemen maserasi untuk biji dan biji sangat kecil dibandingkan dengan maserasi bagian-bagian lain pada tumbuhan seperti daun atau akar. Perbedaan rendemen dari hasil maserasi dikarenakan perbedaan kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia dan kemampuan pelarut untuk mengambil kandungan senyawa aktif yang berada di dalam suatu simplisia.

Kurva standar *A. hydrophila*

Penentuan kepadatan *A. hydrophila* yang mampu mencapai aktivitas antibakteri dilakukan dengan membuat kurva standar *A. hydrophila*. Suspensi *A. hydrophila* diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm sehingga diperoleh OD yang kemudian dikorelasikan dengan jumlah bakteri pada hitung cawan Tabel 2. Nilai OD dan jumlah bakteri hasil hitungan cawan dan 10b) dibuat kurva standar *A. hydrophila* sehingga diperoleh persamaan $y = 1,625x - 11,83$ dapat dilihat pada Gambar 1.A.

Uji virulensi *A. hydrophila* melalui penyuntikan menunjukkan bahwa bakteri tersebut sangat virulen terhadap ikan nila dan menyebabkan infeksi pada kepadatan 10^6 cfu/mL, ikan uji telah mengalami kematian sebesar 50% dalam waktu 96 jam (Mangunwardoyo et al. 2010). Berdasarkan kurva standar tersebut, kepadatan *A. hydrophila* sebesar 10^7 - 10^8 cfu/mL dicapai pada nilai OD ≤ 1 .

Kurva pertumbuhan *A. hydrophila*

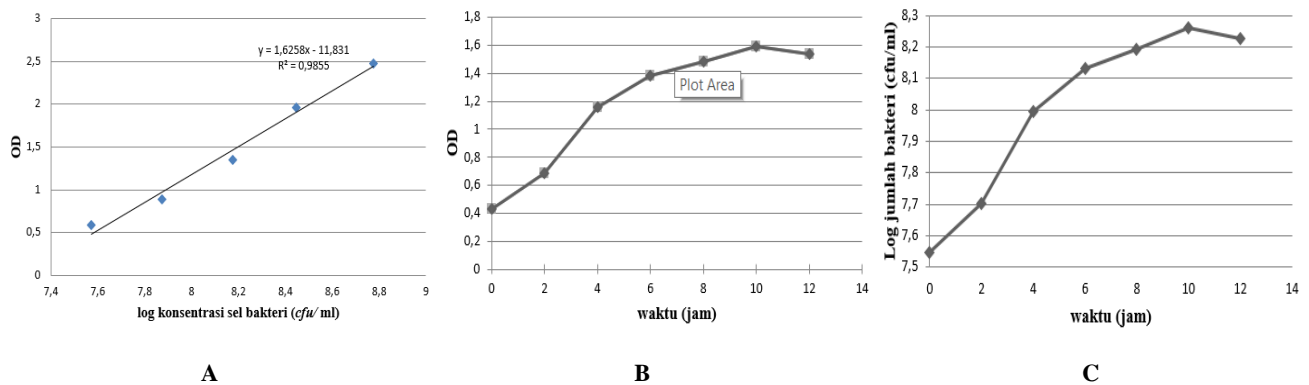
Pengukuran kurva pertumbuhan dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui fase log dari pertumbuhan bakteri yang nantinya akan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri. Pengukuran nilai OD *A. hydrophila* dilakukan pada panjang gelombang 595 nm dan dilakukan 2 jam sekali selama 24 jam. Dari pengukuran OD diperoleh kurva pertumbuhan seperti pada Gambar 1.B.

Tabel 1. Berat dan warna ekstrak yang dihasilkan dari ekstraksi bertingkat biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol

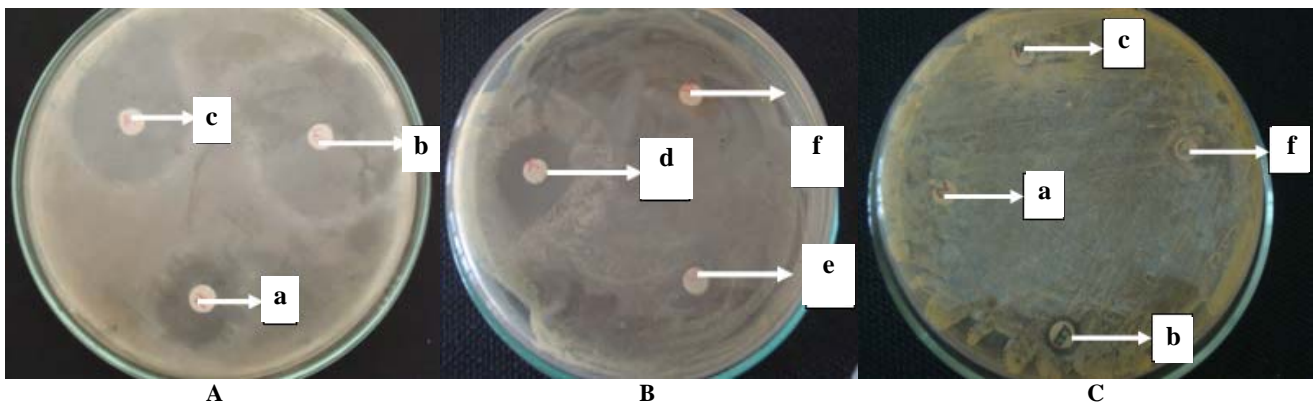
	Pelarut ($\pm 2,5$ L)		
	N-heksana	Etil asetat	Metanol
Berat ekstrak (g)	11,1 g	10 g	15,1 g
Warna ekstrak	Coklat kehitaman	Coklat kehitaman	Hitam Kecoklatan

Tabel 2. Nilai OD dan jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam hitung cawan

Pengenceran Tabung ke-	OD	Jumlah bakteri	Log jumlah bakteri
1	2,4724	6×10^8	8,778
2	1,9631	3×10^8	8,477
3	1,3510	$1,5 \times 10^8$	8,176
4	0,8876	$7,5 \times 10^7$	7,875
5	0,5846	$3,75 \times 10^7$	7,574



Gambar 1. A. Kurva Standar *A. hydrophila*, B. Kurva Pertumbuhan *A. hydrophila* selama 24 jam. C. Konsentrasi sel bakteri dalam waktu 24 jam



Gambar 2. Zona penghambatan antibakteri ekstrak biji kapulaga konsentrasi 100% terhadap bakteri *A. hydrophila*: a. Pelarut n-heksana, b. Pelarut etil asetat, c. Pelarut metanol, d. Pelarut kloramfenikol 3,4%, e. Tanpa perlakuan, f. Pelarut CMC 0,1%

Dari kurva pertumbuhan *A. hydrophila* dapat diketahui bahwa pada jam ke 10 terjadi kestabilan nilai OD karena telah memasuki fase stasioner. Berdasarkan kurva pertumbuhan ditentukan bahwa bakteri yang digunakan untuk inokulum berumur 6 jam dengan kepadatan $1,29 \times 10^8$ cfu/mL (Gambar 1.B-C). Menurut Schlegel dan Schmidt (1994), pada fase lag pertumbuhan bakteri berlangsung lambat karena bakteri harus mulai beradaptasi dengan medium baru.

Pada fase log pertumbuhan bakteri berlangsung cepat karena ketersediaan nutrisi yang cukup. Selanjutnya pada fase stasioner pertumbuhan jumlah bakteri semakin sedikit karena ketersediaan nutrisi yang semakin terbatas. Bakteri akan mengalami fase kematian setelah melewati fase 24 jam. Kondisi tersebut terkait dengan ketersediaan nutrisi dan lingkungan yang tepat untuk kehidupan bakteri tersebut (Purwoko 2007).

Selama masa pertumbuhan *A. hydrophila* yang ditumbuhkan dalam media akan mengeluarkan metabolit primer maupun sekunder yang dapat menurunkan kualitas nutrisi dalam media. Kondisi tersebut dapat mempengaruhi aktivitas dan patogenitas bakteri (Maturin dan Peller 1998).

Aktivitas antibakteri ekstrak biji kapulaga terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*

Ketahanan mikroorganisme terhadap suatu antibakteri dapat dilakukan dengan pengujian menggunakan antibiotik komersial. Metode ini dikembangkan oleh Kirby-Bauer dikenal dengan *Kirby-Bauer Disk Method*. Prinsip kerja metode ini yaitu kemampuan difusi antibiotik yang diberikan pada suatu cakram kertas untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji pada medium kultur (Atlas et al. 1984). Hasil uji antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona hambat oleh adanya pengaruh ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol biji kapulaga pada *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 2.

Ukuran zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram kertas pada mikroorganisme uji tergantung pada beberapa faktor. Faktor ini antara lain, adalah densitas dan viskositas medium kultur, kemampuan difusi antibiotik, konsentrasi antibiotik pada cakram kertas, sensitivitas mikroorganisme uji terhadap antibiotik dan interaksi antara antibiotik dan medium (Atlas et al. 1984).

Tabel 3. Diameter zona hambat antibakteri ekstrak biji kapulaga 100% terhadap bakteri *A. hydrophila* pada inkubasi selama 24 jam

Perlakuan	Diameter zona hambat (mm)
Pelarut n-heksana	0 ^a
Pelarut etil asetat	0,75 ^a
Pelarut metanol	0 ^a
Pelarut CMC 0,1%	0 ^a
Ekstrak n-heksana	5,25 ^b
Ekstrak etil asetat	7,00 ^c *
Ekstrak Metanol	5,75 ^b
Kloramfenikol 3,4%	5,5
Tanpa perlakuan	0

Keterangan: * : Diameter zona hambat terbesar. Angka-angka pada kolom yang sama yang didampingi oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak biji kapulaga yang diujikan memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*. Aktivitas penghambatan ini ditunjukkan dengan adanya zona hambat di sekeliling cakram kertas. Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* oleh ekstrak biji kapulaga pada berbagai pelarut dapat dilihat pada Tabel 3.

Menurut Davis dan Stout (1971) ketentuan kekuatan daya antibiotik-antibakteri sebagai berikut: daerah hambatan 20 mm atau lebih termasuk sangat kuat, daerah hambatan 10-20 mm kategori kuat, daerah hambatan berukuran 5-10 mm dikategorikan sedang, daerah hambatan 5 mm atau kurang termasuk kategori lemah.

Hasil pengukuran zona hambat menunjukkan bahwa ekstrak biji kapulaga dengan ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol memiliki daya hambat yang sedang terhadap bakteri *A. hydrophila* yaitu sekitar 5-6,25 mm setelah dikurangi dengan masing-masing pelarut. Namun, ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat memiliki daya hambat paling besar dibandingkan dengan ekstrak bijikapulaga dengan pelarut metanol yaitu sebesar 6,25 mm setelah dikurangi pelarut etil asetat. Sedangkan kloramfenikol mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* sebesar 5,5 mm. Hal ini diketahui dengan adanya zona bening pada biakan bakteri di cawan petri.

Penelitian Maipiliandri (2008) menyatakan bahwa ekstrak biji kapulaga memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri gram negatif. Biji kapulaga dengan pelarut metanol memiliki daya hambat sedang terhadap bakteri *E. coli* sebesar 8,0 mm untuk konsentrasi 250 mg/mL.

Ardiansyah (2007) mengatakan bahwa secara umum mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu gangguan pada senyawa penyusun dinding bakteri, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, menginaktivasi enzim, dan destruksi atau kerusakan fungsi material genetik.

Mekanisme pertama mengganggu pembentukan dinding sel, mekanisme ini disebabkan karena adanya akumulasi komponen lipofilat yang terdapat pada dinding atau membran sel sehingga menyebabkan perubahan komposisi

penyusun dinding sel. Terjadinya akumulasi senyawa antimikroba dipengaruhi oleh bentuk tak terdisosiasi. Mekanisme kedua bereaksi dengan membran sel, komponen bioaktif dapat mengganggu dan mempengaruhi integritas membran sitoplasma yang dapat mengakibatkan kebocoran materi intraseluler, mengakibatkan lisis sel dan menyebabkan denaturasi protein, penghambatan pembentukan protein sitoplasma dan asam nukleat, dan menghambat ikatan ATP-ase pada membran sel. Mekanisme kedua bereaksi dengan membran sel. Mekanisme ketiga menginvasi enzim, mekanisme yang terjadi menunjukkan bahwa kerja enzim akan terganggu dan mempertahankan kelangsungan aktivitas antimikroba, sehingga mengakibatkan enzim akan memerlukan energi dalam jumlah besar mempertahankan kelangsungan aktivitasnya. Akibatnya energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan menjadi berkurang sehingga aktivitas mikroba menjadi terhambat atau jika kondisi ini berlangsung lama akan mengakibatkan pertumbuhan mikroba terhenti (inaktif). Efek senyawa antimikroba dapat menghambat kerja enzim jika mempunyai spesifitas yang sama antara ikatan kompleks yang menyusun struktur enzim dengan komponen senyawa antimikroba. Mekanisme keempat menginaktivasi fungsi material genetik, komponen bioaktif dapat mengganggu pembentukan asam nukleat (RNA dan DNA), menyebabkan terganggunya transfer informasi genetik yang selanjutnya akan mengaktifasi atau merusak materi genetik sehingga terganggunya proses pembelahan untuk pembiakan.

Perbedaan zona hambat tersebut juga dapat disebabkan karena perbedaan spesies bakteri yang dijadikan percobaan serta perbedaan kandungan zat aktif yang diduga berperan sebagai zat antibakteri. Perbedaan zona hambat untuk antibiotik kloramfenikol dikarenakan kloramfenikol yang digunakan dalam penelitian ini bukan menggunakan kloramfenikol murni sehingga memiliki zonahambat yang berbeda jika menggunakan kloramfenikol murni, media yang digunakan pada penelitian sebelumnya berbeda dengan penelitian ini sehingga diperoleh hasil yang berbeda. Komposisi media yang berbeda menyebabkan perbedaan aktivitas dari bakteri.

Kloramfenikol sebagai kontrol positif dalam penelitian ini digunakan karena merupakan salah satu antibiotik yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan *A. hydrophila*. Kloramfenikol mampu bergabung dengan subunit ribosom sehingga menghambat sintesis protein (Brooks et al. 2005; Noga 2000).

Ekstrak kapulaga dengan pelarut etil asetat dengan luas zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut metanol dan n-heksana pada tingkat kepercayaan 95%. Perlakuan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut n-heksana dan metanol tidak berbeda nyata. Ekstrak etil asetat memberikan penghambatan tertinggi. Hal ini berarti senyawa yang paling baik untuk penghambatan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* adalah semi polar seperti alkaloid. Senyawa ini diduga sebagai senyawa antimikroba dikarenakan mempunyai sifat sebagai pengkhelat/pengikatan senyawa berefek spasmolitik. Efek spasmolitik dapat mengerutkan dinding sel *A. hydrophila*

sehingga sel bakteri terganggu permeabilitasnya. Selain itu senyawa alkaloid yang terkandung dalam biji kapulaga diperkirakan mempengaruhi hambatan terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*. Kemampuan senyawa semi polar untuk menghambat pertumbuhan berkaitan dengan komponen dinding sel bakteri yang tidak bersifat absolut hidrofobik maupun absolut hidrofilik. Kanazawa et al. (1995) menyatakan bahwa suatu senyawa antimikroba dengan bakteri diperlukan keseimbangan hidrofobik-hidrofilik. Di duga senyawa semi polar mempunyai afinitas lebih tinggi untuk berinteraksi dengan dinding sel, sehingga ekstrak semi polar lebih efektif menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* dari pada senyawa polar (metanol) dan nonpolar (n-heksana). Sifat hidrofilik diperlukan untuk menjamin senyawa dapat larut dalam fase air yang merupakan tempat hidup mikroba, tetapi senyawa yang bekerja pada membran sel yang hidrofobik memerlukan pula sifat lipofilik, sehingga senyawa antibakteri memerlukan keseimbangan hidrofobik-lipofilik untuk memperoleh aktivitas yang optimum.

Alkaloid dapat mengganggu bakteri dengan cara meracuni protoplasma, merusak dan menembus dinding sel serta mengendapkan protein. Komponen alkaloid juga dapat mendenaturasi enzim yang bertanggung jawab terhadap perkembangbiakan spora atau berpengaruh terhadap asam amino yang terlibat dalam perkembangbiakan. Senyawa alkaloid yang mampu menginaktivkan enzim esensial di dalam sel mikroba meskipun pada konsentrasi yang sangat rendah. Senyawa alkaloid mampu memutuskan ikatan peptidoglikan saat menerobos dinding sel. Ikatan peptidoglikan ini secara mekanis memberi kekuatan pada sel bakteri. Jenis bakteri yang digunakan adalah bakteri gram negatif dengan dinding sel terdapat peptidoglikan yang tipis atau sedikit sekali dan berada diantara selaput luar dan selaput dalam dinding sel. Dinding sel bakteri gram negatif mengandung fosfolipid, lipopolisakarida, dan lipoprotein. Setelah menerobos dinding sel, senyawa akan menyebabkan kebocoran isi sel dengan cara merusak ikatan hidrofobik yang berakibat meningkatnya permeabilitas membran. Terjadinya kerusakan pada membran sel mengakibatkan tekanan terhambatnya aktivitas dan biosintesis enzim-enzim spesifik yang diperlukan dalam reaksi metabolisme (Robinson 1991).

Kontrol berupa pelarut n-heksana, dan metanol tidak menunjukkan adanya zona hambat. Hal ini mengindikasikan bahwa kontrol yang digunakan tidak mempengaruhi hasil penelitian. Sedangkan pada pelarut etil asetat terdapat zona hambat meskipun tidak terlalu besar. Hal ini mengindikasikan bahwa kontrol yang digunakan mempengaruhi uji aktivitas antibakteri meskipun sedikit. CMC dalam penelitian sebagai pelarut tidak mempengaruhi hasil penelitian. CMC adalah derivat dari selulosa. CMC dapat diuraikan secara biologi oleh berbagai macam bakteri aerob maupun anaerob. Hasil penguraiannya berupa fragmen CMC yang lebih kecil dari gula. Selain itu, struktur molekul CMC terlalu besar untuk dapat menetrasi dinding sel bakteri. Ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat diujikan lebih lanjut untuk mengetahui besarnya nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Pengujian aktivitas antimikroba dari ekstrak etil asetat biji kapulaga dengan menggunakan metode kontak langsung antara bakteri *A. hydrophila* dengan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat. Metode MIC ini digunakan untuk mendapatkan nilai MIC dari suatu ekstrak antimikroba. Uji MIC menggunakan metode dilusi/pengenceran.

Uji MIC didefinisikan sebagai nilai terendah dari konsentrasi antimikroba yang akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme setelah diinkubasi 24 jam. MIC digunakan sebagai petunjuk konsentrasi antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba dan juga memberi petunjuk mengenai dosis yang diperlukan dalam pengobatan penyakit (Andrews 2001). Penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri ditandai dengan media yang jernih ditetapkan sebagai MIC. Berdasarkan Sherlock et al. (2010), pengamatan terhadap nilai MIC dengan menggunakan nilai absorbansi merupakan konsentrasi terendah pada ekstrak uji yang mana hasil penghambatan 100% terhadap pertumbuhan suatu organisme. Formulasi persentase penghambatan: $1 - (OD \text{ Uji} / OD \text{ kontrol})$.

Nilai MIC dipengaruhi oleh bakteri uji yang digunakan, jumlah inokulum yang digunakan, komposisi dari kultur media, waktu inkubasi, kondisi inkubasi seperti suhu, pH, dan aerasi. Nilai MIC dilihat dari tingkat kekeruhan tabung dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.

Uji penghambatan ekstrak biji kapulaga terhadap *A. hydrophila* dengan melihat tingkat kekeruhan media, untuk ekstrak 5,41%, 2,70%, 1,35%, dan kloramfenikol dapat menghambat bakteri ditunjukkan dengan gejala bening pada media. Untuk ekstrak konsentrasi 0,68%, 0,34% dan 0,17% menunjukkan gejala kekeruhan (Gambar 4). Tabung reaksi ekstrak tanpa bakteri dan media tidak ada yang menunjukkan gejala kekeruhan yaitu pada ekstrak 5,41%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,34% dan 0,17%. Semua konsentrasi menunjukkan gejala bening. Hal ini disebabkan karena konsentrasi ekstrak dengan tidak terkontaminasi bakteri lain dan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Pengamatan ini digunakan sebagai pembandingan dengan pengamatan uji penghambatan ekstrak biji kapulaga terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*.

Berdasarkan pengamatan ini konsentrasi ekstrak 1,35% dapat dijadikan nilai MIC yang menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Selanjutnya untuk memastikan nilai MIC dilakukan spektrofotometri. Nilai absorbansi menunjukkan besarnya cahaya dalam spektrofotometer yang diserap oleh sel dalam kuvet, yang berbanding lurus dengan jumlah sel tersebut. Hasil pengukuran nilai absorbansi ekstrak biji kapulaga terhadap *A. hydrophila* dapat dilihat pada Tabel 4.

Pertumbuhan bakteri dapat diketahui dengan adanya kekeruhan pada media. Jumlah bakteri dapat diukur dengan cara mengetahui kekeruhan (turbiditas) kultur. Semakin keruh suatu kultur, semakin banyak jumlah selnya. Cahaya yang dipancarkan pada spektrofotometer akan mengenai sel sehingga sebagian cahaya akan diserap dan sebagian lagi diteruskan. Banyaknya cahaya yang diabsorpsi sebanding dengan banyaknya sel bakteri pada batas-batas tertentu (Purwoko 2007).

Tabel 4. Nilai absorbansi pada kontrol

Perlakuan	OD	Persentase penghambatan
Kloramfenikol 3,4%	0,2592	85,94%
Bakteri	1,8436	-

Keterangan: Angka-angka pada kolom yang sama yang didampingi oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%.

Tabel 5. Nilai absorbansi pada uji MIC ekstrak etil asetat biji kapulaga terhadap bakteri *A. hydrophila*

Konsentrasi Ekstrak	Perlakuan (OD)		Selisih (OD)	Persentase penghambatan	Aktivitas
	Bakteri	Tanpa bakteri			
5,41%	0,1417	0,1415	0,0002	99,96% ^a	Menghambat
2,70%	0,1677	0,1638	0,0039	99,78% ^a	Menghambat
1,35%	0,2124	0,1365	0,0759	95,87% ^b	-
0,68%	0,3333	0,1300	0,2033	88,96% ^c	-
0,34%	0,8386	0,1245	0,7141	61,26% ^d	-
0,17%	1,6559	0,1238	1,5321	16,89% ^e	-

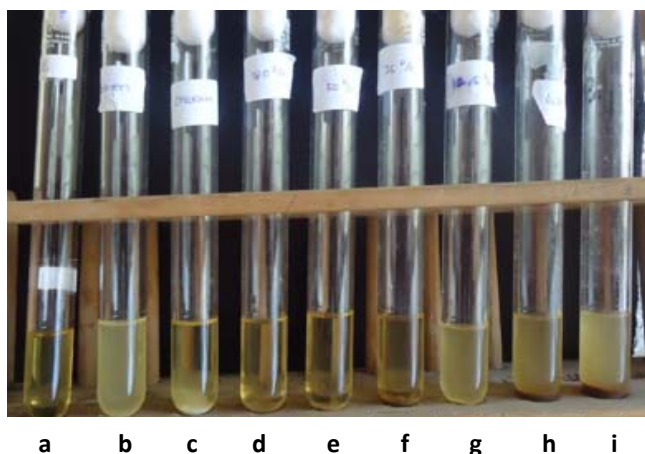
Nilai MIC ditentukan berdasarkan dari konsentrasi terendah dengan nilai OD yang paling kecil. Nilai OD yang terkecil menyatakan adanya penurunan nilai absorbansi yang berarti terjadi penurunan jumlah sel setelah inkubasi. Nilai OD terbesar menunjukkan adanya peningkatan nilai absorbansi yang masih terdapat pertumbuhan bakteri. Masih adanya pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa pada konsentrasi ekstrak tersebut belum dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan pengamatan OD

konsentrasi ekstrak 2,70% dapat dijadikan nilai MIC yang menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* karena konsentrasi minimal yang memiliki persentase penghambatan 100%.

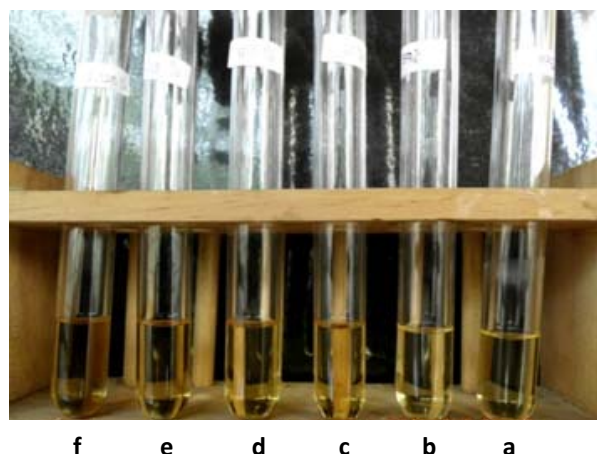
Ekstrak kapulaga dengan pelarut etil asetat dengan konsentrasi 1,35%, 0,68%, 0,34% dan 0,17% berbeda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada tingkat kepercayaan 95%. Perlakuan ekstrak 5,41% dan 2,70% sebanding atau tidak beda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada tingkat kepercayaan 95%. Perlakuan ekstrak 5,41% dan 2,70% berbeda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada tingkat kepercayaan 95% terhadap ekstrak 1,35%, 0,68%, 0,34% dan 0,17% (Tabel 5). Hasil pengukuran OD nilai MIC biji kapulaga terhadap pertumbuhan *A. hydrophila* tercapai pada konsentrasi 2,70%.

Aktivitas bakteriostatik ekstrak etil asetat biji kapulaga dinyatakan dalam nilai MIC, yaitu pada konsentrasi minimal yang menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri. Ekstrak etil asetat biji kapulaga dengan konsentrasi 2,70% lebih baik jika dibandingkan dengan kloramfenikol. Kloramfenikol memiliki persentase penghambatan 85,94% sedangkan ekstrak etil asetat biji kapulaga dengan konsentrasi 2,70% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* sebanyak 99,78%.

Jika dibandingkan dengan nilai MIC ekstrak tanaman lain, seperti ekstrak etil asetat bunga kecombrang nilai MIC ekstrak terhadap *E. coli* dan *S. typhimurium* adalah 4 mg/mL (Naufalin 2005) dan ekstrak jintan hitam terhadap *A. hydrophila* adalah 1000 ppm atau 1 mg/mL (Grandiosa 2010). Nilai MIC pada penelitian ini adalah 2,70%. Nilai MIC pada ekstrak biji kapulaga dapat tercapai jika ekstraknya lebih banyak. Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan spesies bakteri yang dijadikan percobaan serta perbedaan kandungan zat aktif yang diduga berperan sebagai zat antibakteri.



Gambar 3. Keekeruhan media pada uji MIC biji kapulaga dengan pelarut etil asetat terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*: a. Media, b. Tanpa perlakuan, c. Kloramfenikol, d. Ekstrak 5,41%, e. Ekstrak 2,70%, f. Ekstrak 1,35%, g. Ekstrak 0,68%, h. Ekstrak 0,34%, i. Ekstrak 0,17%



Gambar 4. Media dan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat tanpa bakteri: a. Ekstrak 5,41%, b. Ekstrak 2,70%, c. Ekstrak 1,35%, d. Ekstrak 0,68%, e. Ekstrak 0,34%, f. Ekstrak 0,17%

KESIMPULAN

Ekstrak biji kapulaga yang memiliki aktivitas penghambatan terbesar terhadap *A. hydrophila* adalah ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat. Senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan terbesar *A. hydrophila* adalah senyawa semipolar. Nilai MIC ekstrak etil asetat biji kapulaga (*A. compactum*) terhadap bakteri *A. hydrophila* adalah pada konsentrasi 2,7.

DAFTAR PUSTAKA

- Aberoum A, Jooyandeh H. 2010. A review on occurrence and characterization of the *Aeromonas* species from marine fishes. *World J Fish Mar Sci* 2: 519-523.
- Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chem* 48: 5-16.
- Ardiansyah. 2007. Antimikroba dari Tumbuhan. www.beritaipetek.com.
- Atlas RM, Brown AL, Dobra KW, Miller L. 1984. *Microbiology Fundamental and Application*. MacMillan Publishing Company, New York.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2005. *Medical Microbiology*. Mc Graw Hill, New York.
- Choudhury D, Pal AK, Sahu NP, Kumar S, Das SS, Mukherjee SC. 2006. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. *Fish Shellfish Immun* 19: 281-291.
- Davis WW, Stout TR. 1971. Disc Plate Methode of Microbiological Antibiotic Assay. *Microbiology* 22: 659-665.
- FAO. 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, Rome.
- Fitrial Y, Astawan M, Soekarto S, Wiryawan K, Wrediyati T, Khairina R. 2008. Aktivitas antibakteri ekstrak biji teratai (*Nymphaea pubescens* Willd) terhadap bakteri patogen penyebab diare. *J Teknol Indon Pangan* 88: 158-154.
- Grandiosa R. 2010. Efektivitas Penggunaan Larutan Filtrat Jintan Hitam (*Nigella sativa*) dengan Konsentrasi Berbeda Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara In-vitro dan Uji Toksisitasnya terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). [Skripsi]. Universitas Padjajaran, Jatinangor, Sumedang.
- Harmani MN, Djas P, Said N. 2001. Penapisan hayati antimikroba ekstrak biji pisang batu (*Musa brachicarpa*). *J Natural* 1: 34-37. <http://teknologi.vivanews.com/news/read/320486-bakteri-pemangsa-daging-manusia> [diakses 13 Juni 2012]
- Jangkaru Z. 2007. *Pembesaran Ikan Air Tawar di Berbagai Lingkungan Pemeliharaan*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Kanazawa A, Ikeda T, Endo T. 1995. A Novel approach to mode of action of calionic biocides morfological effect on bacterial activity. *J Appl Bacteriol* 60: 77-88.
- Kashedikar M, Chhabra D. 2010. Multiple drug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish. *Venetary World* 3: 76-78.
- Larkin JM. 2000. *A Laboratory Manual for Microbiology*. Kendall/Hunt Publishing Company, New York.
- Lukistyowati I. 2005. *Teknik Pemeriksaan Penyakit Ikan*. Universitas Riau Press, Pekanbaru.
- Maipiliandari I, Herawati S, Irawan, Widiantipa N. 2008. Aktivitas antimikrob dari oleoresin beberapa tanaman rempah. *Warta Akrab* 19: 1-10.
- Mangunwardoyo W, Ismayasari R, Riani E. 2010. Uji patogenisitas dan virulensi *Aeromonas hydrophila* stainer pada ikan nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) melalui Postulat Koch. *J Ris Akua* 5: 245-255.
- Mariyono, Sundana A. 2002. Teknik pencegahan dan pengobatan penyakit bercak merah pada ikan air tawar yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Buletin Teknik Pertanian* 7: 33-36.
- Maturin LJ, Peeler JT. 1998. Aerobic Plate Count. *J Bacteriol* 8: 1-10.
- Mohammad S, Abasali H. 2010. Effect of Plant Extract Supplement Diets on Immunity and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Res J Anim Sci* 4 (1): 26-34
- Naufalin R. 2005. Kajian sifat antimikroba ekstrak bunga kecombrang (*Nicolaria speciosa* Horan) terhadap berbagai mikroba patogen dan perusak pangan. [Disertasi]. IPB, Bogor.
- Noga JE. 2000. *Fish Disease Diagnosis and Treatment*. Iowa State Press, USA.
- Noorastuti PT. 2012. *Bakteri Pemangsa Daging Manusia*. <http://www.viva.co.id/indepth/sorot/320022-bakteri-pemangsa-daging-manusia>
- Osward TT. 1995. *Tumbuhan Obat*. Baratha, Jakarta.
- Pasaribu F, Dalimurte H, Poeloegan M. 2006. *Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Ikan Bercak Merah*. IPB, Bogor.
- Purwoko T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Bumi Aksara, Jakarta.
- Robinson T. 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB, Bandung.
- Schlegel HG, Schmidt K. 1984. *Mikrobiologi Umum* (edisi keenam terjemahan). Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Setiabudy R, Vincent HSG. 2002. *Farmakologi dan Terapi: Pengantar Antimikroba*. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Sherlock O, Dolan A, Athman R, Power A, Gethin G, Cowman S, Humphreys H. 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Compl Altern Med* 10: 47-52.
- Skou T, Jensen GS. 2007. *Mikrobiologi*. Norhaven Book, Denmark.
- Solikhah EH. 2009. Efektivitas Campuran Meniran *Phyllanthus niruri* dan Bawang Putih *Allium sativum* dalam Pakan untuk Pengendalian Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo *Clarias* sp. [Skripsi]. IPB, Bogor.
- Sukadana IM. 2009. Senyawa antibakteri golongan flavanoid dari biji belimbing manis (*Averrhoa carambola* Linn. L). *J Kimia* 3: 109-116.
- Sumartini. 2008. Studi aktivitas antioksidan senyawa fenolik dalam daging biji kepel (*Stelechocarpus burahol*). [Skripsi]. IPB, Bogor.
- Tjay T, Rahardja K. 2002. *Obat-obat Penting: Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya*. PT. Elek Media Komputindo, Jakarta.
- Yajri F. 2009. *Ratu Rempah Minim Pasokan*. <http://www.mediaindonesia.com/mediahidupsehat/index.php/read/2009/08/07/1466/9/Ratu-Rempah-Minim-Pasokan>.
- Zainal. 2009. *Atasi Bakteri Ikan dengan Tanaman Obat*. Suplemen Media Indonesia, Jakarta.