

UJI AKTIVITAS ANTIFUNGI EKSTRAK DAUN SIRIH (*Piper betle* L) TERHADAP *Saprolegnia* sp SECARA IN VITRO

ANTIFUNGAL ACTIVITIES TEST OF BETEL LEAF EXTRACT (*Piper betle* L) ON *Saprolegnia* sp. BY IN VITRO

Rahayu Kusdarwati, Pustika Murtinintias dan Dewa Ketut Meles

Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo - Surabaya, 60115 Telp. 031-5911451

Abstract

Saprolegniasis is a mycotic disease caused by *Saprolegnia* sp. that usually attacking wild fish and farming fish. *Saprolegnia* sp. cause a lot of harm in process of the fish cultivation. Prevention and treatment of the common practice is use chemical drugs, but the use of these chemicals tend to be environmentally unfriendly and there are karsinogenik effect. Therefore, the use of traditional medicines is one of alternative to control *Saprolegnia* sp. safer than chemical drugs. Green betel leaf contains phenolic compounds and tannins are efficacious as antifungal agent.

This study aims to prove the antifungal activity of extracts of betel leaf (*Piper betle* L) for *Saprolegnia* sp., and to know the minimum concentration of betel leaf extract (*Piper betle* L) as antifungal for *Saprolegnia* sp. The design of this experiment is used completely randomized design (CRD) with 11 treatments and 3 replications. This study used the dilution method through the Minimum Inhibitory Concentration determination (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC). The concentration of the extract used was 50% (0.5 g/ml), 25% (0.25 g/ml), 12.5% (0.125 g/ml), 6.25% (0.0625 g/ml), 3.13% (0.0313 g/ml), 1.56% (0.0156 g/ml), 0.78% (0.0078 g/ml), 0.39% (0.0039 g/ml), 0.2% (0.002 g/ml) of betel leaf extract. A positive control containing 2 ml of 3% hydrogen peroxide were added fungal suspension until 4 ml Negative control containing 2 ml of 10% DMSO were added fungal suspension until 4 ml.

The main parameters in this study is the value of optical density (OD) for MIC (Minimum Inhibitory Concentration) test and the absence of *Saprolegnia* sp. growing on SDA media for MFC (Minimum Fungicidal Concentration) test. 0.20% (0.002g/ml) concentration of of betel leaf extract is the minimum concentration that can inhibit the growth of *Saprolegnia* sp. MFC test results showed concentrations of 0.78% (0.0078 g/ml) betel leaf extract is the minimum concentration that can kill *Saprolegnia* sp.

Keywords : betel leaf, *Saprolegnia* sp., antifungal

Pendahuluan

Saprolegnia sp. merupakan penyebab penyakit saprolegniasis yang banyak menyebabkan kerugian pada proses budidaya ikan. Upaya pencegahan dan pengobatan yang lazim dilakukan pada ikan-ikan yang terkena penyakit mikotik adalah menggunakan obat-obatan kimia seperti *malachite green*, formalin, *hydrogen peroxida*, dan sebagainya. Akan tetapi penggunaan bahan kimia cenderung tidak ramah lingkungan dan ada yang bersifat karsinogenik (Mayer, 2005). Oleh karena itu, pemakaian obat-obatan tradisional merupakan salah satu alternatif pengendalian *Saprolegnia* sp. yang lebih aman. Daun sirih hijau mengandung beberapa komponen berkhasiat, dua diantaranya yang bersifat fungisida adalah kavikol dan karvakrol (Heyne, 1987) selain itu Rahmah dan Aditya (2010) menyatakan bahwa senyawa fenolik dan tannin pada ekstrak daun sirih

bersifat antifungi. Oleh karena itu tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas daun sirih sebagai antifungi terhadap *Saprolegnia* sp. secara in vitro.

Tujuan penelitian sebagai berikut : Untuk membuktikan ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) mempunyai aktivitas sebagai antifungi terhadap *Saprolegnia* sp. Untuk mengetahui konsentrasi minimum ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) sebagai antifungi terhadap *Saprolegnia* sp.

Manfaat dari riset ini adalah memberikan informasi mengenai aktivitas ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) sebagai antifungi terhadap *Saprolegnia* sp, serta memberikan informasi tentang konsentrasi minimum ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) yang dapat dipergunakan sebagai antifungi terhadap *Saprolegnia* sp. secara in vitro.

Metodologi

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga pada bulan November sampai Desember 2012. Pembuatan ekstrak daun sirih dilakukan di Unit Layanan Pengujian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

Metode penelitian

Rancangan Percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 11 perlakuan dan 3 kali ulangan. Penelitian ini menggunakan metode pengenceran (*dilution methods*) melalui penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 50% (0,5 gram/ml), 25% (0,25 gram/ml), 12,5% (0,125 gram/ml), 6,25% (0,0625 gram/ml), 3,13% (0,0313 gram/ml), 1,56% (0,0156 gram/ml), 0,78% (0,0078 gram/ml), 0,39% (0,0039 gram/ml), 0,2% (0,002 gram/ml) dari ekstrak daun sirih. Kontrol positif berisi 2 ml *hydrogen peroksida* 3% yang ditambah suspensi fungi sampai 4 ml. Kontrol negatif berisi 2 ml DMSO 10% yang ditambah suspensi fungi sampai 4 ml.

Prosedur penelitian

A. Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua peralatan dan bahan yang dipakai dalam penelitian ini disterilisasi untuk mematikan semua mikroorganisme yang hidup agar tidak terjadi kontaminasi. *autoclave* dengan suhu 121⁰C dan tekanan udara 1,5 atm selama 15 menit.

B. Ekstraksi Daun Sirih

Daun sirih didapatkan dari Nganjuk dan dipilih daun yang berukuran 7-8 cm dan berwarna hijau segar. 1,5 daun sirih yang telah didapatkan dicuci kemudian diangin-anginkan hingga kering lalu digiling. 500 gram serbuk daun sirih tersebut kemudian direndam dalam larutan *n-hexane* selama 5 hari untuk menghilangkan klorofil yang terkandung didalamnya. Ekstraksi dilakukan dengan memaserasi serbuk daun sirih dengan etanol 95% selama 3 x 24 jam dan selanjutnya disaring menggunakan kertas saring. Hasil penyaringan diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 70⁰C dan menghasilkan 39 gram ekstrak daun sirih. Hasil ekstraksi berbentuk kental, berwarna coklat tua dan beraroma khas minyak atsiri

C. Kultur *Saprolegnia* sp.

Saprolegnia sp. yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya

diambil dengan menggunakan ose lalu ditanam pada media kultur kemudian diinkubasi pada suhu kamar (25⁰C) selama 48 jam. Menurut Akbar (2010), proses pemurnian dari isolat *Saprolegnia* sp. dapat dilakukan lagi dengan cara mengkultur ulang fungi yang sudah tumbuh pada media SDA dengan menggunakan jarum ose steril.

D. Identifikasi Fungi

Identifikasi dilakukan untuk memastikan fungi yang digunakan adalah benar *Saprolegnia* sp. Identifikasi *Saprolegnia* sp. dapat dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis dilakukan dengan melihat bentuk dan warna koloni dari *Saprolegnia* sp., koloni *Saprolegnia* sp. berwarna putih kecoklatan dengan permukaan seperti kapas, menonjol dan bundar (Nuryati,dkk, 2009).

Secara mikroskopis, *Saprolegnia* sp diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi organ reproduksi yang diamati pada kultur menggunakan media air tambak steril. Organ reproduksi seksual dapat digunakan sebagai identifikasi terhadap *Saprolegnia* sp. (Woo and Bruno, 1999). Sporangium adalah organ reproduksi aseksual *Saprolegnia* sp. yang merupakan diferensiasi dari hifa sehingga berbentuk lebih lebar dari hifanya. Zoospora akan dilepaskan oleh sporangium yang matang dan berenang keperairan (Yuasa, 2003).

E. Pembuatan Larutan Zoospora

Pembuatan larutan zoospora dalam penelitian ini diawali dengan menginokulasikan potongan blok agar pada bagian yang telah ditumbuhi fungi dengan ukuran 1 cm² pada air tambak steril dalam cawan petri. Inkubasi dilakukan selama tiga hari sampai tumbuh hifa-hifa disekeliling potongan blok agar. Hifa dalam cawan petri dibilas sebanyak dua kali menggunakan air tambak steril kemudian dipindahkan dalam tabung ukur dan diinkubasi selama 24 jam. Perhitungan jumlah zoospora dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer*. Sependapat dengan Yuniar (2009), yang mengatakan bahwa penghitungan jumlah sel dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali pada 9 kotak sedang *haemocytometer*.

Jumlah zoospora yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1,18 x 10⁶sel/ml. Hal ini sesuai dengan pendapat dari Yuasa dkk (2003) yang mengatakan bahwa jumlah zoospora yang digunakan untuk infeksi buatan adalah 10⁵ sel/ml.

Pelaksanaan

A. Penyiapan Ekstrak Daun Sirih Dengan Berbagai Konsentrasi

Pengenceran ekstrak dilakukan dengan mencampurkan ekstrak daun sirih dengan DMSO 10% hingga didapatkan konsentrasi yang diinginkan. Untuk mendapatkan konsentrasi 50%, 2 gram ekstrak daun sirih ditambah dengan DMSO 10% hingga 4 ml. maka pada pengenceran maka pada konsentrasi 50% mengandung 0,5 gram ekstrak daun sirih dalam 1 ml larutan. Pengenceran 25% didapatkan dari pengambilan 2 ml larutan dari konsentrasi 50% ditambah dengan DMSO 10% hingga 4 ml, dan seterusnya hingga konsentrasi 0,2%. Pada konsentrasi 0,2% larutan diambil 2 ml lalu dibuang. Kemudian setiap tabung diisi dengan suspensi fungi sebanyak 2 ml. Kontrol positif berisi 2 ml *hydrogen peroksida* 3% ditambah dengan suspensi fungi hingga 4 ml, sedangkan kontrol negatif berisi 2 ml DMSO 10% ditambah dengan suspensi fungi hingga 4ml. Pengenceran ekstrak daun sirih (*Piper betel* L) diulang sebanyak tiga kali ulangan.

B. Metode Pengenceran

KHM merupakan konsentrasi terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Pengujian KHM dilakukan dengan cara menyiapkan hasil pengenceran berseri masing-masing dari tabung nomor 1 sampai nomor 9 ditambahkan 2 ml *Saprolegnia* sp. Pengamatan terhadap kekeruhan media dilakukan sebelum dan setelah inkubasi pada seluruh tabung hasil uji KHM menggunakan *spectrophotometer* (panjang gelombang 615 nm) dengan membandingkan hasil selisih pengukuran setiap tabung sebelum dan sesudah inkubasi.

Tujuan pengamatan dengan menggunakan *spektrofotometer* adalah untuk mengetahui nilai kekeruhan atau nilai *optical density* (OD) dari berbagai konsentrasi

pengenceran berseri ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) yang telah diinokulasi *Saprolegnia* sp dan diinkubasi selama 48 jam.

Penentuan daya fungisidal dari ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dilakukan dengan uji KBM yaitu dengan cara menanam semua konsentrasi hasil uji KHM pada media SDA (*Sabouraud Detroxe Agar*). Apabila pada media SDA terdapat pertumbuhan fungi *Saprolegnia* sp berarti ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) pada konsentrasi tersebut tidak bersifat fungisidal. Sedangkan apabila tidak terdapat pertumbuhan fungi *Saprolegnia* sp berarti ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) pada konsentrasi tersebut bersifat fungisidal.

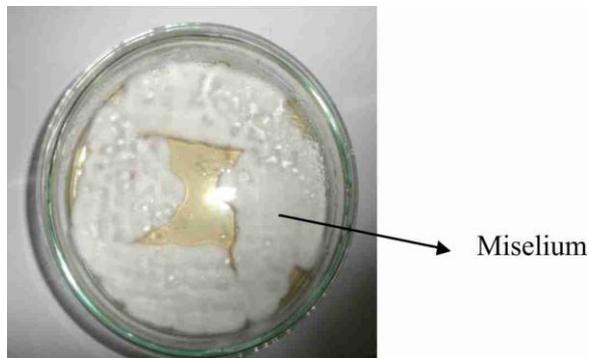
Analisa data

Data hasil penelitian uji KHM dalam penelitian ini dianalisis dengan menggunakan analisis varian (ANOVA). Apabila perlakuan yang diberikan menunjukkan pengaruh nyata maka akan dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan dengan taraf kepercayaan 95% yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi hambat terbaik dari ekstrak daun sirih terhadap pertumbuhan fungi *Saprolegnia* sp. Data hasil uji KBM diamati dengan cara melihat ada tidaknya pertumbuhan fungi pada media SDA.

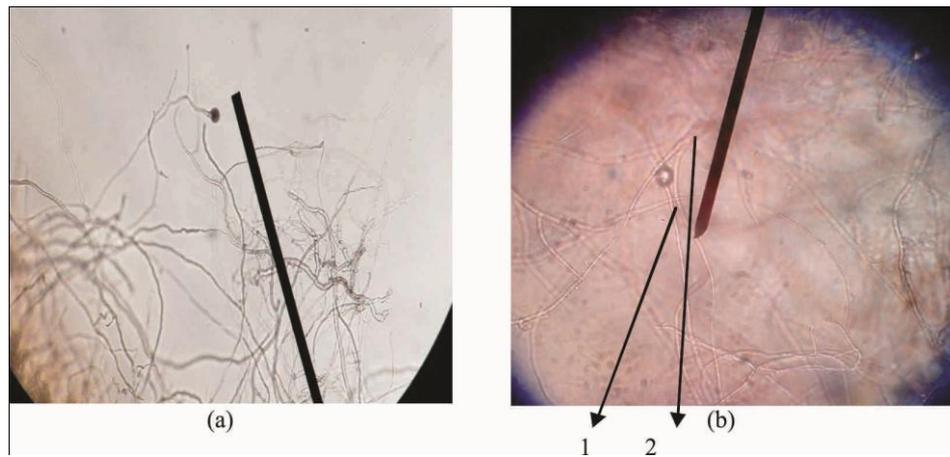
Hasil dan Pembahasan

Identifikasi awal pada fungi dapat dilakukan dengan pemeriksaan secara mikroskopis dan makroskopis (Ronald and Richard, 2000).

Hasil pengamatan *Saprolegnia* sp secara makroskopis (Gambar 1) pada penelitian ini sesuai dengan pendapat Nuryati (2009) yang mengatakan bahwa koloni *Saprolegnia* sp berwarna putih kecoklatan dengan permukaan seperti kapas, menonjol dan bundar.



Gambar 1. Koloni *Saprolegnia* sp.



Gambar 2. Organ reproduksi *Saprolegnia* sp secara mikroskopis dengan perbesaran 100x

Keterangan: (a) organ reproduksi seksual (oogonium)
 (b) organ reproduksi aseksual.(1: hifa, 2: sporangium)

Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan cara mengamati *Saprolegnia* sp diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi organ reproduksi yang dikultur pada media air tambak steril. Hasil pengamatan *Saprolegnia* sp yang dilakukan dalam penelitian ini terlihat pada Gambar 2.

Hasil pengamatan uji KHM secara visual menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) pada konsentrasi 50% dan 25 % keruh dan hampir mendekati kekeruhan pada tabung sebelum inkubasi, sedangkan pada konsentrasi 12,5% sampai dengan 0,2% lebih jernih dibandingkan dengan perlakuan sebelum inkubasi. Dengan menggunakan pengamatan

secara visual sulit untuk membedakan tingkat kekeruhan secara pasti sehingga, dilakukan pengamatan kekeruhan dengan menggunakan *spectrophotometer* (Michel and Blanc, 2001).

Dari hasil uji KHM dengan menggunakan *spectrofotometer* menunjukkan bahwa selisih nilai OD berbanding lurus dengan masing-masing konsentrasi yang berarti semakin tinggi konsentrasi maka selisih nilai OD akan semakin besar (Tabel 1). Pada konsentrasi 50% sampai dengan konsentrasi 0,2% menunjukkan bahwa selisih nilai OD semakin rendah karena semakin sedikit ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) pada masing-masing konsentrasi pengenceran

Tabel 1. Rata- rata selisih nilai OD sebelum dan setelah inkubasi

Konsentrasi	Sebelum	Sesudah	Selisih
50%	2,976	1,926	1,050
25%	1,575	0,707	0,867
12,5%	1,389	0,610	0,779
6,25%	1,082	0,619	0,463
3,12%	0,982	0,630	0,352
1,56%	0,905	0,601	0,304
0,78%	0,642	0,472	0,169
0,39%	0,605	0,466	0,130
0,20%	0,501	0,398	0,116
K+	0,291	0,221	0,070
K-	0,244	0,260	0,016

Tabel 2. Rata-rata selisih nilai OD uji KHM

Konsentrasi ekstrak daun sirih (%)	Rata-rata selisih nilai OD
Kontrol positif (1)	0,070 ^e
0,20	0,116 ^{de}
0,39	0,130 ^{de}
0,78	0,169 ^{de}
1,56	0,304 ^{cde}
3,13	0,352 ^{cd}
6,25	0,463 ^c
12,5	0,779 ^b
25	0,867 ^{ab}
50	1,050 ^a

Keterangan : Notasi berbeda pada kolom kedua menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Tabel 3. Hasil KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum)

Ekstrak daun sirih (%)	Ulangan		
	I	II	III
50	-	-	-
25	-	-	-
12,5	-	-	-
6,25	-	-	-
3,13	-	-	-
1,56	-	-	-
0,78	-	-	-
0,39	+	+	+
0,20	+	+	+
K+	-	-	-
K-	+	+	+

Keterangan : (+) = Ada pertumbuhan fungi
(-) = Tidak ada pertumbuhan fungi

Berdasarkan Analisis Varian (ANOVA) perlakuan konsentrasi ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) yang berbeda, memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap hambatan pertumbuhan fungi *Saprolegnia* sp secara in vitro (Lampiran 3). Setelah dilakukan uji jarak berganda Duncan dengan taraf kepercayaan 5% didapatkan hasil sebagai berikut (Tabel 2)

Konsentrasi 0,20% ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dengan nilai rata-rata OD 0,116 merupakan konsentrasi minimum yang dapat menghambat pertumbuhan *Saprolegnia* sp karena merupakan konsentrasi terendah yang mempunyai nilai OD tidak berbeda dengan kontrol positif yaitu dengan rata-rata 0,070. Konsentrasi 0,2% berarti terdapat 0,002 gram ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dalam 1 ml larutan.

Pengujian KBM merupakan uji lanjutan dari KHM untuk membuktikan apakah ekstrak daun sirih dapat membunuh *Saprolegnia* sp dengan cara menanam setiap konsentrasi pada media SDA, hasilnya disajikan pada Tabel 3.

Hasil KBM menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0,78% sudah tidak terdapat pertumbuhan *Saprolegnia* sp, sehingga konsentrasi 0,78% merupakan konsentrasi minimum ekstrak yang dapat membunuh *Saprolegnia* sp. Konsentrasi 0,78% berarti terdapat 0,0078 gram ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dalam 1 ml larutan. Pada konsentrasi 0,20% dan 0,39% terdapat *Saprolegnia* sp

Pada kontrol positif yang berisi berisi 2 ml *hydrogen peroksida* 3% ditambah dengan suspensi fungi sampai 4 ml tidak terdapat pertumbuhan *Saprolegnia* sp, hal ini membuktikan bahwa *hydrogen peroksida* 3% dapat membunuh *Saprolegnia* sp. Pada kontrol negatif terdapat pertumbuhan *Saprolegnia* sp. Hal ini membuktikan bahwa suspensi fungi yang digunakan dalam keadaan hidup dan tidak terkontaminasi oleh bakteri atau mikroba yang lain.

Uji KHM dilakukan dengan cara pengamatan menggunakan *spectrofotometer* karena pengamatan secara visual sulit untuk membedakan tingkat kekeruhan pada masing-

masing konsentrasi. Hasil uji KHM menunjukkan bahwa selisih nilai OD berbanding lurus dengan masing-masing konsentrasi ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) yang berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) maka selisih nilai OD akan semakin besar. Semakin rendah ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) pada masing-masing konsentrasi pengenceran maka selisih nilai OD akan semakin kecil, sehingga pertumbuhan *Saprolegnia* sp tidak akan terhambat dengan baik. Jawetz *et al*, 1996 menyatakan bahwa daya kerja antimikroba ditentukan oleh bahan antimikroba itu sendiri, semakin tinggi konsentrasi zat antimikroba tersebut maka semakin meningkat pula kemampuannya untuk bekerja sebagai pembunuh mikroba.

Hydrogen peroksida digunakan sebagai kontrol positif karena memproduksi superoksida yang merupakan ROS (Reactive Oxygen Species). Antioksidan merupakan penghambat ROS, akan tetapi bila keadaan tingkat ROS melebihi pertahanan antioksidan maka akan mengakibatkan kerusakan sel.

Menurut Nurswida (2002), efek fungisida daun sirih disebabkan adanya komponen derivat *fenol*, seperti *eugenol*, *iseugenol*, *allypyrocatechol*, *chavichol*, *safrole*, *anethole*, *cavibetol*, *carvacrol*, *betlefenol*. Mekanisme kerja senyawa fenolik melalui perusakan membran plasma, inaktivasi enzim dan denaturasi protein. Disini fenol berkaitan dengan membran yang ergosterol akan merusak membran tersebut sehingga fungsi akan mati. Tanin yang juga terkandung dalam daun sirih segar dapat menghambat kerja enzim-enzim termasuk enzim katalase (Rahmah dan Aditya, 2010).

Komponen utama dinding sel fungi adalah *1-3 beta- D- glucan*. Jika enzim yang berperan dalam sintesisnya dihambat, maka fungsi tidak dapat berkembangbiak lebih lanjut (Trifena, 2007). Aktivitas antifungi tergantung dari adanya ikatan dengan sterol pada membran sel kapang atau khamir, terutama ergosterol. Akibat terbentuknya ikatan antara sterol dengan antifungi menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel sehingga sel akan kehilangan berbagai molekul kecil (Bahry dan Setiabudy 1995).

Penurunan ergosterol membran sel jamur menyebabkan rusaknya permeabilitas membran, akibatnya sel jamur kehilangan komponen intraselulernya (Aprilia, 2010). Ergosterol memainkan peran penting dalam pertumbuhan jamur dan ditemukan di membran phospholipid bilayer sel sebagian besar dalam keadaan bebas dan pada tingkat lebih rendah

digunakan untuk ester asam lemak (Montgomery *et al*, 2000). Dengan demikian, penghambatan terhadap pembentukan ergosterol membran plasma sel-sel *Saprolegnia* sp juga berarti penghambatan terhadap reproduksinya.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis dan pembahasan dalam penelitian ini, dapat disimpulkan sebagai berikut : Ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) mempunyai aktivitas dalam menghambat dan membunuh pertumbuhan *Saprolegnia* sp. secara in vitro. Konsentrasi minimum Ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) yang dapat menghambat pertumbuhan *Saprolegnia* sp. adalah 0,002 gram ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dalam 1 ml larutan (0,2%). Konsentrasi minimum Ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) yang dapat membunuh pertumbuhan *Saprolegnia* sp. adalah 0,0078 gram ekstrak daun sirih dalam 1 ml larutan (0,78%).

Ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dapat dipertimbangkan untuk digunakan sebagai antifungi terhadap *Saprolegnia* sp. secara in vitro. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang aktivitas antifungi ekstrak daun sirih terhadap *Saprolegnia* sp. secara in vivo

Daftar Pustaka

- Akbar, J. 2010. Uji Efektivitas Ekstrak Bawang Dayak (*Eleutherine Palmifolia* Merr) Terhadap Penyembuhan Infeksi Jamur *Saprolegnia* Sp, Pada Ikan Nila. Jurusan Budi Daya Perairan, Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Universitas Lambung Mangkurat. Banjarbaru
- Aprilia, F. 2010. Efektifitas Ekstrak Jahe (*Zingiber Officinale* Rosc.) 3,13% Dibandingkan Ketokonazol 2% Terhadap Pertumbuhan *Malassezia* Sp. Pada Ketombe. Skripsi. Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Bahry B, Setiabudy R. 1995. Obat Jamur. Di Dalam: Sulistia GG, Rianto S, Frans DS, Purwastyastuti, Nafrialdi, editor. Farmakologi dan Terapi. Ed ke-4. Jakarta: Gaya Baru. hlm 560-570
- Heyne. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid II. Cetakan 1. Badan Litbang Kehutanan. Jakarta. Hal: 622-627.
- Jawetz E. 1998. Farmakologi dasar dan klinik. Ed VI. Penerbit Buku Kedokteran, EGC. Jakarta.
- Mayer, K. 2005. *Saprolegnia*: There's A Fungus Among Us. OSU Department

- Of Fisheries And Wildlife. [Http://Www.Tnfish.Org/Disease/Saprolegnia.Pdf](http://www.tnfish.org/disease/saprolegnia.pdf)
- Michel. C and Blanc, G. 2001. Minimum Inhibitory Concentration Methodology in Aquaculture. *Aquaculture*, 196: 311-318.
- Montgomery, H.J., C.M. Monreal., J.C. Young., K.A. Seifert. 2000. Determination Of Soil Fungal Biomass From Soil Ergosterol Analyses. University Of Waterloo, Land Resource Unit, Brandon Research Station, Agriculture And Agri-Food Canada, University Of Manitoba, Winnipeg, Man.Scprc, Agriculture And Agri-Food Canada, Ecorc, Agriculture And Agri-Food Canada, Ottawa,Canada.
- Nurswida, I. 2002. *Efektivitas Dekok Sirih Hijau dan Sirih Kuning Dalam Menghambat Pertumbuhan Candida albicans (uji In Vitro)*. Skripsi. Universitas Brawijaya.Malang
- Nuryati, S., F.B.P. Sari., dan Taukhid, 2009, identifikasi dan uji postulat Koch cendawan penyebab penyakit pada ikan gurame. Proram studi budidaya perairan. Fakultas perikanan dan ilmu kelautan. Institute pertanian bogor. Bogor. Hal:21-27
- Rahmah, N Dan Aditya Rahman. 2010. Uji Fungistatik Ekstrak Daun Sirih (Piper Betle L) Terhadap Candida Albicans. 1Dinas Perikanan Dan Kelautan Pemerintahan Daerah Propinsi Kalimantan Selata. Program Studi Biologi Fakultas MIPA UNLAM Banjarbaru Kalimantan Selatan. Banjarbaru.
- Ronald,A., Sacher, dan Richard, A. Mc.Pherson. 2000. Tinjauan klinis hasil pemeriksaan , Laboratorium. Penerbit buku kedokteran EGC. Jakarta. Hal:114
- Trifena, D. 2007. Aktifitas Kitinase Dan Sifat Antijamur Actinomycetes, Serratia Marcescens Serta Getah Pohon Karet. Skripsi. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Woo, P.T.K And Bruno. 1999. Fish Disease And Disorder Volume 3 Viral Bacterial And Fungal Infection. CABI Publishing, New York. 599.643 Hal
- Yuasa, K., Novita, P., Meliya, B., Edi, B.K. 2003. Panduan Diagnose Penyakit Ikan, Teknik Diagnose Penyakit Ikan Budidaya Air Tawar Di Indonesia. Japan International Cooperation Agency. Balai Budidaya Air Tawar Jambi. Jambi
- Yuniar, V.2009. Toksisitas Merkuri Hidup, Pertumbuhan, Gambaran Darah Dan Kerusakan Organ Pada Departemen Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan (Hg) Terhadap Tingkat Kelangsungan Ikan Nila *Oreochromis Niloticus*. Skripsi. Departemen Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Budidaya Perairan Institut Pertanian Bogor. Bogor