

KAJIAN POTENSI ANTIFUNGI KETAPANG (*Terminalia cattapa* L), SIRIH (*Piper betle* L), JAMBU BIJI (*Psidium guajava* L), DAN SAMBILOTO (*Andrographis peniculata* (Burm. F) Ness) TERHADAP PERTUMBUHAN CENDAWAN AKUATIK *Aphanomyces* SECARA *IN VITRO*

Study on antifungal potency of *Terminalia cattapa*, *Piper betle*, *Psidium guajava*, and *Andrographis peniculata* on the growth of *Aphanomyces in vitro*

S. Nuryati¹, Rahman¹, dan Taukhid²

¹Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

²Balai Penelitian Perikanan Tawar Sukamandi, Subang

ABSTRACT

An effort to prevent aquatic fungi *Aphanomyces* sp. infection on fish using natural material can be an economically way, easy to find the materials, easy to apply and safe for environment. The antifungal potency and efficacy of scalded-leaf extract of *Terminalia cattapa*, *Piper betle*, *Psidium guajava* and *Andrographis peniculata* on prevention of *Aphanomyces* sp. growth in vitro in GYA medium. Scalding was performed in the water at 50°C. Concentration of leaf extracts tested was 0, 10, 20, 40 and 80 g/L. The results of study showed that *Terminalia cattapa* in a dosage of 40 g/L had the best prevention activity, followed by *Piper betle* in the same dosage. *Psidium guajava* and *Andrographis peniculata* had no prevention activity on growth of *Aphanomyces* sp.

Keywords: antifungal, *Terminalia cattapa*, *Piper betle*, *Psidium guajava*, *Andrographis peniculata* growth, *Aphanomyces* sp.

ABSTRAK

Upaya penanggulangan infeksi cendawan akuatik *Aphanomyces* sp. pada ikan menggunakan bahan alami dapat menjadi cara yang ekonomis ekonomis, bahan mudah didapat, mudah diterapkan dan aman bagi lingkungan. Potensi antifungi dan efektivitas ekstrak seduh daun ketapang (*Terminalia cattapa*), sirih (*Piper betle*), jambu biji (*Psidium guajava*) dan sambiloto (*Andrographis peniculata*) terhadap penghambatan pertumbuhan *Aphanomyces* sp. dilakukan secara *in vitro* dalam media biakan GYA. Penyeduhan dilakukan menggunakan pelarut air dengan suhu 50°C. Konsentrasi yang diuji adalah 0, 10, 20, 40 dan 80 gr/L untuk masing-masing bahan. Aktivitas penghambatan paling baik terhadap cendawan diperoleh dari ekstrak seduh daun ketapang 40 g/L dan diikuti oleh ekstrak seduh daun sirih dengan konsentrasi yang sama. Jambu biji dan sambiloto tidak menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *Aphanomyces* sp.

Kata kunci: antifungi, ketapang, sirih, jambu biji, sambiloto dan *Aphanomyces* sp.

PENDAHULUAN

Masalah yang berhubungan dengan manajemen kesehatan suatu usaha budidaya perikanan diantaranya menyangkut upaya pencegahan dan pengobatan yang berlaku bagi penyakit non infeksi dan penyakit infeksi (Alifuddin, 2003). Salah satu penyakit infeksi yang sering menyerang hewan budidaya adalah penyakit mikotik. Penyakit ini disebabkan oleh infeksi organisme

cendawan akuatik yang bersifat obligat maupun fakultatif (Alifuddin, 2003).

Aphanomikosis adalah salah satu penyakit mikotik yang sering meyerang beberapa hewan budidaya perairan air tawar. Penyakit ini disebabkan oleh cendawan akuatik *Aphanomyces* sp. sebagai agen etiologik, gejala klinisnya dikenal sebagai *Epizootik Ulcerative syndrome* (EUS). Serangan ini memiliki gejala patologis yang khas ketika preparat histologinya diamati

yaitu adanya kalainan struktur pada jaringan tubuh berupa sel granula (Alderman *et al.*, 1986).

Upaya penanggulangan terhadap serangan penyakit EUS dilakukan melalui usaha pencegahan maupun pengobatan. Pencegahan terhadap serangan penyakit EUS dilakukan dengan mengontrol kualitas air (pH dan bahan organik). Sedangkan upaya pengobatan dilakukan dengan memakai beberapa jenis zat kemoterapeutik antara lain *malachite green* (MG), *methylene blue* (MB), formalin, hidrogen peroksida (H₂O₂), senyawa tembaga sulfat (CuSO₄), dan iodine (Bruno *et al.*, 1999). Beberapa jenis senyawa fungisida juga telah disintesa untuk menanggulangi serangan infeksi cendawan seperti trifluralin dan griseofulvin.

Sifat presisten dari beberapa zat kemoterapeutik membuat zat tersebut tidak mudah terurai secara alami. *Malachite green* (MG) selain tidak ramah lingkungan, juga memiliki sifat karsinogenik sehingga berbahaya bagi konsumen dan tidak dapat diterima di beberapa negara maju. Senyawa tembaga (Cu) adalah logam berat di perairan dan racun bagi makhluk hidup (Butterwort, 1992), sehingga pemakaian yang salah dapat mengganggu stabilitas ekologi perairan.

Salah satu upaya untuk mengatasi kekurangan dan kerugian yang disebabkan oleh pemilihan zat kemoterapeutik adalah menggunakan obat alternatif yang lebih aman, ramah lingkungan, mudah didapatkan, mudah diterapkan dan murah. Keunggulan bahan alami dalam hal ini adalah selain efektif dalam pengobatan maupun pencegahan penyakit, juga lebih mudah terurai secara alami sehingga dapat menambah kesuburan perairan.

Beberapa jenis tumbuhan telah dimanfaatkan zat aktifnya dalam beberapa aplikasi pertanian yang luas. Zat azadirachtin telah diekstrak dari tumbuhan nimba (*Azadirachta indica*) dan digunakan sebagai bahan insektisidal botani yang aman. Rotenoid dan saponin diekstrak dari tanaman tuba (*Derris* sp.) dan biji teh sebagai pemberantas hama pada kolam dan tambak ikan.

BAHAN & METODE

Pembuatan ekstrak

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Pembuatan ekstrak seduh dan ketapang, daun sirih, daun sambiloto, dan daun jambu biji dilakukan dengan teknik maserasi dan memakai pelarut air destilata steril. Daun yang dipakai adalah daun yang belum tua, yang telah dicuci bersih dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C selama 20 jam. Selanjutnya digiling dan kemudian diayak dengan saringan untuk mendapatkan bubuknya.

Ekstraksi dengan air destilata steril dilakukan dengan melarutkan beberapa gram bubuk daun ketapang, daun sirih, daun sambiloto dan daun jambu biji ke dalam 1 ml air destilata. Campuran tersebut diseduh pada suhu 50°C selama 15 menit. Hasil seduhan disaring dengan kertas saring Whatmann untuk mendapatkan ekstrak encer yang siap untuk digunakan.

Uji parasitik cendawan

Untuk mengetahui sifat cendawan dalam mengambil nutrisi dari media tumbuh, dilakukan dengan mengkultivasi cendawan ke dalam media berprotein, yaitu media GYSMA. Sifat parasitik ditandai dengan adanya zona lisis berwarna bening di sekitar koloni yang tumbuh.

Uji efek fungisidal secara *in vitro*

Uji efek fungisidal secara *in vitro* dilakukan dengan mengamati ada atau tidak adanya *clear zone* pada sekitar ring kertas saring Whatmann berdiameter 0,5 cm yang telah dicelup ke dalam masing-masing ekstrak seduh dari daun jambu biji, sambiloto, sirih dan daun ketapang pada 4 konsentrasi awal yaitu 0,625 g/l; 1,25 g/l; 2,5 g/l; 5 g/l. Jika perlakuan awal tetap tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan, konsentrasi ekstrak ditingkatkan pada 10 g/l; 20 g/l; 40 g/l; 80 g/l. Pencatatan dilakukan selama 5 hari pada diameter *clear zone* yang terbentuk.

Rancangan Percobaan dan Analisa

Uji secara *in vitro* menggunakan rancangan RAL faktorial dengan 3 ulangan. Faktor yang diuji adalah jenis bahan ekstrak daun (faktor A) dan konsentrasi perlakuan (B). Faktor jenis daun terdiri atas 4 taraf yaitu daun ketapang (a1), daun jambu biji (a2), daun sambiloto (a3), dan daun sirih (a4).

Untuk faktor konsentrasi terdiri atas 5 taraf yaitu 0 g (b1), 10 g (b2), 20 g (b3), 40 g (b4), dan 80 g (b5). Parameter yang diamati adalah panjang penghambatan perlakuan terhadap koloni cendawan di sekitar ring kertas saring. Untuk menguji perbedaan yang didapat dari perlakuan, data diuji lanjut dengan uji Duncan sehingga diperoleh perlakuan terbaik dari penelitian ini.

Adapun rancangan penelitiannya menurut Steel dan Torrie (1997) adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} = Panjang penghambatan miselia cendawan perlakuan ke - k yang berasal dari ekstrak seduh daun ke - i dan konsentrasi ke - j.

M = Nilai rata - rata zona hambat

A_i = Pengaruh aditif jenis daun ke - i

B_j = Pengaruh aditif dari konsentrasi ke - j

$(\alpha\beta)_{ijk}$ = Pengaruh interaksi jenis daun ke - i dan konsentrasi ke - j

ϵ_{ijk} = Galat percobaan ke - k dengan jenis daun ke - i dan konsentrasi ke - j

HASIL & PEMBAHASAN

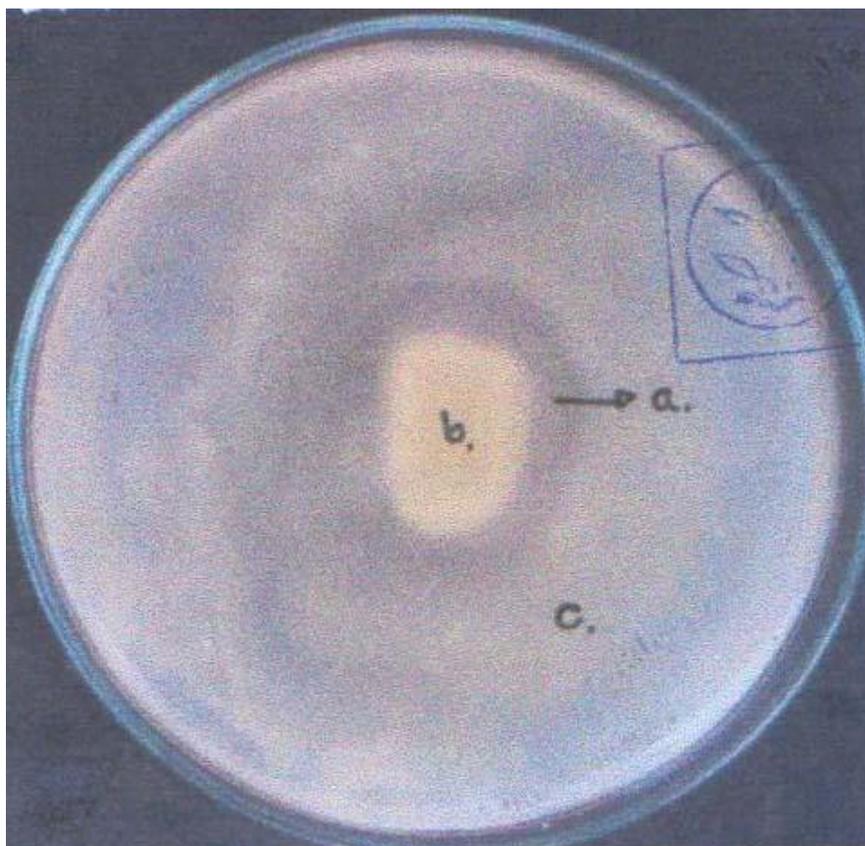
Uji parasitik cendawan pada media GYSMA menunjukkan bahwa cendawan yang dikultur dapat melisis protein sehingga dapat digolongkan sebagai cendawan *Aphanomyces* sp. strain parasit. Kemampuan melisis protein cendawan ditandai dengan adanya lingkaran bening di sekitar daerah yang ditumbuhi oleh cendawan *Aphanomyces* sp tersebut.

Adanya kemampuan cendawan *Aphanomyces* sp. dalam memanfaatkan sumber protein dari inang maupun media biakan GYSMA, disebabkan cendawan tersebut dapat menghasilkan enzim proteolitik pada hifa haustorium yang menembus jaringan dan otot inang (Garraway, 1984). Aktivitas ini cenderung merusak struktur jaringan inang yang diinfeksi dengan ciri berupa peradangan, nekrosis dan malfungsi organ tertentu (Anderson, 1974).

Sporangium cendawan *Aphanomyces* sp. terlihat terbentuk dengan pola menyamping yang membedakannya dengan strain saprofitik yang membentuk sporangium pada ujung hifanya (Alderman *et. al.*, 1986). Selain itu, strain parasit cenderung tumbuh jauh lebih lambat dalam media biakan bernutrisi tinggi dibanding strain saprofit. Oleh karena itu, media biakan dibuat dengan formula yang miskin nutrisi agar cendawan saprofit tidak tumbuh menyaingi cendawan *Aphanomyces* sp strain parasit (Alifuddin, 2003).

Para peneliti cendawan memperkirakan adanya enzim ekstraselular yang dihasilkan cendawan parasit saat menginfeksi inang. Enzim ini bertanggung jawab pada proses pengrusakkan, penipisan dan pecahnya protoplasma pada sel-sel jaringan yang terinfeksi. Enzim tersebut dikenal sebagai *Cell wall Degrading Enzym* (CDWE) yang mekanisme kerjanya secara langsung maupun tidak langsung (Keon *et.al.*, 1987). Beberapa cendawan parasitik juga menghasilkan beberapa toksin yang merupakan senyawa dengan jumlah yang sedikit namun dapat mengakibatkan kerusakan parah jaringan pada inang yang terinfeksi. (Knoche *et al.*, 1987).

Pengamatan uji penghambatan terhadap pertumbuhan cendawan *Aphanomyces* sp., ekstrak seduh daun ketapang dan daun sirih menunjukkan adanya aktifitas penghambatan kecuali pada kontrol perlakuan. Aktivitas ini ditandai dengan adanya zona bebas cendawan di sekitar kertas Whatman yang telah dicelup ke dalam ekstrak seduh daun ketapang maupun ekstrak seduh daun sirih. Hal tersebut berarti menunjukkan adanya potensi antifungal yang terdapat pada daun



Gambar 1. Zona lisis protein pada media Glukosa Yeast Skim Milk Agar (GYMSA) yang ditanami cendawan *Aphanomyces* sp (a). Miselium cendawan *Aphanomyces* sp (b). Media GYMSA (c).

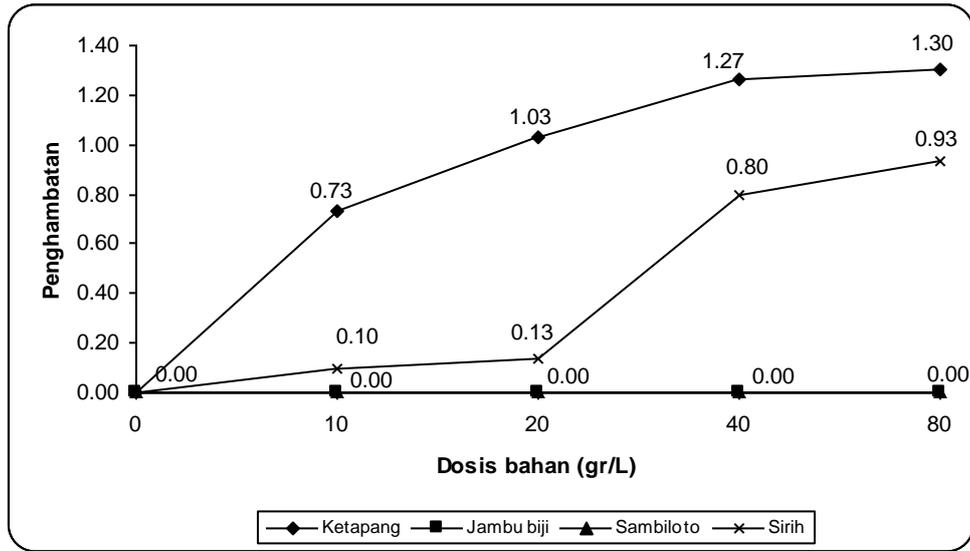
ketapang dan daun sirih, walaupun harus diberikan dalam konsentrasi yang tinggi.

Dari analisa ragam dan uji Duncan, terlihat bahwa semua konsentrasi memberikan hasil penghambatan yang berbeda nyata antara daun ketapang dengan daun sirih pada selang kepercayaan 99% kecuali pada konsentrasi 80 g dan 40 g. Dengan demikian konsentrasi terbaik untuk pemakaian daun ketapang adalah 40 g dalam 1 liter pelarut. Daun sirih pada selang kepercayaan 99%, efek penghambatan pada konsentrasi 0 g, 10 g, dan 20 g tidak berbeda nyata.

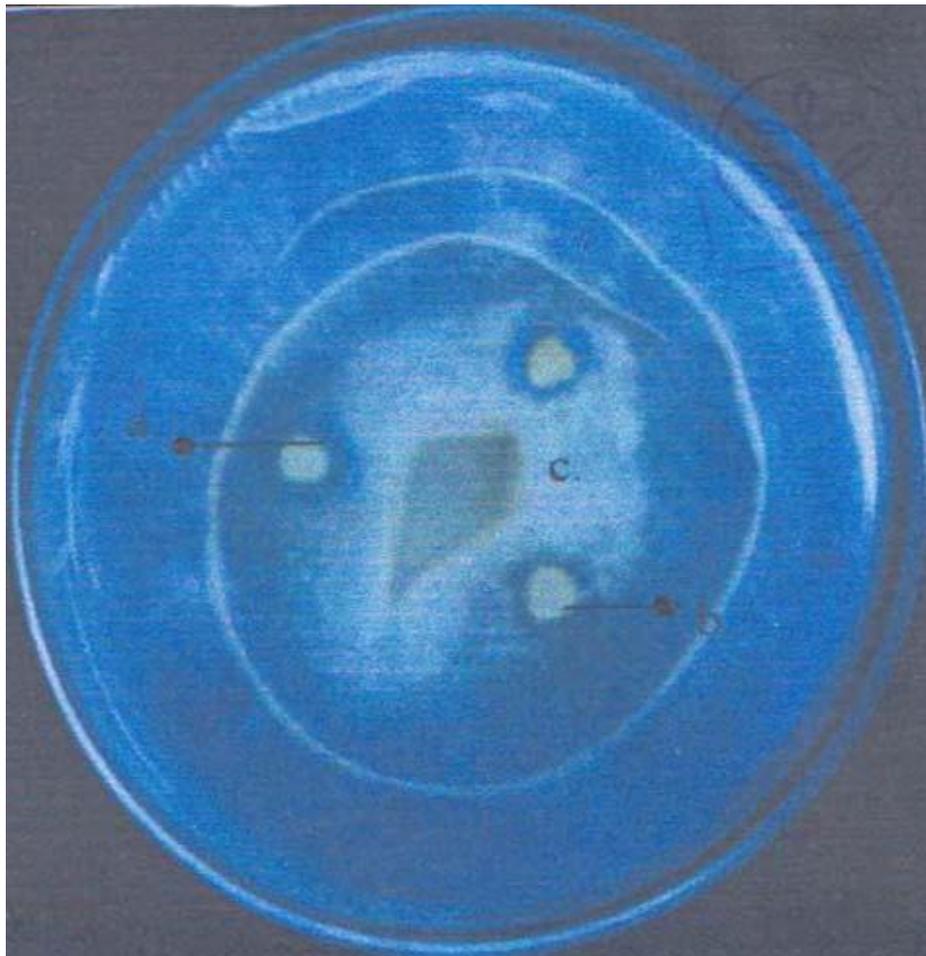
Beberapa bagian tumbuhan tingkat tinggi mampu menghasilkan substansi antifungal yang dapat menghambat pertumbuhan cendawan sebelum maupun sesudah infeksi (Kuhn *et al.*, 1987). Substansi tersebut dapat berupa senyawa molekular berbobot tinggi maupun rendah. Senyawa-senyawa tersebut antara lain bahan polimer kutikula, lectin, phytoalesin, dan beberapa zat lainnya (Kuhn *et al.*, 1987).

Tingginya konsentrasi ekstrak seduh yang harus dipakai untuk menghambat pertumbuhan cendawan mengakibatkan efisiensi ekstrak seduh daun ketapang dan daun sirih sangat rendah. Hal tersebut dapat disebabkan oleh faktor pelarut (*menstrum*) air yang dipakai. Air sebagai pelarut hanya dapat melarutkan dengan baik sebagian besar senyawa seperti gom, amilum, pigmen, dan tanin (Ansel, 1989). Akan tetapi sebagian besar senyawa tersebut bukanlah senyawa primer yang berperan besar dalam penghambatan aktivitas suatu jenis cendawan.

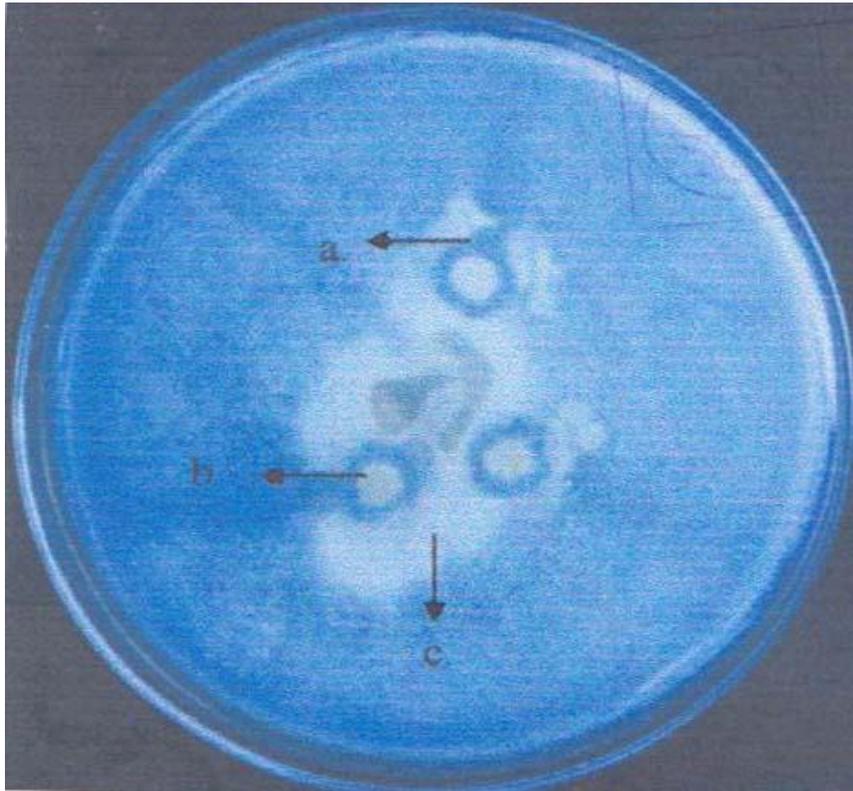
Minyak atsiri yang terdapat dalam daun sirih terbukti dapat dijadikan bahan antifungal dan pengobatan terhadap infeksi mikroba tertentu (Robinson, 1991). Akan tetapi, karena cenderung bersifat volatil pada suhu yang tinggi dan kemampuan larutnya dalam pelarut air rendah (Robinson, 1991), menjadikannya tersedia sangat sedikit di dalam bahan ekstrak seduh daun sirih.



Gambar 2. Interaksi faktor daun dan faktor konsentrasi dalam penghambatan miselia cendawan *Aphanomyces* sp. secara *in vitro*



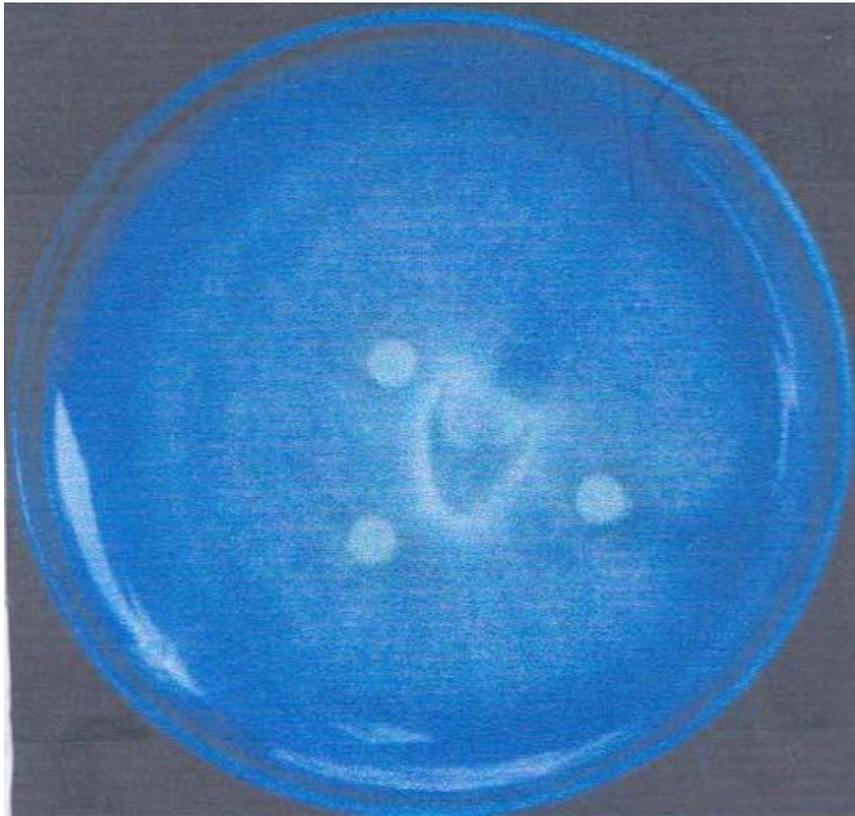
Gambar 3. Penghambatan pertumbuhan cendawan *Aphanomyces* sp. dengan ekstrak seduh daun sirih (*Piper betle* L.). Zona hambat (a), kertas saring (b) dan hifa *Aphanomyces* sp. (c).



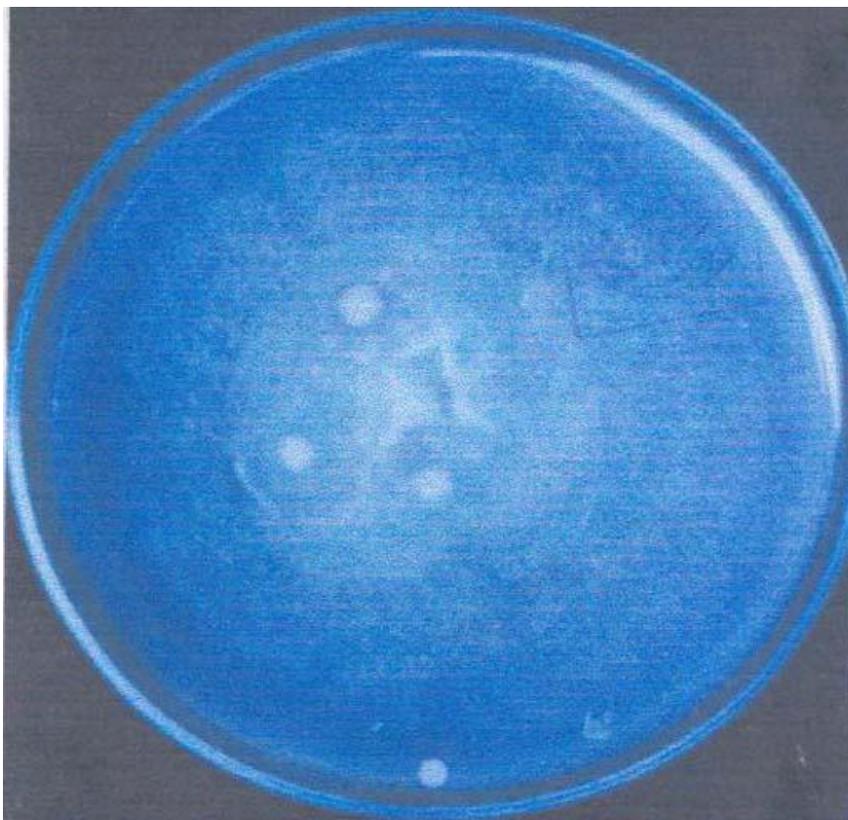
Gambar 4. Pertumbuhan cendawan *Aphanomyces* sp. pada perlakuan ekstrak seduh daun ketapang (*Terminalia cattapa* L.). Zona hambat (a), kertas saring (b) dan hifa *Aphanomyces* sp. (c).



Gambar 5. Pertumbuhan cendawan *Aphanomyces* sp. pada perlakuan ekstrak seduh daun jambu biji (*Psidium guajava* L.).



Gambar 6. Pertumbuhan cendawan *Aphanomyces* sp. pada perlakuan ekstrak seduh daun sambiloto (*Andrographis peniculata* (Burm. F) Ness).



Gambar 7. Pertumbuhan cendawan *Aphanomyces* sp. pada kontrol.

Efektivitas bahan antifungi terbagi kedalam tiga kategori, yaitu tinggi ($< 10 \text{ mg L}^{-1}$), menengah ($10\text{--}100 \text{ mg L}^{-1}$), dan rendah ($< 100 \text{ mg L}^{-1}$). Bahan antifungi tersebut harus memenuhi kriteria tertentu untuk dapat disebut efektif (Bailey *dalam* Bruno, 1999), antara lain:

1. Suatu bahan antifungi yang akan dipakai memiliki efek pada konsentrasi kurang dari 100 mg dalam 1 liter pelarut.
2. Harus mampu menunjukkan aktifitas dalam waktu 1 jam setelah pemakaian, kecuali dalam aplikasi di lapangan sebenarnya.
3. Harus dapat dilarutkan dengan mudah dalam bahan pelarut homogen untuk efisiensi waktu kontak.
4. Harus dapat menunjukkan efek penghambatan terhadap miselia cendawan minimal 48 jam setelah pemakaian.
5. Harus memiliki batasan yang jelas antara konsentrasi pengobatan dan konsentrasi peracunan.

Berdasarkan kriteria di atas, ekstrak seduh daun ketapang dan daun sirih tidak termasuk bahan antifungal yang efektif melalui pendekatan secara *in vitro*. Walaupun beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kedua ekstrak seduh dari daun tersebut memiliki efek antimikroba (Mgbemene *et al.*, 1999; Yulita, 2001).

Ada beberapa hal yang juga bisa dipertimbangkan mengenai kemampuan penghambatan suatu bahan ekstrak terhadap mikroba, yaitu konsentrasi minimal yang diperlukan untuk aksi penghambatan, jumlah atau banyaknya populasi mikroba yang akan dihambat dan kondisi lingkungan yang mempengaruhi daya hambat bahan dan daya tahan mikroba (Pelczar, 1986). Sedangkan untuk uji *in vivo*, daya tahan hewan uji terhadap toksisitas bahan ekstrak juga harus dipertimbangkan.

Untuk uji penghambatan dengan memakai ekstrak seduh daun jambu biji dan daun sambiloto, tidak terlihat adanya aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan cendawan *Aphanomyces* sp. Hal tersebut terlihat dari pertumbuhan miselia cendawan yang dapat menutup dan

melewati kertas saring yang telah dicelupkan ke dalam bahan ekstrak. Kondisi tersebut dapat dimungkinkan oleh faktor kandungan fitokimia dari kedua jenis daun tersebut dan dari bahan pelarutnya. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu biji memiliki kemampuan sebagai antibakteri (Yulita, 2001). Akan tetapi zat anti bakteri dalam waktu yang bersamaan belum tentu dapat berperan sebagai zat antifungi.

Aksi penghambatan bahan ekstrak terhadap perkembangan suatu jenis mikroba dapat berspektrum luas maupun sempit, tergantung jenis dan perbedaan maupun persamaan struktur mikroba yang akan dihambat. Oleh karena itu, beberapa jenis mikroba dapat menunjukkan respon dan reaksi yang sama ketika mendapatkan suatu perlakuan, dikarenakan adanya persamaan struktur sel. Akan tetapi suatu waktu didapatkan perbedaan reaksi dan respon yang berbeda antara suatu jenis mikroba dengan mikroba lainnya dikarenakan adanya perbedaan struktur sel. Adanya perbedaan karakteristik yang nyata pada struktur dan sifat sel antara bakteri dan fungi menyebabkan beberapa jenis bahan obat herbal maupun kimia yang bersifat antibakteri tidak bisa bersifat antifungi atau sebaliknya.

Dari beberapa penelitian, daun sambiloto berpotensi sebagai immunostimulan (Yulita, 2001). Potensi ini tidak memberikan pengaruh langsung terhadap cendawan *Aphanomyces* sp secara *in vitro*. Potensi immunostimulan akan bermanfaat setelah dimetabolisir oleh hewan budidaya untuk meningkatkan respon imunitas non spesifik hewan budidaya. Hal tersebut membuat ekstrak seduh daun sambiloto secara *in vitro* tidak memberikan pengaruh yang berarti dalam menghambat pertumbuhan hifa cendawan *Aphanomyces* sp.

Pemilihan jenis pelarut yang tidak tepat juga dapat dijadikan pertimbangan atas kegagalan bahan ekstrak atau obat dalam menunjukkan aktivitas penghambatannya terhadap cendawan *Aphanomyces* sp. Dalam suatu ekstraksi, pelarut yang berbeda akan menghasilkan ekstrak yang sifatnya berbeda pula. Perbedaan tersebut dapat dilihat dari

segi jenis zat aktif yang dilarutkan, sifat farmakologis dari zat aktif, maupun dari segi stabilitas bahan ekstrak dan potent (kekerasan/kekuatan) bahan obat pada cendawan *Aphanomyces* sp. (Ansel, 1989).

KESIMPULAN

Dari empat jenis ekstrak seduh yang digunakan (daun ketapang, sirih, jambu biji, dan sambiloto), hanya daun ketapang dan sirih yang menunjukkan aktivitas antifungi terhadap *Aphanomyces* sp. pada media biakan GYA secara *in vitro*. Daun yang memberikan aktivitas penghambatan terbaik dalam adalah daun ketapang dengan konsentrasi 40 g dalam 1 liter pelarut.

Konsentrasi tinggi yang didapatkan menunjukkan bahwa ekstrak seduh daun ketapang dan daun sirih belum bisa digolongkan sebagai antifungi yang efektif secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alifuddin, M. 2003. Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Ikan. Bacaan Kuliah dan Praktikum. Laboratorium Kesehatan Ikan. Jurusan Budidaya Perairan. Institut Pertanian Bogor.
- Alderman, D. J. 1986. Fungal Diseases of Aquatic Animal. In: R. J. Roberts (Ed.). Microbial Diseases of Fish. Academic Press. New York.
- Anderson, D. P. 1974. Fish Immunology. T. R. H. Publication, Inc. Ltd. United State of America. P: 45-55.
- Ansel, H. D. C. 1989. Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi. Terjemahan Farida Ibrahim. UI Press. Jakarta. Hal: 605-607.
- Bruno, D. W. and B. P. Wood. 1999. Fish Diseases and disorders. Vol. III: Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing. Canada. P: 526-636.
- Butterwort, Heinemann. 1992. In Vitro Cultivation of Microorganism. BIOTOL, Biology by Open Learning. Oxford. United Kingdom. P: 254.
- Garraway, M. O. and R. C. Evans. 1984. Fungal Nutrition and Physiology. John Willey and Sons. New York. P:137-155.
- Keon, J. P. R., R. J. W. Byrde., R. M. Cooper. 1987. Fungal Infection of Plants. Chapter 7: Some Aspects of Fungal Enzymes That Degrade Plant Cell Walls. British Mycological Society. University Press Cambridge. P: 133.
- Knoche, H. W. and J. P. Duvik. 1987. Fungal Infections of Plants. Chapter 8: The Role of Fungal Toxin in Plant Disease. British Mycological Society. Cambridge. P: 158.
- Kuhn, P. J., John A. Hargreaves, 1987. Fungal Infections of Plants. Chapter 9. British Mycological Society. Cambridge. P: 193.
- Mgbemene, C. N. and F. C. Ohiri, 1999. Anti Sickling Potential of *Terminalia catappa* Leaf Extract. Pharmeceutical Biology. Vol. 37. No 2. University of Nigeria, Department of Pharmacognosy. Nsukka. Nigeria. P: 152-154.
- Pelczar, J. L. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi. Terjemahan Ratna Siri Hadioetomo. UI Press. Jakarta.
- Steel, R. G. B. and Torrie. 1989. Prinsip dan Prosedur Statistika. Gramedia. Jakarta.
- Yulita, I. 2002. Efektifitas bubuk daun jambu biji (*Psidium guajava* L), daun sirih (*Piper betle* L) dan daun sambiloto (*Andrographis peniculata* (Burm. F.) Ness) untuk pencegahan dan pengobatan pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepenus*) yang diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB. Bogor.