

Uji Aktivitas Anti-*quorum sensing* Ekstrak Etanol Daun Senggani (*Melastoma candidum* D.Don) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophilla* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Maria Fatmadewi Imawati

Program Studi PSDKU D3 Farmasi - Fakultas Vokasi
Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya (Kampus Kota Madiun)

Abstract— Infeksi bakteri *Aeromonas hydrophilla* yang merupakan penyebab penyakit MAS (*Motil Aeromonad Septicaemia*) masih menjadi kendala dalam upaya budidaya pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). Penyakit MAS dapat menyebabkan kematian secara massal sehingga mengakibatkan terjadinya gagal panen. Upaya penanggulangan yang paling sering dilakukan adalah menggunakan antibiotik yang dapat memicu resistensi serta kemungkinan terbetuknya residu antibiotik tersebut dalam tubuh ikan. Salah satu upaya alternatif untuk pencegahan infeksi adalah dengan penghambatan *quorum sensing*. Penghambatan *quorum sensing* dilakukan dengan menggunakan campuran ekstrak etanol daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don) ke dalam pakan ikan. Pembuatan campuran pakan ikan nila dengan ekstrak etanol daun senggani dilakukan dengan 5 macam perlakuan yaitu dua perlakuan Kn dan Kp yang bertindak sebagai Kontrol negatif dan Kontrol positif serta tiga perlakuan P₁, P₂ dan P₃ dengan konsentrasi (per gram pakan) 0,6%, 1,2% dan 1,8%. Parameter yang digunakan untuk mengetahui efektivitas ekstrak antara lain gejala klinis, penurunan bobot total ikan uji, dan *Survival Rate*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa infeksi bakteri *Aeromonas hydrophilla* penyebab penyakit MAS dapat dihambat secara optimal menggunakan ekstrak etanol daun senggani dalam pakan ikan pada ketiga konsentrasi yaitu 0,6%, 1,2% dan 1,8% yang ditunjukkan dengan tingginya angka *survival rate* yang mencapai 100%.

Kata kunci: anti-*quorum sensing*, MAS, *survival rate*, daun senggani.

I. PENDAHULUAN

Penyakit MAS (*Motil Aeromonad Septicaemia*) merupakan salah satu masalah yang kerap terjadi dalam budidaya ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Untuk mengatasi penyakit MAS pada ikan nila ini biasanya para petani tambak menggunakan antibiotik streptomisin (Angka, 2007). Dalam riset pendahuluan yang dilakukan oleh Fitri (2010), salah satu alternatif untuk mencegah infeksi bakteri *Aeromonas hydrophilla* tanpa menyebabkan resistensi adalah dengan menggunakan pendekatan berbasis anti-*quorum sensing*.

Quorum sensing merupakan suatu sistem komunikasi secara interseluler pada bakteri berdasarkan kepadatan jumlah sel dan mempunyai peranan penting dalam regulasi ekspresi gen. *Quorum sensing* ini kemudian digunakan oleh bakteri sebagai regulasi pembentukan biofilm, faktor virulensi, sintesis antibiotik, sporulasi, dan bioluminesen (Galloway *et al.*, 2011). Sistem inilah yang kemudian digunakan untuk mencegah infeksi oleh bakteri tanpa menghambat pertumbuhannya.

Anti-*quorum sensing* merupakan senyawa atau molekul yang dapat mendegradasi *autoinducer*

sehingga dapat mencegah terjadinya *quorum sensing* pada bakteri (Molina *et al*, 2003). Salah satu tanaman obat yang memiliki potensi sebagai anti *quorum sensing* adalah daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don) berdasarkan hasil penelitian oleh Fitri (2010). Sebelumnya penelitian oleh Adonizio (2008) menyatakan bahwa senyawa tannin yang diisolasi dari tanaman *Conocarpus erectus* dapat menghambat aktivitas *quorum sensing* pada *Pseudomonas aeruginosa*. Sayekti (2011) juga melaporkan bahwa ekstrak etanol daun talok (*Muntingia calabura*) yang juga mengandung senyawa tannin, efektif dalam menghambat ekspresi faktor virulensi pada *Aeromonas hydrophilla* yang terjadi karena adanya hambatan pada sistem *quorum sensing*.

Pemanfaatan tanaman obat yang mengandung senyawa anti *quorum sensing* dapat menjadi pilihan alternatif dalam upaya pencegahan infeksi penyakit MAS (*Motil Aeromonad Septicaemia*) karena metode penghambatan *quorum sensing* tidak akan mengganggu pertumbuhan bakteri tetapi hanya akan merusak sistem komunikasi yang pada akhirnya dapat menghambat faktor virulensi bakteri (Bruhn *et al.*, 2005).

Oleh karena itu, penelitian terhadap pencegahan infeksi berbasis penghambatan *quorum sensing* ini perlu untuk dilakukan. Selain itu, penerapannya pun

akan jauh lebih praktis karena ekstrak tersebut akan dicampur ke dalam pakan ikan sehingga lebih efektif.

II. METODE PENELITIAN

Ekstraksi Daun Senggani

Daun senggani (*Melastoma candidum* D. Don) yang digunakan diambil dari kaki Gunung Lawu. Kemudian daun yang digunakan sebagai sampel diambil dari urutan ketiga dari pucuk sebanyak 1,5 kg. Sampel daun kemudian dicuci bersih dan dijemur dengan menggunakan kain hitam selama 2-3 hari sampai kering. Setelah kering, simplisia tersebut dibersihkan kembali untuk mencegah adanya sisa pengotor. Kemudian simplisia dihaluskan dan diayak sampai menjadi serbuk simplisia.

Ekstraksi diawali dengan merendam 500 gram serbuk simplisia ke dalam 1 liter etanol 96% dalam sebuah toples kaca selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 3 hari, serbuk simplisia tersebut disaring untuk memisahkan filtrat. Filtrat yang dihasilkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai 1/3 bagian kemudian dilanjutkan dengan penguapan pada *water bath* hingga membentuk pasta kental yang disebut ekstrak. Ekstrak kemudian disimpan dalam eksikator.

Uji Patogenisitas

Uji patogenisitas dilakukan dengan proses infeksi ikan nila menggunakan bakteri *Aeromonas hydrophilla* sebanyak 1 ml/kg bobot ikan secara intramuskular dengan tiga perlakuan yaitu konsentrasi 10⁴/ml, 10⁵/ml dan 10⁶/ml. Parameter yang diamati selama 96 jam uji patogenisitas adalah jumlah kematian ikan dan gejala klinisnya. Hasil uji patogenisitas dengan tingkat mortalitas yang mendekati 50% akan digunakan sebagai dasar dalam penentuan dosis pada tahap uji tantang pada penelitian efektivitas pencegahan (Wahjuningrum *et al.*, 2007).

Pembuatan Pakan Ikan

Pembuatan pakan ikan ini dilakukan dengan mencampur pakan jadi atau pelet yang sudah dihancurkan dengan ekstrak etanol daun senggani sesuai dengan jumlah yang sudah ditentukan. Kemudian ditambahkan CMC 0,1% sebagai bahan perekat selanjutnya pakan dibentuk sedemikian rupa hingga menyerupai bentuk semula. Kemudian pakan yang sudah jadi dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 50°C selama satu jam.

Penelitian Pencegahan

Penelitian pencegahan dilakukan dengan memberikan pakan yang telah diberi campuran ekstrak daun senggani di dalamnya. Berdasarkan penelitian

pendahuluan, maka pakan ekstrak daun senggani untuk mencegah penyakit MAS diberikan sebesar 5% dari berat total biomassa. Menurut hasil penelitian Fitri (2010), untuk jumlah ekstrak dalam pakan digunakan variasi konsentrasi 0,6%, 1,2% dan 1,8% per gram pakan. Satu akuarium diisi 6 ekor ikan untuk 6 kali ulangan dalam satu perlakuan. Terdapat lima macam perlakuan dengan dosis pakan sebagai berikut:

Kn = kontrol negatif, pakan standar dan tidak diinfeksi *Aeromonas hydrophilla*

Kp = kontrol positif, pakan standar dan diinfeksi dengan *Aeromonas hydrophilla*

P1 = ekstrak daun senggani 0,6% dan diinfeksi dengan *Aeromonas hydrophilla*

P2 = ekstrak daun senggani 1,2% dan diinfeksi dengan *Aeromonas hydrophilla*

P3 = ekstrak daun senggani 1,8% dan diinfeksi dengan *Aeromonas hydrophilla*

Pemberian pakan dilakukan pada pagi hari antara pukul 07.00-08.00 dan sore hari pada pukul 15.00-16.00. Pakan yang tidak dimakan setelah 4 jam diambil dan dibuang. Selain itu, juga dilakukan penggantian air sekali sehari sekitar pukul 12.00 (Lukistyowati dan Kurniasih, 2011). Pemberian pakan ini dilakukan selama 7 hari. Untuk memastikan tiap ikan memakan pakan dengan campuran ekstrak sesuai dosis yang diberikan, maka setiap waktu pemberian makan ikan akuarium akan disekat menjadi 6 bagian menggunakan sekat semi permanen yang terbuat dari plastik.

Uji Tantang

Uji tantang dilakukan pada hari ke-8 dengan menyuntikkan suspensi bakteri *Aeromonas hydrophilla* secara intramuskular sesuai dengan hasil uji patogenisitas. Pengamatan ikan uji dilakukan selama 7 hari meliputi gejala klinis, penurunan bobot total ikan uji, dan *Survival Rate* (Wahjuningrum *et al.*, 2007).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi Daun Senggani

Proses ekstraksi ini bertujuan untuk menarik senyawa aktif yang terkandung dalam daun senggani. Senyawa kimia yang terkandung dalam daun senggani antara lain saponin, flavonoid dan tannin. Tannin dan flavonoid sendiri adalah senyawa kimia yang paling aktif dalam daun senggani (Jaganath, 2000). Metode ekstraksi yang dipilih dalam penelitian ini adalah metode maserasi karena selain praktis dan mudah, metode ini juga mampu menjaga stabilitas senyawa aktif karena proses penarikan senyawa aktif tanpa menggunakan suhu tinggi atau pemanasan. Selain itu hasil yang diperoleh dari metode ini juga cukup banyak (Pratiwi, 2009). Hasil ekstraksi yang berupa pasta

kental kemudian ditimbang dan diperoleh berat total sebesar 29,24 gram dan rendemen sebesar 0,12%.

Hasil Uji Patogenisitas Bakteri *Aeromonas hydrophilla* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Patogenisitas adalah kemampuan suatu organisme atau mikroorganisme untuk menyebabkan penyakit. Uji patogenisitas dilakukan untuk mengetahui jumlah bakteri yang mampu menyebabkan infeksi dan kematian pada ikan nila. Virulensi adalah ukuran patogenisitas organisme. Secara eksperimental virulensi dapat diukur dengan menentukan jumlah bakteri yang menyebabkan kematian. Jumlah bakteri tersebut kemudian dinyatakan dalam LC_{50} (*Letal Concentration*) dimana konsentrasi tersebut dapat menyebabkan kematian pada 50% inang.

Tujuan dari uji patogenisitas ini adalah untuk mengetahui jumlah konsentrasi bakteri dalam bentuk suspensi sesuai dengan konsentrasi yang telah ditetapkan yaitu $10^4/ml$, $10^5/ml$ dan $10^6/ml$ (Wahjuningrum *et al*, 2007). Uji patogenisitas ini dilakukan dengan menyuntikkan bakteri sebanyak 1 ml/kg bobot ikan secara intramuskular menggunakan insulin spuit dengan jumlah dosis 0,015 ml/suspensi untuk tiap ekor ikan sesuai dengan rata-rata bobot ikan uji yaitu sebesar 14,23 gram. Setelah pengamatan selama 96 jam, didapatkan data dengan hasil seperti yang tersaji pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Perhitungan *Survival Rate* Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) pada Uji Patogenisitas

Konsentrasi Suspensi Bakteri (sel/ml per kg/BB)	Survival Rate
10^6	50%
10^5	83%
10^4	100%

Berdasarkan perolehan data hasil perhitungan angka *Survival Rate* (tabel 1) maka konsentrasi suspensi bakteri dengan nilai LC_{50} diperoleh dari kelompok perlakuan dengan konsentrasi $10^6/ml$ yaitu dengan tingkat mortalitas ikan mencapai 50%. Setelah konsentrasi tersebut didapat, maka konsentrasi tersebut kemudian dipilih dan digunakan dalam ujiantang pada penelitian efektivitas pencegahan infeksi penyakit MAS pada ikan nila.

Pengamatan Gejala Klinis

Orientasi gerak ikan pasca ujiantang cenderung menurun seperti tingkat kewaspadaan ikan sehingga sering bertabrakan atau menabrak kaca dan arah renang ikan yang tidak teratur sehingga ikan terlihat kurang stabil. Hal tersebut dapat terjadi karena bagian linea lateralis sebagai pusat keseimbangan tubuh ikan

mengalami gangguan akibat adanya infeksi dari bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Kemudian untuk pernapasan dihitung berdasarkan gerakan membuka mulut dalam satu menit yaitu 148-155 kali. Kondisi tersebut tidak normal apabila dibandingkan dengan nilai perhitungan pernapasan pada kelompok ikan tanpa injeksi suspensi bakteri *Aeromonas hydrophilla* dan pemberian pakan tanpa ekstrak daun senggani yaitu sebanyak 129-142 kali per menit.

Parameter selanjutnya adalah penurunan nafsu makan ikan. Hal tersebut dapat diketahui dari sisa pakan ikan yang tidak termakan pasca ujiantang. Beberapa ikan yang mengalami penurunan nafsu makan terdapat pada ikan dengan perlakuan injeksi tanpa pemberian pakan ekstrak serta ikan dengan perlakuan injeksi dan pemberian pakan ekstrak dengan konsentrasi 0,6%, 1,2% dan 1,8%. Kondisi tersebut juga dapat berpengaruh pada penurunan bobot ikan. Rata-rata warna permukaan tubuh ikan pasca ujiantang cenderung pucat bahkan pada ikan yang mati, warna tubuh menjadi sangat pucat disertai dengan pembengkakan pada daerah perut yang ketika dibedah berisi cairan. Selain perubahan warna, terdapat pula beberapa ikan yang mengalami pengelupasan sisik.

Pengelupasan sisik ini disebabkan karena bakteri *Aeromonas hydrophilla* biasanya menyerang bagian permukaan kulit ikan. Selama proses invasi, bakteri *Aeromonas hydrophilla* memproduksi enzim lesitinase dalam upaya untuk masuk ke dalam aliran darah (Wijaya, 2002; Nasran *et al*, 2003). Enzim lesitinase sendiri menurut Raven dan Johnson (1986); Del Bene dan Schmidt (1997) merupakan enzim ekstraseluler yang terdapat pada bakteri patogen dan bekerja dengan menghidrolisis fosfolipid sebagai penyusun membran plasma sel menjadi fosfokolin dan digliserida sehingga bakteri dapat memanfaatkannya sebagai nutrisi.

Pada hari terakhir pengamatan hampir semua gejala klinis yang muncul mulai dapat diatasi sehingga tingkat kematian ikan dapat ditekan kecuali pada ikan dengan perlakuan injeksi tanpa pemberian pakan yang mengandung ekstrak. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun senggani efektif dalam upaya pencegahan infeksi penyakit MAS dari bakteri *Aeromonas hydrophilla* pada semua konsentrasi. Sedangkan yang membedakannya hanya waktu yang dibutuhkan untuk mencapai efek terapeutiknya. Karena jumlah ekstrak yang terkandung berbanding lurus dengan kecepatan proses pencegahan infeksi yang berlangsung. Semakin banyak jumlah ekstrak yang terkandung dalam pakan, semakin cepat pula proses pencegahan infeksinya. Sedangkan kematian yang terjadi pada ikan dengan perlakuan injeksi tanpa pemberian pakan yang mengandung ekstrak ditandai dengan adanya lesi pada daerah sekitar sirip dada. Selain itu, terdapat pula pendarahan pada daerah insang.

Hasil Pehitungan *Survival Rate*

Parameter selanjutnya adalah perhi-tungan *Survival Rate*. Ikan pertama mati pada hari pertama ikan kedua mati pada hari ketujuh. Kematian ikan ini terjadi pada kelompok perlakuan ikan yang diinjeksi dengan suspensi bakteri *Aeromonas hydrophilla* tanpa disertai penambahan ekstrak daun senggani pada pakan. Setelah diketahui jumlah ikan yang mati, maka dilakukan perhitungan untuk mengetahui angka *Survival Rate* yang hasilnya seperti yang tersaji pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Perhitungan *Survival Rate* Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Kelompok Perlakuan	Survival Rate
Tanpa injeksi <i>Aeromonas hydrophilla</i> tanpa pakan ekstrak daun senggani	100%
Dengan injeksi tanpa pakan ekstrak	33%
Pakan ekstrak 0,6%	100%
Pakan ekstrak 1,2%	100%
Pakan ekstrak 1,8%	100%

Hasil Perhitungan Perubahan Bobot Ikan

Setelah menghitung *Survival Rate*, ikan uji kemudian ditimbang satu per satu untuk mengetahui berat akhir rata-rata ikan. Hal ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan bobot ikan sebelum dan sesudah perlakuan serta dapat diketahui kondisi yang berpengaruh pada perubahan bobot ikan tersebut. Tabel 3 merupakan tabel yang memuat hasil perhitungan dan persentase peningkatan dan penurunan bobot ikan rata-rata.

Tabel 3. Hasil Perhitungan Perubahan Bobot Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Kelompok Perlakuan	Peningkatan (gram)	Penurunan (gram)	Persentase (%)
Tanpa injeksi tanpa ekstrak	3,603	-	23,31%
Dengan Injeksi tanpa ekstrak	-	3,430	24,00%
0,6 %	-	1,230	8,64%
1,2 %	-	2,000	14,05%
1,8%	-	3,300	23,19%

Berdasarkan hasil perhitungan *Survival Rate* (tabel 3), peningkatan bobot ikan terjadi pada kelompok perlakuan tanpa injeksi *Aeromonas hydrophilla* dan pakan ekstrak daun senggani. Sedangkan untuk penurunan bobot terjadi pada kelompok perlakuan ikan yang diinjeksi tanpa pemberian pakan ekstrak dan ikan

yang diinjeksi disertai dengan pemberian pakan ekstrak pada konsentrasi 0,6%, 1,2% dan 1,8%.

Berdasarkan uji organoleptik kandungan senyawa aktif tannin pada ekstrak etanol daun senggani terasa kelat dan agak getir sehingga dapat mempengaruhi rasa pada pakan ikan ketika dimakan. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa senyawa aktif pada ekstrak etanol daun senggani berpengaruh pada penurunan bobot ikan dimana semakin besar jumlah ekstrak yang diberikan akan semakin besar pula penurunan bobot ikan yang terjadi. Selain itu, warna kulit ikan yang masih hidup pada perlakuan pakan dengan ekstrak cenderung sedikit lebih pucat apabila dibandingkan dengan warna kulit pada ikan tanpa perlakuan apapun.

IV. KESIMPULAN

Semua variasi konsentrasi ekstrak etanol daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don) efektif dalam upaya mencegah penyakit MAS (*Motil Aeromonad Septicaemia*) yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Aeromonas hydrophilla* ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Konsentrasi optimum dari ekstrak etanol daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don) yang dapat menghasilkan efek yang optimal untuk mencegah penyakit MAS (*Motil Aeromonad Septicaemia*) terutama pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) adalah 0,6%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada kepala dan staff laboratorium Biologi, FMIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

DAFTAR PUSTAKA

- Angka, S.L. 1997. Antibiotic Sensitivity and Pathogenicity of *Aeromonas* and *Vibrio* isolates in Indonesia. P: 339-347. In T. W. Flegel and I. H. MacRae (Eds.), Diseases in Asian Aquaculture III. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Adonizio, A.L. 2008. *Anti-quorum sensing Agents From South Florida Medicinal Plants and Their Attenuation of Pseudomonas aeruginosa Pathogenicity*. FIU Electronic Theses and Dissertations. Florida International University.
- Bevelander, G dan J.A. Ramaley. 1979. *Dasar-dasar Histologi, Terjemahan dari Essential of Histology oleh Gunarso, W. 8th ed. Tobing, M.H dan M.J. Sitohang (Eds.)*. 1979. Gelora Aksara Pratama, Jakarta, iii + 460 hlm.

- Bruhn, J.B., Dalsgaard, I., Nielsen, K.F., Buchholtz, C., Larsen, J.L., & Gram, L. 2005. *Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria*. Dis. Aquat. Organ., 65, 43-52.
- Del Bene, V. and M.G. Schmitd. 1997. *Bacterial virulence factor*. Dalam: *Virella, G. (Ed.)*. 1997. *Microbiology and Infectious Diseases*. 3rd Ed. William & Wilkins, Baltimore, p. 65-70.
- Fitri, S.T. 2010. Skrining Ekstrak Etil Asetat dan Etanol Sepuluh Tanaman Obat Sebagai Penghambat Quorum Sensing *Chromobacterium violaceum*. *Skripsi*. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Galloway, W.R.J.D., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M., & Spring, DR. 2011. Quorum sensing in gram-negative bacteria: small-molecule modulation of ahl and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem. Rev.*, 111, 28-67. doi:10.1021/cr100109t
- Jaganath, I.B. dan L.T. Ng. 2000. *Melastoma malabathricum*, in *Herbs: The Green Pharmacy of Malaysia*. Kuala Lumpur: Vinpress. 58-59.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B., & Defago, G. 2003. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteriaa preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45, 71-81. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00125-9
- Nasran, S., F. Ariyani dan N. Indriyati. 2003. Produksi Kitinase dan Kitin Deasetilase dari *Vibrio harveyi*. *J. Pen. Perik. Indonesia*. Vol 9 No. 5: 33-38.
- Pratiwi, I. 2009. Uji Antibakteri Ekstrak Kasar Daun *Acalypha indica* terhadap Bakteri *Salmonella choleraesuis* dan *Salmonella typhimurium*. *Skripsi*. Jurusan Biologi FMIPA UNS, Surakarta.
- Raven, P.H. dan G.B. Johnson. 1986. *The Chemical Building Blocks of Life*. Dalam: *Biologi*. Times mirror, St. Louis, p. 55-79.
- Sayekti, P. 2011. Penghambatan Ekspresi Faktor Virulensi Bakteri *Aeromonas hydrophilla* Berbasis Sistem Quorum Sensing dengan Ekstrak Etanol Daun Talok (*Muntingia calabura* L.). *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret.
- Wahjuningrum, D., Tarono dan S.L. Angka. 2007. Efektivitas Rebusan Campuran Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Ness), Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) dan Daun Sirih (*Piper betle* L.) Untuk Pencegahan Penyakit MAS (*Motile Aeromonad Septicaemia*) Pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.). *Jurnal Akuakultur Indonesia*, Vol. 6 No. (2) : 127-133.
- Wijaya, S. 2002. *Isolasi Kitinase dari Schleroderm columnare dan Trichoderma harzianum*. *J. Ilmu Dasar Biologi*. Vol 3 No.1: 30-35.