



## UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI *Vibrio* sp. DENGAN EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)

### ANTIBACTERIAL ACTIVITY TESTING OF EXTRACT SOURSOP LEAVES (*Annona muricata* L.) AGAINST *Vibrio* sp.

Anggreni Sianturi<sup>1</sup>, Hendro Hitijahubessy<sup>1\*</sup>, Anastasia Putri Marshanda Rumangun<sup>1</sup>, Aprianti Samid<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Bioteknologi Perikanan, Politeknik Perikanan Negeri Tual, Tual - Indonesia

\*Corresponding Author e-mail: [hendro@polikant.ac.id](mailto:hendro@polikant.ac.id)

#### ABSTRACT

**Keywords :** Study of the antibacterial ability of soursop leaf extract (*Annona muricata* L.) in inhibiting Soursop leaves; the growth of *Vibrio* sp. The maceration method with 70% ethanol solvent was used in this research to determine the yield, then the extract was diluted in stages from a concentration of 100% to 3.125%. The antibacterial test was done using the disc diffusion method in TCBS media and a phytochemical test was carried out on soursop leaves to analyze the secondary metabolite content. The extract yield obtained in this study was 3.77%. The test results showed that the largest zone of inhibition was found at 100% extract concentration of 11.45mm. The smallest inhibition zone was found in the 6.25% extract with an inhibition zone of 1.44mm, the diameter of the positive control (tetracycline) inhibition zone was 22.75mm, the diameter of 10% DMSO as a negative control was 0 mm. Phytochemical tests of soursop leaves show that they contain alkaloids, flavonoids, steroids, saponins and tannins.

#### Article History:

Received: 28 Juli 2023

Revised: 26 November 2023

Accepted: 30 November 2023

© 2023 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Pattimura

#### How to cite:

Sianturi A, Hitijahubessy H, Rumangun APM, and Samid A. 2023. Antibacterial activity testing of extract soursop leaves (*Annona muricata* L.) against *Vibrio* sp. Biofaal Journal. 4(2): 72-80.

Copyright © 2023 Biofaal Journal

Homepage: <https://ojs3.unpatti.ac.id/index.php/biofaal/index>

E-mail: [biofaaljournal@gmail.com](mailto:biofaaljournal@gmail.com)



This article is an open access article distributed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

## A. PENDAHULUAN

*Vibrio* adalah bakteri yang merupakan bagian dari lingkungan laut (Manchanayake et al., 2023). Bakteri ini bersifat patogen dalam dan dapat hidup dalam air laut beriklim tropis (Ina-Salwany et al., 2019). *Vibrio* sp. adalah dasar dari penyakit vibriosis yang menyerang berbagai biota laut (Egerton et al., 2018). Penyakit vibriosis sering terjadi pada ikan (Nor et al., 2019). Infeksi bakteri *Vibrio* diduga menjadi penyebab tingkat kelangsungan hidup sehingga selalu menurunkan kualitas produksi (Peterman & Posadas, 2019).

Sampai saat ini pengendalian *Vibrio* sp. biasanya dilakukan dengan menggunakan antibiotik, tetapi bakteri ini telah mengembangkan resistensi terhadap beberapa antibiotik. Hal ini dipengaruhi oleh kondisi genetik dari bakteri yang mengalami perubahan terhadap lingkungan sehingga mampu bertahan melawan antibiotik (Leonard et al., 2023). Penggunaan antibiotik secara terus menerus dapat membuat mikroorganisme patogen kebal terhadap antibiotik (Onohuean et al., 2021), sehingga perlu dicari antibakteri lainnya yang lebih efektif sebagai pengganti antibiotik yang berasal dari bahan alam. Oleh karena itu, dalam penelitian ini perlu dicari zat antibakteri dari bahan alam yang dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio* sp.

Menurut Silalahi, 2020, salah satu tanaman yang memiliki sifat antibakteri dan antikanker adalah daun sirsak (*Annona muricata* L). Penelitian Utami, 2022 menyatakan bahwa Daun sirsak mengandung senyawa flavonoid yang memiliki efek antivirus dan antibakteri. Penelitian tentang antibakteri dari bahan alami terhadap bakteri *Vibrio* sp. masih belum banyak diteliti. Berdasarkan bioaktivitas daun sirsak sebagai antibakteri, maka perlu diteliti lebih lanjut efektifitas antibakteri dalam ekstrak daun sirsak untuk menghambat pertumbuhan *Vibrio* sp. dan dilakukan uji fitokimia agar dapat menganalisis metabolit sekunder apa saja yang kemungkinan dapat berperan sebagai antibakteri.

## B. METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian bertempat pada Laboratorium HPI (Hama dan Penyakit Ikan) UPTD Balai Budidaya Tual yang dilaksanakan dari tanggal 5 Desember 2022 sampai dengan 10 Januari 2023.

### Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Pembakar spiritus, *incubator air concept*, *incubator bio concept*, *autoclave*, *hot plate*, neraca, *gloves sterill*, oven, evaporator, cawan *petridish*, saringan 40 mesh, tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, spatula, gelas kimia, pipet tetes, pinset, sarbet, *Bunsen*, Neraca analitik, *colloni counter*, *blender*, nampan, mortar dan alu.

#### 2. Bahan

Air laut dari pesisir pantai Watdek Kabupaten Maluku Tenggara, daun sirsak, media *Thiosulfate citrate bile salts sucrose* (TCBS), akuades, etanol, *cotton swab sterill*, kertas cakram antibiotik tetrasiklin, kertas cakram kosong dan *Tissue*.

## Prosedur Penelitian

### *Pembuatan Ekstrak*

#### *1. Preparasi sampel*

Daun sirsak muda diambil sebanyak 3 kg dan dibersihkan dengan air mengalir untuk membersihkan pengotor pada daun. Kemudian daun sirsak diletakkan di atas nampan untuk ditiriskan dan dikeringkan selama 5 hari.

#### *2. Pembuatan Ekstrak*

Sampel daun yang telah dibersihkan kemudian dikeringkan selama 5 hari. Daun kering yang diperoleh kemudian digiling dengan blender dan diayak dengan ayakan 60 mesh hingga menjadi bubuk. Prosedur ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini adalah ekstraksi dengan metode perendaman pada suhu ruang atau sering dinamai aserasi. Hasil perendaman kemudian disaring dengan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan ampas. cayang dihasilkan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer kemudian pelarut yang terdapat pada ekstrak dihilangkan sehingga diperoleh ekstrak pekat berupa pasta. Proses penguapan ekstrak cair menjadi pasta dilakukan dalam oven pada suhu 78°C (Bintoro et al., 2017).

#### *3. Pengenceran Ekstrak, Kontrol Positif dan Kontrol Negatif.*

Ekstrak daun yang masih berbentuk pasta dikeringkan pada suhu 78°C dalam oven. Ekstrak 100% didapatkan dari pasta hasil ekstraksi daun sirsak. Ekstrak 75% dibuat dari 3,75 gram bubuk ekstrak yang dilarutkan dalam 0,5 ml DMSO dan 5 ml air suling, kemudian diencerkan secara bertingkat. Untuk membuat ekstrak 50% diambil 2,5 ml dari ekstrak 75% dan dilarutkan dalam campuran 10 ml air suling dan 0,5 ml DMSO. Selanjutnya untuk membuat ekstrak 25% diambil 2,5 ml dari ekstrak 50% dilarutkan dengan dalam campuran 5 ml air suling dan 0,5 ml DMSO dan dilakukan pengenceran selanjutnya dengan cara yang sama sampai konsentrasi 3,125%. Kontrol positif menggunakan kertas cakram yang berisi antibiotik tetrasiklin dan kontrol negatif DMSO 10%.

#### *4. Penentuan Rendemen Ekstrak*

Rendemen menjelaskan bahwa hasil ekstrak dibagi dengan berat daun kering dikali 100% (Sudarmadji & Haryono, 1996).

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat ekstrak bubuk daun}} \times 100\%$$

### *Uji Aktivitas Antibakteri*

#### *1. Sterilisasi Alat dan bahan*

Sebelum melakukan prosedur sterilisasi, alat yang digunakan terlebih dahulu dicuci dengan detergen, dibilas dengan air bersih dan dikeringkan. Untuk instrumen seperti pipet, cawan petri dan tabung reaksi, terlebih dahulu dibungkus dengan kertas kepiting dan disterilkan dalam oven pada suhu 170°C (Irmawati & Sudirjo, 2012).

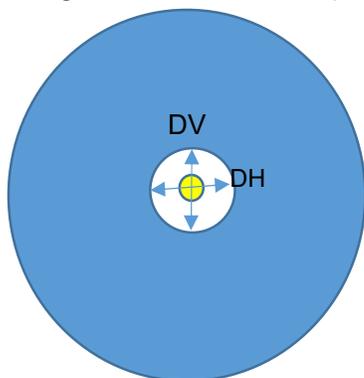
## 2. Preparasi Sampel Air Laut

Air laut sebagai sample diambil menggunakan botol yang telah disterilkan, kemudian diisi dengan sampel air laut yang diambil dari Pantai Watdek Kabupaten Maluku Tenggara langsung digunakan untuk analisis selanjutnya.

## 3. Metode Disc Diffusion Kirby-Bauer

Air suling sebanyak 100 ml disiapkan, kemudian dilarutkan 8,8 gram media TCBS dalam gelas erlenmeyer, kemudian gelas erlenmeyer disumbat memakai kapas dan dirapatkan sumbatan dengan *aluminium foil*, proses selanjutnya dipanaskan hingga media mendidih berbuih. Bakteri dikultur dari sampel air laut yang digoresi (*streak plate*) dengan *cotton swab sterill* pada media TCBS yang sudah didinginkan (Difco, 1977). Tahapan berikutnya kertas cakram antibiotik (kontrol positif), kertas cakram yang direndam dalam DMSO10% (kontrol negatif) serta kertas cakram yang direndam dalam ekstrak konsentrasi 100% sampai 3,125%, masing-masing ditempelkan di atas media yang sebelumnya telah digoresi, kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama ±24 jam. Ekstrak yang digunakan pada konsentrasi 100%, yaitu konsentrasi ekstrak yang berbentuk pasta. Diameter zona yang diukur dengan daerah zona bening yang akan terlihat disekitar cakram (Ernawati, 2015).

## 4. Pengukuran zona hambat (Toy et al., 2015)



$$\text{Zona hambat} = \frac{(DV - DKC) + (DH - DKC)}{2}$$

Keterangan :

DV :Diameter zona bening vertical  
 DH :Diameter zona bening horizontal  
 DKC :Diameter cakram

## Uji Fitokimia (Sangi et al., 2019)

Uji fitokimia adalah analisis kualitatif dalam ilmu bahan alam dan kajian fiktokimia dalam penelitian ini meliputi uji flavonoid, alkaloid, triterpen, steroid, saponnin dan tannin.

### 1. Analisis senyawa alkaloid

Timbang 4 g bubuk daun, ditambahkan beberapa ml kloroform dan dihaluskan kembali. Amonia dan kloroform kemudian ditambahkan dengan perbandingan 1:1. Larutan disaring melalui tabung reaksi dan ditambahkan 10 tetes asam sulfat 2N ke dalam filtrat. Filtrat vortex kemudian didiamkan beberapa saat hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan atas dihilangkan dan ditempatkan dalam tiga tabung reaksi hingga 2,5 ml. Ketiga larutan ini direaksikan dengan pereaksi Mayer, Dragendorff dan Wagner. Adanya endapan menunjukkan bahwa sampel mengandung alkaloid. Reaksi dengan pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih, dengan pereaksi Dragendorff endapan jingga-merah dan dengan pereaksi Wagner endapan coklat.

## 2. Analisis senyawa triterpenoid dan steroid

±50-100mg sampel bubuk daun dimasukkan dalam tabung reaksi dan tambahkan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  asetat anhidrat hingga semua sampel terendam seluruhnya, diamkan selama ±15 menit, tambahkan 6 tetes larutan asam sulfat pekat ke dalam tabung. Terbentuknya triterpenoid 2-3 tetes ditandai dengan jika muncul warna merah jingga atau ungu. Pembentukan steroid ditandai dengan munculnya larutan biru.

## 3. Analisis senyawa flavanoid

Bubuk daun sebanyak 200 mg diekstraksi dengan 5 ml etanol dalam tabung reaksi dan selama ±5 menit ditaruh diatas Bunsen. Selain itu, beberapa tetes HCl pekat dimasukkan dalam tabung. Kemudian tambahkan 0,2 g bubuk Mg dalam tabung. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan munculnya warna merah tua (magenta) dalam waktu ±3 menit.

## 4. Analisis senyawa saponin

Tabung reaksi disiapkan dan dimasukkan 2 g sampel bubuk daun, ditambahkan air suling hingga sampel tenggelam, didihkan 2-3 menit dengan bunsen, dinginkan, dikocok dengan vortex. Adanya busa yang stabil menunjukkan positif saponin.

## 5. Analisis senyawa tannin

Dalam tabung reaksi 20mg bubuk daun direndam dengan etanol 96%. Diambil 1 ml larutan dituang dalam tabung dan ditambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$  1% sebanyak 2-3 tetes. Adanya tanin ditunjukkan dengan warna larutan menjadi biru tua atau hijau.

## Analisis Data

Hasil kajian aktivitas antibakteri dengan metode *disc diffusion* berupa zona bening, selanjutnya dilakukan analisis data yang didasarkan pada analisa diameter zona hambat dan daya hambat bakteri oleh Greenwood et al., 1995 pada tabel 1.

Tabel 1. Diameter zona dan daya hambat

Diameter zona hambat	Daya hambat bakteri
$D > 20$	Golongan Kuat
$15 < D < 20$	Golongan Sedang
$10 < D < 15$	Golongan Lemah
$D < 10$	Tidak ada daya hambat

Keterangan: D = diameter

## C. HASIL DAN PEMBAHASAN

### Rendemen Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

Rendemen ekstrak dalam penelitian inididapatkan dari berat ekstrak kering (pasta) sebesar 13,2119 gram dibagi berat bubuk daun sirsak sebesar 350 gram dikalikan 100%. Maka persen rendemen ekstrak dalam penelitian ini dapat diperoleh sebesar 3,77 %. Dalam penelitian ini dilakukan Analisis Kuantitatif pertama dengan menentukan nilai rendemen ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.). Perhitungan rendemen ekstraksi bertujuan untuk menentukan jumlah potensi ekstrak yang larut etanol 70%. Pelarut yang digunakan untuk perendaman atau maserasi adalah etanol yang sifatnya polar hingga mampu

mengekstraksi senyawa bioaktif lebih banyak karena sebagian besar senyawa bioaktif bersifat polar. Pemilihan pelarut sangat mempengaruhi senyawa bioaktif yang akan larut dalam pelarut tersebut. Pelarut polar akan melarutkan senyawa-senyawa senyawa bioaktif yang bersifat polar, sedangkan pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa bioaktif yang bersifat nonpolar. Etanol adalah pelarut umum yang digunakan sebagai pelarut untuk proses maserasi karena hampir semua senyawa bioaktif dapat terikat dalam pelarut etanol. Sehingga pelarut ini sering disebut *magic solvent*.

### Pengujian Zona Hambat

Data pengukuran zona hambat dari pengenceran bertingkat ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 100%, sampai 3,125% dengan perlakuan sebanyak dua kali (duplo), kontrol positif adalah 30 mg tetrasiklin dalam bentuk cakram antibiotik, kontrol negatif adalah cakram dalam larutan dimetil sulfooksida 10% (DMSO), datanya ditampilkan dalam tabel 2.

Tabel 2. Data Zona Hambat dan Daya Hambat

No	Sampel	Zona hambat (mm)	Daya Hambat (Greenwood, 1995)
1	Ekstrak DS 100%	11.45	Sedang
2	Ekstrak DS 75%	3.52	Lemah
3	Ekstrak DS 50%	2.95	Lemah
4	Ekstrak DS 25%	2.8	Lemah
5	Ekstrak DS 12,5%	2.25	Lemah
6	Ekstrak DS 6,25%	1.44	Lemah
7	Ekstrak DS 3,125%	0	-
8	Kontrol (+)	22.75	Sangat kuat
9	Kontrol(-)	0	-

Keterangan: DS: Daun Sirsak; Kontrol (+): Tetrasiklin 30 mg; Kontrol (-): DMSO 10%

Dalam penelitian ini zona hambat terbesar didapatkan dalam ekstrak konsentrasi 100% sebesar 11,45mm. Zona hambat yang paling kecil didapatkan dalam konsentrasi 6.25% sebesar 1,44mm, kontrol positif (tetrasiklin) sebesar 22,75 mm dan kontrol negatif yaitu DMSO 10% sama sekali tidak membentuk zona hambat. maka dapat dilihat dari hasil rata-rata pengujian zona hambat menunjukkan adanya aktivitas antibakteri yang sedang dari ekstrak daun sirsak pada konsentrasi 100%, aktivitas antibakteri bersifat lemah pada konsentrasi 75% sampai 3,125%. Jika aktivitas antibakteri dibandingkan dengan kontrol positif yang merupakan antibiotik tetrasiklin dalam 30 mg, maka hasil antibitotik masih tergolong sangat kuat sebagai antibakteri dibandingkan ekstrak daun sirsak 100% yang bersifat sedang.

Penggunaan DMSO 10% digunakan sebagai kontrol negatif dimaksudkan untuk menjadi perbandingan yang mana tidak akan membentuk zona hambat karena bersifat sebagai pelarut ekstrak. DMSO yaitu pelarut yang dapat melarutkan zat polar yang sukar larut dalam air suling. Penggunaan tetrasiklin 30 mg sebagai kontrol positif sebagai pembanding antibiotik atau antibakteri yang sudah merupakan senyawa murni yang sudah dapat dipastikan dapat membentuk zona hambat. Metode pengujian antibakteri dalam penelitian ini menggunakan kertas cakram untuk membantu proses inhibisi bakteri dengan ekstrak atau sering disebut sebagai metode difusi cakram. Metode ini didasarkan pada besar atau diameter

zona hambat yang dibentuk dan hasilnya dalam satuan milimeter. Kelemahan dari metode ini adalah keberadaan zona bening yang sangat sulit ditentukan apabila media memberikan warna tertentu, sehingga zona hambat sulit diukur dengan teliti (Saraswati, 2018; Wayne, 2006).

### 1. Uji Fitokimia Daun Sirsak

Uji fitokimia dari daun sirsak adalah hal yang perlu dilakukan dalam penelitian ini. Hal ini dilakukan bertujuan untuk mencari tahu kandungan senyawa bioaktif yang dapat berfungsi sebagai antibakteri. Hasil uji fitokimia daun sirsak bisa dilihat dalam tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji fitokimia Daun Sirsak

No	Uji fitokimia	Hasil uji	Keterangan
1	Alkaloid	+	
	Mayer	+	Adanya endapan putih
	Wagner	+	Terbentuknya endapan coklat
	Dragendorff	-	Tidak adanya endapan merah jingga
2	Triterpen	-	Tidak adanya warna ungu atau merah jingga
3	Steroid	+	Adanya warna biru yang Nampak
4	Flavonoid	+	Timbulnya warna magenta
5	Saponin	+	Munculnya buih yang stabil pada saat dikocok
6	Tanin	+	Terbentuknya biru tua atau hitam

Keterangan: (+): hasil uji menunjukkan adanya metabolit; (-): hasil uji tidak menunjukkan adanya metabolit.

Uji fitokimia adalah analisis kualitatif yang didasarkan pada munculnya warna dalam suatu reaksi kimia. Senyawa bioaktif yang dihasilkan dari uji fitokimia daun sirsak adalah alkaloid, flavonoid, steroid, saponin dan tannin. Terbentuknya Zona Bening dari uji antibakteri ekstrak daun sirsak terhadap bakteri *Vibrio* sp. menunjukkan adanya senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai antibakteri.

Senyawa bioaktif yang diperoleh dalam daun sirsak (*Annona muricata* L.) sangat berguna dalam menghambat *Vibrio* sp., adalah senyawa flavanoid yang pada umumnya bersifat polar karena memiliki gugus fenolik. Senyawa flavanoid sebagai antibakteri menghasilkan protein ekstraseluler dari gugus senyawa kompleks dan mudah larut akan merusak dinding sel bakteri dan diikuti rusaknya senyawa intraseluler. Senyawa flavanoid memperlambat pembentukan energi dan merusak sistem respirasi bakteri, karena bakteri membutuhkan energi untuk menyerap berbagai senyawa bioaktif dan biosintesis senyawa makromolekuler (Astuti, 2018). Senyawa lain yang dapat berfungsi sebagai antibakteri adalah alkaloid. Alkaloid dapat menghambat perkembangan bakteri dengan merusak membran sel dan merusak struktur protein sel bakteri yang menyebabkan bakteri tidak dapat bertumbuh (Utami, 2022). Tannin adalah salah satu senyawa bioaktif yang didapati juga dalam daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang berguna menginaktivasi kerapatan sel dan enzim dari suatu bakteri. Tannin juga dapat merusak distribusi protein di lapisan dalam sel. Fungsi lain senyawa tannin adalah merusak dinding sel bakteri, karena tannin dapat melarutkan dan merusak ikatan polipeptida yang berada pada dinding sel bakteri (Herwandi et al., 2019). Menurut Bontjura, 2015 menduga fungsi senyawa bioaktif steroid sebagai antibakteri yaitu merusak membran sel sehingga menjadi rapuh dan lisis. (Rijayanti, 2014) mengemukakan

tentang saponin mampu merusak ikatan peptidoglikan dari dinding sel bakteri dan melisis DNA bakteri dengan busa yang dibentuk oleh tumbuhan tersebut.

#### D. KESIMPULAN

Hasil ekstraksi etanol daun sirsak yang diperoleh dalam penelitian ini berupa rendemen sebesar 3,77%. Hasil uji zona hambat maksimum diperoleh pada konsentrasi ekstrak daun sirsak pada konsentrasi 100% sebesar 11,45 mm. Zona hambat terkecil terdapat pada ekstrak 6,25% sebesar 1,44 mm, diameter zona hambat kontrol positif (tetrakislin) 22,75 mm dan zona hambat kontrol negatif dalam hal ini adalah DMSO 10%, tidak terbentuk zona sama sekali. Uji fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini mengungkapkan kandungan senyawa bioaktif pada daun sirsak yaitu adanya alkaloid, flavonoid, steroid, saponin dan tanin.

#### E. UCAPAN TERIMA KASIH

Riset ini bisa dilakukan dengan baik karena adanya bantuan Dana Hibah dari Program Riset Mahasiswa dalam Pekan Ilmiah Mahasiswa di Politeknik Perikanan Negeri Tual Tahun 2022. Kami mengucapkan terima kasih untuk Wakil Direktur III Bidang Kemahasiswaan di Politeknik Perikanan Negeri Tual dan Tim dalam Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) *Corner* Politeknik Perikanan Negeri Tual yang telah mendorong kami untuk melaksanakan penelitian ini dari awal sampai selesai dengan sangat baik.

#### F. DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, N. D. (2018). *Efektivitas Obat Sirup Jahe Merah (Zingiber officinale var. rubrum) Terhadap Potensi Pertumbuhan Bakteri Escherichia coli*. FKIP UNPAS.
- Bintoro, A., Ibrahim, A. M., Situmeang, B., Kimia, J., & Cilegon, B. (2017). Analisis dan identifikasi senyawa saponin dari daun bidara (*Zhizipus mauritania* L.). *Jurnal Itekima*, 2(1), 84–94.
- Bontjura, S. (2015). Uji efek antibakteri ekstrak daun leilem (*Clerodendrum minahassae* l.) terhadap bakteri streptococcus mutans. *Pharmakon*, 4(4).
- Difco, L. (1977). Difco manual of dehydrated culture media and reagents for Microbiology and Clinical laboratory procedures. *Difco Laboratories*.
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, 9, 873.
- Ernawati, K. (2015). Kandungan senyawa kimia dan aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah alpukat terhadap bakteri *Vibrio auginolicus*. *Jurnal Kajian Veteriner*, 16, 203–211.
- Greenwood, D., Finch, R., Davey, P., & Wilcox, M. (1995). Antibiotics, susceptibility (Sensitivity) test antimicrobial and chemotherapy. *United State of America: Mc Graw Hill Company*.
- Herwandi, H., Mahyarudin, M., & Effiana, E. (2019). Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol annona muricata linn. terhadap vibrio cholerae secara in vitro. *Majalah Kedokteran Andalas*, 42(1), 11–21.
- Ina-Salwany, M. Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., & Zamri-Saad, M. (2019). Vibriosis in fish: a review on disease development and prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(1), 3–22.
- Irmawati, Y., & Sudirjo, F. (2012). Isolasi Bakteri Pada Rumput Laut *Kappaphychus alvarezii* yang Terpapar Ice-Ice. *Neritik*. Langgur.
- Leonard, R., Dewi, U. U., & Triastuti, R. R. J. (2023). Identifikasi Bakteri Dan Studi Resistensi Antibiotik Enrofloksasin Serta Histopatologi Pada Ikan Lele (*Clarias Gariepinus*) Di Kabupaten Pasuruan Jawa Timur. *Group: Fisheries Scientific Journal*, 14(2), 86–100.
- Manchanayake, T., Salleh, A., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., & Zamri-Saad, M. (2023). Pathology and pathogenesis of *Vibrio* infection in fish: A review. *Aquaculture Reports*, 28, 101459.

- Nor, N. M., Yazid, S. H. M., Daud, H. M., Azmai, M. N. A., & Mohamad, N. (2019). Costs of management practices of Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) cage culture in Malaysia using stochastic model that includes uncertainty in mortality. *Aquaculture*, 510, 347–352.
- Onohuean, H., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2021). Epidemiologic potentials and correlational analysis of *Vibrio* species and virulence toxins from water sources in greater Bushenyi districts, Uganda. *Scientific Reports*, 11(1), 22429.
- Peterman, M. A., & Posadas, B. C. (2019). Direct economic impact of fish diseases on the East Mississippi catfish industry. *North American Journal of Aquaculture*, 81(3), 222–229.
- Rijayanti, R. P. (2014). Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun mangga bacang (*Mangifera Foetida* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *Jurnal Mahasiswa PSPD FK Universitas Tanjungpura*, 1(1).
- Sangi, M., Runtuwene, M. R. J., Simbala, H. E. I., & Makang, V. M. A. (2019). Analisis fitokimia tumbuhan obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chemistry Progress*, 1(1), 47–53.
- Saraswati, D. K. (2018). Uji MIC (Minimum Inhibitory Concentration) Ekstrak Methanol Jamur Tiram Merah Muda (*Pleurotus flabellatus*) Terhadap Bakteri Multidrug Resistance *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Silalahi, M. (2020). *Annona muricata* (Kajian Pemanfaatan Dan Bioaktivitasnya Dalam Kesehatan). *Husada Mahakam: Jurnal Kesehatan*, 10(1), 52–62.
- Sudarmadji, S. S., & Haryono, B. (1996). Analisis Bahan Makanan dan Pertanian, Edisikedua. *Jogjakarta, : PenerbitLiberty*, 114–117.
- Toy, T. S. S., Lampus, B. S., & Hutagalung, B. S. P. (2015). Uji daya hambat ekstrak rumput laut *Gracilaria* sp terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. *E-GiGi*, 3(1).
- Utami, S. M. (2022). Studi Literatur Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Berbagai Sampel Bakteri. *Pharmaceutical Science Journal*, 2(1), 107–115.
- Wayne, P. A. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. *Approved Standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute*.