

Studi *In Vitro* Ekstrak Etanol Daun Kamboja (*Plumeria alba*) sebagai Anti *Aeromonas hydrophila*

The *In Vitro* Study: Anti *Aeromonas hydrophila* of Ethanol Extract of *Kamboja* Leaves (*Plumeria alba*)

Ikrom¹, Denok Asih T.R¹, Reni Wira A¹, Bintang Perkasa B¹, Rafika Tiara N¹, Wasito¹

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Email: denokvet@gmail.com

Abstract

Motile aeromonas septicemia (MAS) caused by *Aeromonas hydrophila* could attack seriously freshwater fish in Indonesia. Its mortality rate was reported to be 100% on fish population. According to the Commission of Healthy Fish and National Environment, the MAS has been determined as one of major diseases in Indonesia. However, its therapy using antibiotics is still difficult because the MAS has so many different strains and can be resistant to drugs. If the antibiotics given over the maximal limit this will be able to make the fish (food products) is unsafe for human consumption. One effort to do is by using a traditional herbal medicine. *Kamboja* leaves is reported to contain flavonoid as antibacterial agent. Therefore, this research was aimed to determine the effectiveness of kamboja leaves extract as antibacterial agent using diffusion and dilution method *in vitro*. Inhibition zone of diffusion method and bacterial growth were observed by diffusion and dilution approaches, respectively. The results of the present study showed that 8% concentration of *kamboja* leaves extract was good enough to prevent bacterial growth by dilution method, whereas by diffusion method, it needs 100% of the extract concentration. The zones of growth inhibition was 1.307 cm which was almost the same as the diameter (1,637 cm.) achieved by using 30 µg tetracycline. The zones of bacterial growth inhibition due to the extract still persists on the day 10. But, for the antibiotic, the the zones of bacterial growth inhibition was already faded starting from the day 4. Therefore, it was concluded that kamboja leaves extract was more potent than that of antibiotic (tetracycline) in inhibiting bacterial growth *in vitro*.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, kamboja leaves extract, diffusion, dilution, *in vitro*

Abstrak

Motile aeromonas septicemia (MAS) yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* dapat menyerang ikan air tawar di Indonesia. Angka kematian 100% dari populasi. Komisi Kesehatan Ikan dan Lingkungan Nasional menetapkan penyakit tersebut sebagai salah satu penyakit ikan utama di Indonesia. Pengobatan MAS dengan antibiotik, hasilnya belum memuaskan karena bakteri penyebab MAS memiliki banyak galur dan bahkan dapat resisten terhadap obat-obatan. Jika penggunaan obat tersebut melebihi batas maksimum dapat menyebabkan ikan (bahan pangan asal ikan) tidak aman untuk dikonsumsi. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah penggunaan bahan alami yang memiliki khasiat obat tradisional. Daun kamboja memiliki kandungan flavanoid yang bersifat antibakteri. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui dan menentukan efektifitas ekstrak daun kamboja sebagai antibakteri dengan metode difusi dan dilusi *in vitro*. Pada metode difusi parameter yang diamati adalah zona hambat dan pada metode dilusi yang diamati adalah tumbuh tidaknya bakteri dalam campuran ekstrak dan media tumbuh. Hasil penelitian ini membuktikan, dengan metode dilusi *in vitro* hanya diperlukan konsentrasi ekstrak yang lebih kecil (8%) untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Dengan metode difusi, diameter zona yang dibentuk pada konsentrasi 100% rata-rata sebesar 1,307 cm yang tidak berbeda jauh dengan diameter zona yang dibentuk oleh tetrasiklin 30 µg (1,637 cm). Meskipun demikian pada hari ke-10 zona hambat yang terbentuk oleh ekstrak etanol daun kamboja masih bertahan dengan besaran diameter yang sama dengan hari ke-1 pengamatan. Lain halnya dengan diameter yang terbentuk oleh antibiotik (tetrasiklin) yang sudah mulai memudar sejak hari ke-4. Disimpulkan bahwa ekstrak etanol kamboja lebih poten jika dibandingkan dengan tetrasiklin dalam penghambatan pertumbuhan bakteri (*A. hydrophila*) *in vitro*.

Kata kunci: *Aeromonas hydrophila*, ekstrak daun kamboja, difusi, dilusi, *in vitro*

Pendahuluan

Produksi budidaya ikan meningkat tajam setiap tahun. Lele disukai karena berdaging lunak, sedikit tulang, tidak berduri dan harganya terjangkau. Jumlah produksi lele di Indonesia pada tahun 2004, 2005, 2006, 2007 dan 2008 adalah masing-masing 51, 271 ton, 69,386 ton, 77,272 ton, 91.735 ton dan 108,200 ton. Suatu peningkatan jumlah produksi ikan lele yang cukup signifikan (Anonim, 2012). Budidaya lele lebih marak jika dibandingkan dengan jenis ikan tawar lainnya. Bahkan dilaporkan oleh Dedah Herlina, Kepala Dinas Kelautan dan Perikanan, Kabupaten Sukabumi, bahwa budidaya ikan emas mulai tergusur oleh lele dan nila karena potensi pasar lele yang cukup besar. Berdasarkan laporan Lembaga Pengembangan Bisnis dan Investasi Daerah (Anonim, 2011), kebutuhan lele jumbo di Kabupaten Bangka Tengah, Provinsi Bangka Belitung mengalami peningkatan dengan kebutuhan rata-rata

500 kilogram per hari dan hal tersebut hampir dua kali lipat jika dibandingkan dengan kebutuhan lele beberapa bulan sebelumnya.

Meskipun budidaya lele tergolong mudah dan permintaannya juga semakin meningkat, namun harus diwaspadai penyakit yang seringkali menginfeksi lele. Dilaporan oleh peternak ikan lele asal Bandung di Majalah Trobos (Oky, 2010), bahwa bisnis lele seringkali terserang penyakit borok atau yang dikenal dengan nama *motile aeromonas septicemia* (MAS). Penyakit MAS dapat menginfeksi ikan lele pada semua umur dan juga dapat menyerang semua jenis ikan air tawar. Penyakit MAS diakibatkan terutama oleh *Aeromonas hydrophila*. Dalam suatu populasi ikan lele, kematian ikan lele yang terinfeksi *A. hydrophila* dapat mencapai 100% (Wibawa, 2010). Penyakit MAS dapat diderita oleh ikan di seluruh wilayah perairan air tawar di Indonesia, maka Komisi Kesehatan Ikan dan Lingkungan Nasional pada

tahun 2006 telah menetapkan jenis penyakit tersebut sebagai salah satu penyakit ikan utama di Indonesia.

Masalah MAS tersebut belum dapat teratasi optimal sampai tahun 2009 karena belum ada obat yang efektif. Pada umumnya, untuk pengobatannya digunakan antibiotika. Namun demikian, pengendalian *A. hydrophila* tidak mudah karena memiliki banyak *galur* dan selalu ada di air sehingga dapat menjadi resisten terhadap obat-obatan yang digunakan (Kamiso dan Triyanto, 1993). Selain itu, penggunaan antibiotik jika melebihi batas maksimum dapat menyebabkan bahan pangan tidak aman untuk dikonsumsi manusia karena dampaknya dapat menyebabkan resistensi, reaksi alergi atau gangguan fisiologis pada manusia (Dewi dkk., 1997; Murdiati dkk., 1998).

Salah satu upaya dalam rangka mengatasi kejadian MAS yang dapat dilakukan adalah dengan pemanfaatan bahan-bahan alami yang memiliki khasiat tertentu sebagai obat tradisional (Muhlisah, 1999). Hal ini tentu lebih aman, murah dan mudah diperoleh. Berdasarkan hasil pengamatan, daun kamboja selama ini digunakan oleh pembudidaya ikan untuk mengobati wabah penyakit ikan, dengan cara mencacah daun kamboja dan memasukkannya ke dalam kolam yang terjangkit wabah penyakit. Dilaporkan, daun kamboja memiliki kandungan *flavanoid* yang bersifat antibakteri. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan menentukan sejauh mana ekstrak daun kamboja dapat berefek sebagai antibakteri dan juga diharapkan dapat ditentukan atau diperoleh dosis efektif ekstrak daun kamboja yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri, terutama *Aeromonas hydrophila in vitro*.

Materi dan Metode

Bahan dan alat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi UGM. Bahan yang digunakan adalah ekstrak daun kamboja (*Plumeria alba*), bakteri: *Aeromonas hydrophila* dengan konsentrasi 105 cfu, *nutrient agar* (NA) (Oxoid, England), *tryptone soya agar* (TSA) (Oxoid, England), NaCl fisiologis, *aquabidest*, tetrasiklin, *dimethylsulfoxid* (DMSO), kertas cakram steril dan alkohol.

Sedangkan untuk alat yang digunakan adalah *petri dish* 32 buah, tabung konikal 15 ml, 25 buah, *usa*, *stirrer*, sendok, mikropipet, *blue tip*, gelas ukur, timbangan digital, jangka sorong, *autoclave*, *laminar air flow*, *gloves*, *microwave*, *waterbath* 50° C, kertas payung, *aluminium foil*, plastik putih, pinset, Eppendorf, Bunsen dan almari pendingin.

Pembuatan ekstrak etanol daun kamboja

Daun kamboja yang akan diekstrak disiapkan, sebelumnya ditimbang terlebih dahulu dan didapatkan berat basah 2500 g dan sesudah dikeringkan dengan oven didapatkan 206 g. Setelah kering, daun kamboja dihaluskan dengan *blender* dan diayak untuk memisahkan bagian yang masih kasar dengan yang sudah halus. Sesudah itu, hasil ayakan ditimbang sebanyak 200 g, dibungkus kertas saring, kemudian dimasukkan ke dalam alat *soxhlet* yang labu alas bulatnya telah diisi etanol 70% 250–400 ml. *Heating mantle set* suhu pemanas dinyalakan pada 60–80° C, air dialirkan pada kondensor dan dilakukan proses ekstraksi sampai hasil ekstraksi jernih (9–12 kali putaran pelarut).

Setelah proses ekstraksi selesai, hasil ekstrak diambil dan dimasukkan ke dalam labu evaporator. Pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai tidak keluar lagi pada labu alas bulat tempat sisa penampungan pelarut. Hasil ekstraksi dikeringkan di dalam oven sampai didapatkan ekstrak kering (konsentrasi 100%), Kemudian ekstrak daun kamboja yang diperoleh ditimbang sehingga didapatkan berat ekstrak daun kamboja murni, yaitu 22 g (Rolliana, 2010).

Preparasi *Aeromonas hydrophila*

Isolat murni *Aeromonas hydrophila* ditumbuhkan di media *brooth heart infusion* (BHI) 10 ml dan diinkubasi pada suhu 27° C selama 18–24 jam (Austin and Austin, 1993). Setelah 18 jam inkubasi kemudian disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Endapan yang dihasilkan dicuci dengan menambahkan NaCl fisiologis dan di-vorteks, kemudian disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pada endapan ditambahkan dan dihomogenkan dengan NaCl fisiologis 10 ml. Akhirnya, didapatkan suspensi *Aeromonas hydrophila* sebanyak $>10^9$ cfu/ml yang akan digunakan untuk infeksi buatan pada ikan *in vivo*. Kemudian, suspensi tersebut diencerkan sampai dengan kepadatan 10^5 cfu/ml menggunakan perhitungan dengan metode *McFarland* untuk percobaan pada media *in vitro*.

Pengujian efektifitas ekstrak etanol daun kamboja *in vitro*

Uji *in vitro* merupakan suatu metode uji pada media buatan yang sesuai dengan lingkungan optimal yang diperlukan oleh mikroba untuk tumbuh dan berkembangbiak. Uji tersebut dilakukan untuk

melihat daya kerja antimikrobal ekstrak daun kamboja. Metode yang digunakan pada pengujian *in vitro* adalah metode difusi atau metode cakram kertas antibiogram Kirby–Bauer (Lay, 1994) dan menggunakan metode dilusi. Pada metode difusi parameter yang diamati adalah zona hambat yang terbentuk, yaitu dengan mengukur diameter zona jernih di sekitar sumur dengan penggaris (Rahman, 2008).

Pada awalnya, ekstrak etanol daun kamboja diencerkan menjadi konsentrasi 1%, 5%, 10% dan 20% dengan cara dicampur *aquabidest*. Kemudian, pada bagian bawah cawan petri dibuat garis menjadi tujuh bagian, yaitu K+, K-, K, 1%, 5%, 10%, dan 20%. Pada kontrol negatif digunakan DMSO 30% dan kontrol positif digunakan tetrasiklin 30µg/ml.

Media *nutrient agar* dan TSA pada *plate (petri dish)* dipanaskan menggunakan *microwave* hingga mencair lalu dimasukkan ke dalam *waterbath* pada suhu 50° C supaya siap digunakan. *Aeromonas hydrophila* konsentrasi 10^5 cfu sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam *petri dish* dan diratakan, lalu *nutrient agar* atau TSA dituang di atasnya. *Petri dish* dibiarkan agak terbuka dalam *laminar air flow* selama 5–10 menit sampai media agar mengeras. Kertas cakram dicelupkan ke dalam ekstrak etanol daun kamboja konsentrasi 1%, 5%, 10% dan 20% , kemudian diletakkan di media sesuai dengan pembagian garis. Begitu pula dengan K+ maupun K- tetap diberi kertas cakram. Lalu inkubasikan pada suhu 37° C selama 24 jam. Semua pekerjaan ini dilakukan di *laminar air flow* dan api bunsen untuk menjaga agar tetap steril dan menghindari kontaminasi.

Tahap pengujian *in vitro* lainnya adalah dengan menggunakan metode dilusi, yakni dengan

mencampurkan bakteri, media dan ekstrak etanol daun kamboja sehingga dapat diamati ada atau tidaknya bakteri yang tumbuh. Pertama-tama, media *nutrient agar* atau TSA dipanaskan sampai mencair, dituang ke dalam tabung dan selanjutnya ekstrak etanol daun kamboja dimasukkan ke dalam tabung tersebut dan diratakan. Setiap konsentrasi ekstrak diberikan perlakuan yang sama seperti tahap tersebut di atas. Kemudian, isolate *Aeromonas hydrophila* digoreskan dengan metode *zig-zag* pada media agar miring. Tahap kerja yang sama juga

dilakukan di media yang berbeda, yaitu digunakan *petri dish*. Bakteri yang digoreskan dengan metode T kemudian inkubasikan pada suhu 37⁰ C selama 24 jam.

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil uji *in vitro* ekstrak etanol daun kamboja terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* diperoleh hasil seperti yang terlihat pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Zona daya hambat ekstrak etanol daun kamboja pada media TSA

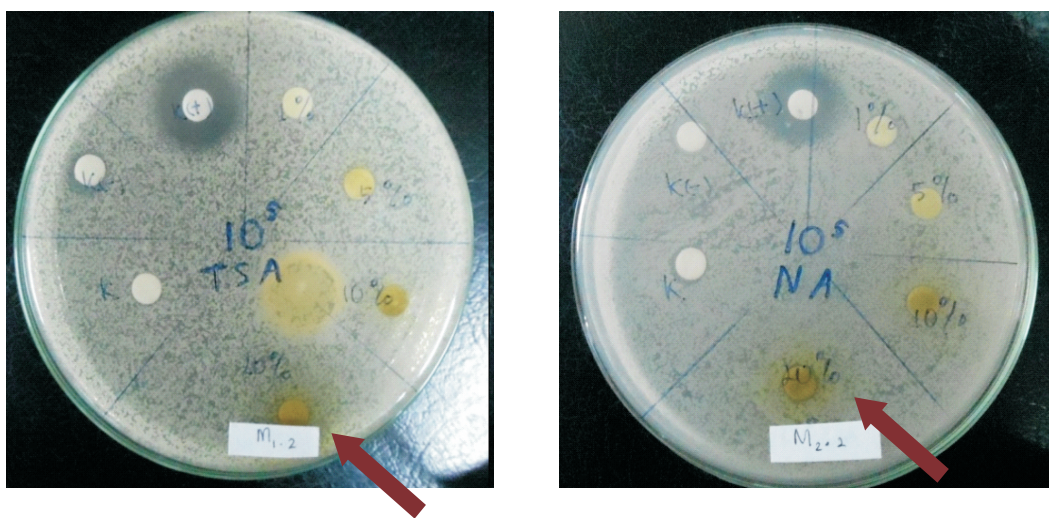
Kertas cakram	TSA 10 ⁵ (M 1.1)	TSA 10 ⁵ (M 1.2)	TSA 10 ⁵ (M 1.3)
K+	13,2 mm	14,6 mm	13,35 mm
K-	++	++	+
K	-	-	-
1 %	-	-	-
5%	-	-	-
10%	-	-	-
20%	-	+	+

Tabel 2. Zona daya hambat ekstrak pada media *nutrient agar*

Kertas cakram	NA 10 ⁵ (M 2.1)	NA 10 ⁵ (M 2.2)	NA 10 ⁵ (M 2.3)
K+	10,7 mm	10,3 mm	9
K-	+	+	-
K	-	-	-
1 %	-	+	-
5%	-	+	-
10%	-	+	-
20%	+	+	+

Pada kelompok kontrol positif yang mengandung tetrasiklin terdapat zona hambat rata-rata sebesar 13,71 mm pada media TSA. Perlakuan ini dilakukan pada tiga buah *petri dish* untuk meningkatkan objektivitas, dan hasil diameter zona hambat setiap *petri dish* tidak berbeda jauh, yakni 13,2 mm, 14,6 mm dan 13,35 mm. Sebagai kontrol negatif tidak ada zona hambat karena pada perlakuan

ini kertas cakram disk hanya dicelupkan ke dalam DMSO sehingga tidak memiliki efek anti bakteri, begitu juga pada kelompok lain yang diberi ekstrak etanol sebanyak 1%, 5% dan 10%. Namun berbeda halnya dengan kelompok yang diberi ekstrak 20% karena nampak ada zona hambat yang terbentuk meskipun masih kecil dan masih ada koloni bakteri di sekitarnya, seperti yang terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Zona hambat yang terbentuk pada media TSA dan NA

Adanya zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi ekstrak 20% disebabkan adanya zat tertentu dalam ekstrak kamboja yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Dalam hal ini, kamboja mengandung flavonoid (Tampubolon, 1981) yang salah satunya memiliki efek anti mikrobial (Cushnie and Lamb, 2005 and 2011). Flavonoid merupakan senyawa fenol yang beraksi sebagai koagulator protein (Dwidjoseputro, 1994).

Untuk lebih menyakinkan, bahwa ekstrak kamboja memiliki efek anti mikrobial, selanjutnya dilakukan uji difusi kembali, tetapi digunakan

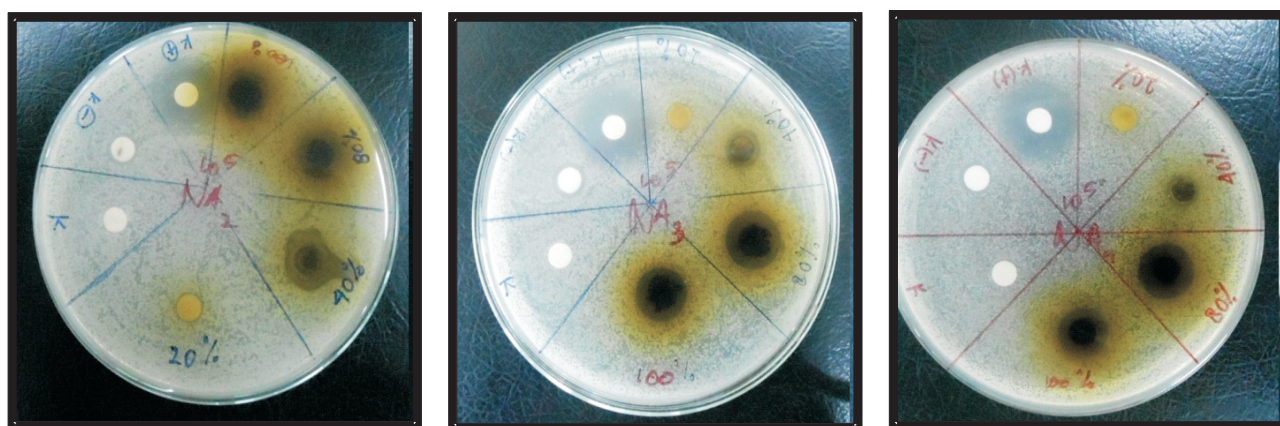
variasi konsentrasi ekstrak kamboja yang lebih besar. Variasi yang digunakan pada uji difusi selanjutnya adalah 20%, 40%, 80% dan 100%. Pada uji difusi berikutnya ini hanya digunakan media *nutrient agar* karena media ini lebih jernih jika dibandingkan dengan media TSA sehingga pengukuran diameter zona hambat dengan jangka sorong lebih mudah dilakukan. Setelah diinkubasikan 24 jam, maka dilakukan pengamatan terhadap zona hambat yang terbentuk Tabel 3 adalah diameter zona hambat yang terukur pada media *nutrient agar* (NA).

Tabel 3. Zona daya hambat ekstrak pada media Nutrient Agar

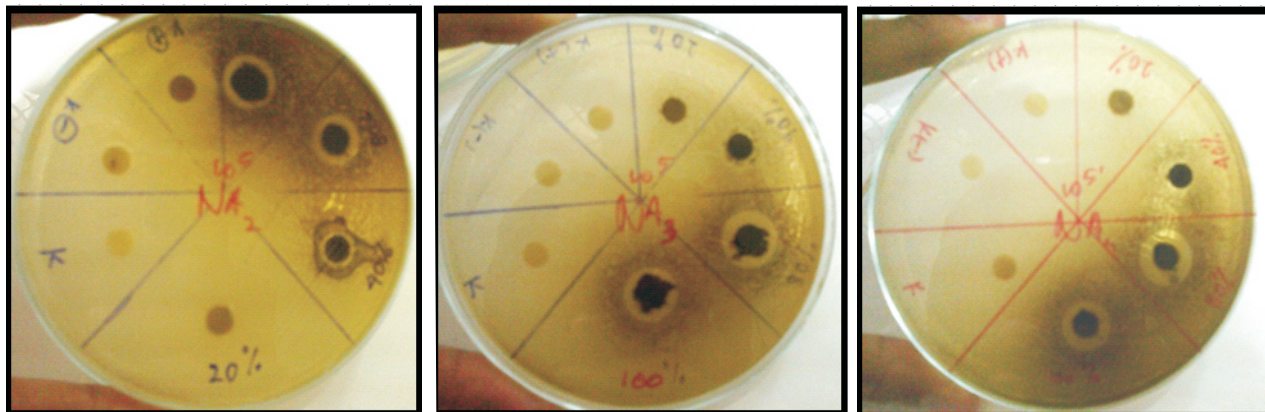
Variabel	NA 1(cm)	NA 2(cm)	NA 3(cm)	NA 4(cm)	NA 5(cm)
K (+)	1,83	1,43	1,765	1,51	1,65
K (-)	–	–	–	–	–
20%	–	–	0,715	–	–
40%	0,79	0,74	0,85	1,29	0,905
80%	1,19	1,15	1,45	1,375	1,02
100%	1,65	1,265	1,33	1,205	1,085

Pada kontrol positif yang diberi cakram disk yang telah dicelupkan ke dalam tetrasiklin 30 μ g/ml terdapat zona hambat rata-rata sebesar 1,637 cm, pada kelompok kontrol negatif tidak terdapat zona hambat karena pada cakram disk hanya dicelupkan ke dalam DMSO. Kelompok yang zona hambatnya sudah dapat diukur dalam satuan cm mulai dari konsentrasi 40% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 0,915 cm, konsentrasi 80% dengan rata-rata 1,237 cm dan konsentrasi 100% dengan diameter rata-rata 1,307 cm. Dengan demikian, dapat disimpulkan, semakin besar konsentrasi ekstrak etanol daun kamboja, semakin besar zona hambat yang terbentuk, seperti yang terlihat pada Gambar 2.

Dari gambaran zona hambat tersebut, semakin meneguhkan bahwa ekstrak kamboja memiliki efek yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga dapat digunakan sebagai obat herbal kedepannya. Selain itu, efek anti mikrobial ekstrak kamboja juga tergolong lama. Hal tersebut dibuktikan ketika sepuluh hari sejak pengamatan pertama ternyata zona hambat yang terbentuk masih bertahan. Hasil tersebut berbeda dengan zona hambat yang dihasilkan dengan penggunaan tetrasiklin 30 μ g yang zona hambatnya sudah memudar, bahkan sejak hari ke empat, seperti yang terlihat pada Gambar 3.



Gambar 2. Zona hambat yang terbentuk pada media NA pada konsentrasi 20%, 40%, 80% dan 100%

Gambar 3. Dokumentasi hari ke-10 pada uji difusi *in vitro*

Untuk lebih meneguhkan efek antimikrobia ekstrak daun kamboja, maka selanjutnya digunakan metode dilusi untuk membandingkan efek ekstrak

ketika dicampurkan dengan media dan bakteri sekaligus. Hasil pengamatan makroskopis uji dilusi *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 4 dan 5.

Tabel 4. Hasil pengamatan makroskopis uji dilusi pada agar miring

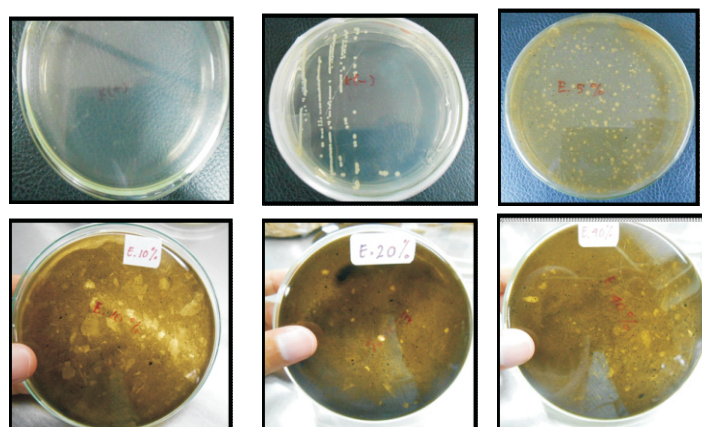
Variabel	Hasil (Koloni <i>Aeromonas sp.</i>)
K (+)	Tidak ada
K (-)	Ada
E.5%	Ada
E.10%	Tidak ada
E.20%	Tidak ada
E.40%	Tidak ada

Tabel 5. Hasil pengamatan makroskopis uji dilusi pada *petri dish*

Variabel	Hasil (Koloni bakteri <i>Aeromonas sp.</i>)
K (+)	Tidak Ada
K (-)	Ada
E.5%	Ada
E.10%	Tidak ada
E.20%	Tidak ada
E.40%	Tidak ada

Pada kontrol positif, yaitu campuran *nutrient agar* dan antibiotik yang diberi *Aeromonas hydrophila* tidak terdapat koloni bakteri. Pada kontrol negatif, yaitu *nutrient agar* yang diberi *A. hydrophila* terdapat koloni bakteri. Pada *Experiment (E)* 5%, yaitu perlakuan yang diberi campuran *nutrient agar* dan ekstrak etanol daun kamboja sebesar 5% terdapat

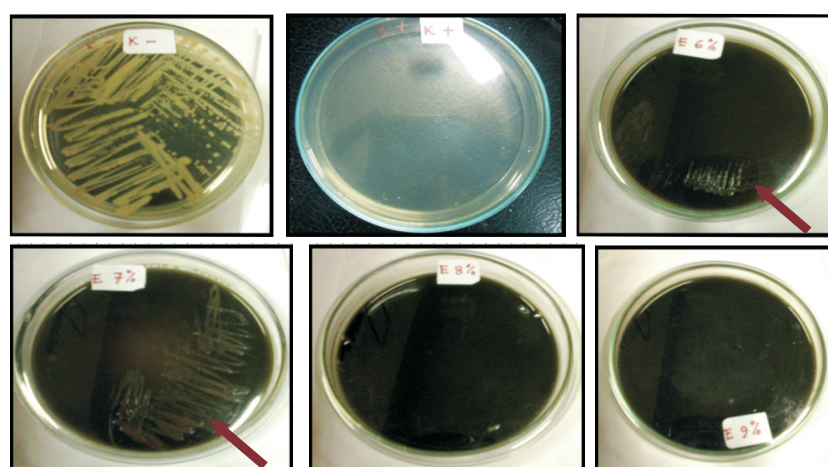
koloni bakteri. Namun, pada E 10%, 20% dan 40%, yaitu dengan campuran konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi koloni bakteri tidak tumbuh. Gambar makroskopis koloni bakteri yang terbentuk pada metode dilusi dengan menggunakan cawan petri dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Gambar makroskopis koloni bakteri yang terbentuk pada metode dilusi menggunakan cawan petri.

Hasil pengamatan koloni dengan agar miring tidak ditampilkan karena lebih susah diamati jika dibandingkan dengan digunakan *petri dish*. Dari pengamatan makroskopis tersebut dapat disimpulkan, bahwa dengan konsentrasi ekstrak yang lebih kecil (10%), ekstrak etanol daun kamboja sudah memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Hal tersebut karena pada metode dilusi, ekstrak dapat tercampur secara homogen dengan bakteri sehingga lebih efektif dalam menghambat bakteri. Sedangkan, pada metode difusi hanya bakteri yang berada di dekat kertas cakram saja yang dapat dihambat pertumbuhannya.

Metode yang digunakan pada penelitian ini dapat dianalogikan penggunaannya di lapangan, misalnya pencampuran ekstrak etanol daun kamboja dengan air kolam tempat ikan dipelihara. Pada Gambar 4 terlihat, bahwa bakteri masih tumbuh pada konsentrasi ekstrak 5% namun tidak tumbuh pada konsentrasi 10%. Dengan demikian, dapat disimpulkan, bahwa antara rentang keduanya letak dosis efektif ekstrak dalam menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Selanjutnya, dilakukan uji *in vitro* dengan metode dilusi kembali, tetapi dengan konsentrasi antara 5% dan 10%,. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Gambar makroskopis pengamatan uji dilusi *in vitro* dengan K(-), K (+), konsentrasi ekstrak 6%, 7%, 8% dan 9%.

Pada Gambar 5 terlihat, bahwa pada kontrol positif (K⁺), yaitu campuran *nutrient agar* dan antibiotik (tetrasiklin 30 µg) yang diberi *Aeromonas hydrophila* tidak terdapat koloni bakteri. Pada kontrol negatif (K⁻), yaitu *nutrient agar* yang diberi *A. hydrophila* terdapat koloni bakteri. Berbeda halnya dengan campuran ekstrak 6% dan 7% yang ternyata masih terdapat pertumbuhan bakteri (tanda panah), pada konsentrasi ekstrak 8% dan 9% sudah tidak ada pertumbuhan bakteri. Dapat disimpulkan, bahwa pada ekstrak etanol daun kamboja konsentrasi 8%, maka pertumbuhan *A. hydrophila* mulai dapat terhambat *in vitro*.

Hasil pengujian efek ekstrak daun kamboja terhadap pertumbuhan *A. hydrophila in vitro* membuktikan, bahwa pada metode difusi, yaitu menggunakan cakram disk yang telah dicelupkan dalam ekstrak 100% mampu membentuk zona hambat rata-rata sebesar 1,307 cm, tidak begitu jauh besarnya dengan zona hambat pada cakram disk yang dicelupkan tetrasiklin 30 µg (1,637) cm. Bahkan, besar zona hambat ekstrak tetap bertahan sampai pada hari ke-sepuluh. Sedangkan, besar zona hambat tetrasiklin 30 µg mulai memudar pada hari keempat.

Pada pengujian *in vitro* dengan metode dilusi, terbukti, bahwa dibutuhkan ekstrak etanol daun kamboja dengan konsentrasi yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan metode difusi. Pada metode dilusi, ekstrak etanol daun kamboja pada konsentrasi 8% sudah dapat menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Hal ini disebabkan karena ekstrak dapat tercampur homogen dengan bakteri sehingga lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*.

Hasil penelitian ini membuktikan, bahwa pada konsentrasi tertentu ekstrak etanol daun kamboja dapat menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*, meskipun hal tersebut masih perlu diteliti *in vivo*. Penelitian lanjutan *in vivo* perlu dilakukan mengingat arti penting aplikasi ekstrak etanol daun kamboja dalam pengobatan penyakit bakterial pada ikan di kolam-kolam ikan di lapangan. Diharapkan, hasil penelitian ekstrak etanol daun kamboja *in vivo* nantinya akan diperoleh hasil yang sesuai dengan yang diharapkan. Tampaknya, upaya-upaya komersialisasi produk dalam bentuk barang dan jasa terkait *ekstrak etanol daun kamboja* sangat diperlukan dalam rangka program eradikasi, termasuk pencegahan dan pengobatan MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) pada ikan air tawar di Indonesia.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih tertinggi kami panjatkan dalam syukur kepada Allah S.W.T. yang telah memudahkan pelaksanaan penelitian, dan kepada pihak DIKTI yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Hibah Program Kreativitas Mahasiswa Tahun 2013. Terima kasih juga disampaikan kepada Prof. drh. R. Wasito, M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan saran dalam penyiapan proposal, pelaksanaan penelitian dan penulisan naskah, dan Ibu Arsiyah yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan kegiatan laboratorik penelitian di Pusat Antar Universitas Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Daftar Pustaka

- Anonim (2012) Kamboja. <http://www.plantamor.com/index.php?plant=103>. Diakses pada tanggal 4 September, 2013.
- Anonim (2011) Potensi ikan lele di Bangka. <http://ardiansyah.ubb.ac.id/potensi-ikan-lele-di-bangka-belitung/> <http://ardiansyah.ubb.ac.id/potensi-ikan-lele-di-bangka-belitung/> Diakses pada tanggal 4 September, 2013.
- Austin, B. and Austin, D.A. (1993) Bacterial fish pathogen. Disease in farm and wild fish. 2nd Ed. Ellis Herwood London, United Kingdom.
- Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrobiol. Agents* 26: 343–356.
- Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J. (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int. J. Antimicrobiol. Agents* 38: 99–107.
- DeSousa, R.R., Queiroz, K.C., Souza, A.C., Gurgueira, S.A., Augusto, A.C., Miranda, M.A., Peppelenbosch, M.P., Ferreira, C.V. and Aoyama, H. (2007) Phosphoprotein levels, MAPK activities and NFκB expression are affected by fisetin. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 22: 439–444.
- Dewi, A.A.S., Agustini, N.I.P. dan Dharma, D.M.N. (1997) Survei residu obat preparat sulfa pada daging dan telur ayam di Bali. *Bul. Vet.* 10: 9–1.
- Dwidjoseputro, D. (1994) Dasar-dasar mikrobiologi. Djambatan, Jakarta.
- Hahlbrock K. (1981) Flavonoids. dalam *The Biochemistry of Plants, Vol. 7: Secondary Plant Products*. New York: Academic Press, New York, USA. 425–456.
- Herlina, D. (2012) Sangkuriang II, bakal gusur popularitas Lele dumbo?. *Republika online Kompas*. 2012. Industrialisasi lele dumbo. Halaman 21.
- Kamiso, H.N. dan Triyanto (1993) Vaksinasi *Aeromonas hydrophila* untuk menanggulangi penyakit MAS pada lele dumbo. Abstrak. Simposium Perikanan Indonesia I. Jakarta.
- Lay, B.W. (1994) Analisis mikroba di laboratorium. PT Grafindo Persada, Jakarta.
- Muhlisah (1999) Temu-temuan dan empon-empon budidaya dan manfaatnya. Kanisius, Yogyakarta.
- Murdiati, T.B., Indraningsih and Bahri, S. (1998) Contamination at animal products by pesticides and antibiotics. In: Seeking agricultural produce free of pesticide residues. I>R> Kennedy, J.H> Skerritt, G.I> Johnson and E. Highley (Eds). ACIAR Proceeding 85: 115–121.
- Oky. (2010) Bisa menurunkan tingkat kematian ikan hingga sekitar 5 %. *Majalah Trobos Edisi Desember* 2010.
- Purwata, I.M.O.A. dan Dewi, P.F.S. (2008) Isolasi dan uji aktivitas antibakteri minyak atsiri dari rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L). *J. Kimia* 2: 100–104.
- Rahman, M.F. (2008) Potensi antibakteri ekstrak daun pepaya pada ikan gurami yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Institut Pertanian Bogor: 35–36.
- Rolliana, E.R. (2010) Acute toxicity test of ethanol extract of *Plumeria alba* L. against *Artemia salina* Leach larvae using borne shrimp lethality test (BST) method. Skripsi Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro (Undip), Semarang.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W. (1995) Fisiologi Tumbuhan, Jilid 2. Penterjemah: Lukman DR, Sumaryono. Bandung: Penerbit ITB. Hal:150–152.
- Schuijter, M., Sies, H., Illek, B. and Fischer, H. (2005). Cocoa-related flavonoids inhibit CFTR-mediated chloride transport across T84 human colon epithelia <<http://jn.nutrition.org/cgi/reprint/135/10/2320>>. *J. Nutr.* 135: 2320–2325.

Tampubolon, A.S. (1981) Obat asli Indonesia. Dian Rakyat. Jakarta: 214-215.

Wibawa, W.D. (2010) Disain pengelolaan lahan berkelanjutan berbasis tanaman hortikultura tahunan di DAS Ciliwung Hulu. Disertasi. Pascasarjana IPB, Bogor.

Yamamoto and Gaynor . (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. http://www.jci.org/cgi/content/full/107/2/135?ijkey=a1e09ce2dbca283cec170598f2410b15d5f4304f&keytype=tf_ipsecsha. *J. Clin. Invest.* 107: 135.