

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN KETAPANG (*Terminalia catappa* L.) TERHADAP BAKTERI *Bacillus amyloliquefaciens*

Putricia V. Tampemawa¹⁾, Johanis J. Pelealu¹⁾, Febby E.F. Kandou¹⁾

¹⁾Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sam Ratulangi, 95115

ABSTRACT

Tropical Almond plant (*Terminalia catappa* L.) is commonly found in the Pacific region, especially in Indonesia. *Terminalia catappa* L. has many benefits, mainly as a traditional medicinal plant. *Bacillus amyloliquefaciens* is a soil bacterium of the genus *Bacillus*. The bacteria are devoted to produce antibiotics. The aim of this research is to determine the effectiveness of tropical almond leaf extract against *B. amyloliquefaciens*. The Kirby-Bauer method is used to determinate the effectiveness of the clear zone, formed by antibacterial compounds that diffuse in bacterial growth media. The results showed, more concentration of the extract which are given, greater the clear zone that forms. Tropical almond antibacterial effectiveness is not better than the antibiotics tested.

Key words: Antibacterial, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Terminalia catappa*. L

ABSTRAK

Tanaman Ketapang (*Terminalia catappa* L.) merupakan tanaman yang banyak ditemukan di daerah Pasifik terutama di Indonesia, selain itu memiliki banyak manfaat terutama fungsinya sebagai tanaman obat tradisional. Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* merupakan salah satu bakteri tanah dari genus *Bacillus*. Bakteri tersebut dikhususkan untuk menghasilkan antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan efektivitas ekstrak daun ketapang terhadap pertumbuhan bakteri *B. amyloliquefaciens*. Metode yang digunakan adalah metode Kirby-Bauer, dimana penentuan efektivitas dilakukan berdasarkan zona bening yang terbentuk akibat pemberian senyawa antibakteri yang berdifusi pada media tumbuh bakteri. Hasil menunjukkan bahwa semakin besar pemberian konsentrasi ekstrak (90%) maka zona bening yang terbentuk semakin besar. Nilai efektivitas antibakteri ketapang tidak lebih baik dari pada antibiotik yang diujikan.

Kata Kunci: Antibakteri, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Terminalia catappa*. L

PENDAHULUAN

Penyebaran penyakit yang diakibatkan oleh mikroorganisme perlu dikendalikan agar dapat menekan penyebaran, kerusakan, infeksi dan pembusukan pada inang atau produk yang terinfeksi (Gustiani, 2009). Pembasmian mikroorganisme pada inang yang terinfeksi dapat menggunakan pestisida, bakterisida, fungisida, serta agen biokontrol berupa mikroorganisme. Di era globalisasi, penggunaan mikroorganisme untuk meningkatkan ketahanan tanaman terhadap cekaman biotik sudah mulai mengalami peningkatan (Gul *et al.*, 2008; Pastra, 2012). Bakteri rhizosfer seperti *Arthobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, dan *Bacillus* merupakan agen biokontrol yang paling umum digunakan untuk melawan bakteri patogen pada tanaman (Kloepper *et al.*, 2004; Gul *et al.*, 2008; de Vasconcellos dan Cardoso, 2009). Agen biokontrol dari genus *Bacillus* sudah banyak digunakan untuk mengontrol hama dan penyakit pada tanaman (Jacobsen *et al.*, 2004). Bakteri dari genus ini diketahui mampu mensekresikan enzim protease, kitinase dan lipopeptida yang berpotensi dalam melisiskan dinding sel bakteri dan menghambat pertumbuhannya (Kloepper *et al.*, 2004; de Azaredo *et al.*, 2004; Rodas-Junco *et al.*, 2009). *Bacillus amyloliquefaciens* merupakan salah satu bakteri dari genus *Bacillus* yang menunjukkan aktivitas biokontrol. Sebanyak kurang lebih 8% dari total genom *B. amyloliquefaciens* dikhususkan

untuk menghasilkan antibiotik (Arguelles-Arias *et al.*, 2009; Borriss *et al.*, 2011).

Bakteri yang berperan sebagai agen biokontrol dapat menghasilkan senyawa antibakteri, namun pertumbuhan agen biokontrol ternyata dapat dipengaruhi oleh senyawa-senyawa lain yang memiliki aktivitas antibakteri. Maji dan Shaibu (2012) melaporkan bahwa senyawa-senyawa antibakteri seperti ampicilin, higomicin, kanamicin dan rifampicin dapat menghambat pertumbuhan beberapa koloni bakteri yang berperan sebagai agen biokontrol seperti *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*. Penelitian Maji dan Shaibu (2012) menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri yang berperan sebagai biokontrol. Tanaman ketapang (*Terminalia catappa* L.) merupakan salah satu tanaman anggota suku Combretaceae yang berasal dari Asia Tenggara, khususnya kepulauan-kepulauan Melayu. Nilai guna dari tanaman ini sangat banyak, salah satunya sebagai antibakteri (Hardhiko *et al.*, 2004). Chee Mun (2003) melaporkan bahwa ekstrak daun ketapang mengandung senyawa tanin dan flavonoid yang diduga bersifat antibakteri. Pemberian ekstrak ketapang menunjukkan daya hambat pada beberapa bakteri seperti *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Sumino *et al.*, 2013; Rahardjo *et al.*, 2014). Sebagai antibakteri, kandungan metabolit sekunder pada serasah daun-daun ketapang

berpotensi menghambat pertumbuhan dan perkembangan bakteri dari genus *Bacillus* di akar tanaman. Kajian untuk mengevaluasi pengaruh antibakteri ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa* L.) terhadap aktivitas biokontrol *B. amyloliquefaciens* belum diketahui dampak efektivitasnya. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilihat efektivitas ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa* L.) terhadap pertumbuhan koloni bakteri agen biokontrol *B. amyloliquefaciens*.

METODE PENELITIAN

Pembuatan Medium Bakteri dan Pemiakan Bakteri

Penelitian ini menggunakan medium *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Broth* (NB). NA yang akan dibuat sebanyak 1.5 g dalam 75 mL aquades dan NB 0,26 g dalam 20 mL aquades. Larutan NA dan NB dibuat dalam tabung erlenmeyer selanjutnya dipanaskan menggunakan *hot plate* sampai larutan homogen, kemudian diautoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C di bawah tekanan 15 lbs. Biakan murni bakteri *Bacillus* sp. yang akan digunakan, diinokulasi secara aseptik ke dalam 2 tabung reaksi yang berisi medium NB steril sebanyak 15 mL. Tabung reaksi diinkubasi pada suhu kamar selama 1 x 24 jam.

Pembuatan Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L.) dan Larutan Kontrol

Daun ketapang yang digunakan adalah daun segar, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Daun

ketapang yang telah kering kemudian di buat serbuk dengan cara diblender hingga halus. Serbuk kemudian ditapis untuk mendapatkan serbuk yang benar-benar halus. Serbuk ketapang ditimbang sebanyak 15 g kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 150 mL selama 3 x 24 jam. Setelah dimaserasi, larutan kemudian di saring dengan menggunakan kertas saring *Whatman* no 11 untuk memisahkan residu dari filtrat. Ekstrak etanol 96% yang telah disaring kemudian dievaporasi dengan menggunakan evaporator. Ekstrak hasil evaporator berupa pasta dibuat menjadi 3 konsentrasi yang berbeda yaitu 30%, 60%, dan 90% dengan cara diencerkan dengan aquades. Larutan antibiotik pembanding yaitu Kotrimoksazol 10 mg yang dilarutkan dalam 10 mL aquades. (Hasbi dan Tobo, 2002)

Pengujian Daya Hambat Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L.) terhadap Bakteri *Bacillus* sp.

Penelitian ini menggunakan metode Kirby-Bauer, yaitu metode difusi dengan menggunakan kertas cakram. Biakan bakteri *Bacillus* sp. dipindahkan secara aseptik sebanyak 3 mL dari medium NB ke cawan petri steril yang telah berisi medium NA yang masih cair, lalu digoyang secara perlahan-lahan sampai suspensi *Bacillus* sp. tersebar secara merata. Setelah medium memadat, kertas cakram masing masing dimasukan ke dalam konsentrasi ekstrak daun ketapang yang telah dibuat yaitu 30%, 60%, dan 90% serta larutan antibiotik sebagai kontrol positif dan aquades sebagai

kontrol negatif selama 2 menit. Kertas cakram yang telah direndam kemudian diangkat menggunakan pinset steril dan dipindahkan secara aseptik pada permukaan medium NA yang telah memadat, setelah itu diinkubasi pada suhu 40°C selama 1x24 jam. Pengujian daya hambat ekstrak daun ketapang terhadap bakteri *Bacillus* sp. dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Zona bening yang terbentuk setelah masa inkubasi dihitung dengan menggunakan jangka sorong.

Identifikasi Bakteri

Materi genetik bakteri *Bacillus* sp. berupa DNA total, di isolasi dengan menggunakan teknik *spin column based* sesuai dengan prosedur (Lubenow *et al.*, 2008; Davenport, 2014). Gen yang mengekspresikan RNA Ribosomal (16s rRNA *gene*) diekstrak dari bakteri *Bacillus* sp. yang dibiakan dalam medium NB (*Nutrient Broth*). Teknik PCR dilakukan untuk memperbanyak fragmen DNA 16s rRNA. Primer gen 16s rRNA yang digunakan yaitu 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG- 3') dan 1492R (5' - GGT TAC CTT GTT ACG ACTT- 3'), primer tersebut telah digunakan dalam penelitian filogeni dan identifikasi bakteri (Pradhab dan Selvisabhanayakam, 2011; Wang *et al.*, 2014). Proses elektroforesis dilakukan untuk mengetahui berhasil tidaknya Gen 16s rRNA teramplifikasi (Sambrook dan Russel, 2006). Selanjutnya proses Sekuensing dilakukan oleh penyedia jasa sekuensing *First Base Malaysia* (Kolondam, 2015).

Analisis Data

Perbandingan zona daya hambat dari ekstrak daun ketapang disajikan dalam tabel dan gambar. Perhitungan efektivitas antibakteri konsentrasi ekstrak daun ketapang terhadap antibiotik dihitung berdasarkan persamaan (Tangapo, 2005), yaitu :

$$E = (D/Da) \times 100\%$$

Keterangan :

- E : efektivitas antibakteri (%)
 D : diameter zona hambat ekstrak tumbuhan ketapang (mm)
 Da : diameter zona hambat antibiotik (mm)

Hasil sekuensing yang dilakukan oleh penyedia jasa sekuensing *First Base Malaysia*, disunting dengan menggunakan program software komputer *Geneious v5.6.4* (Kolondam, 2015).

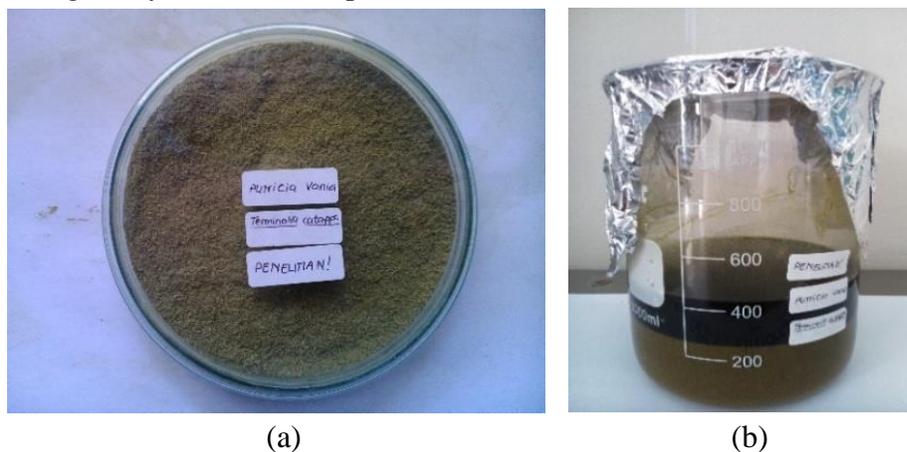
Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi Daun Tanaman Ketapang (*Terminalia catappa* L.)

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah cara dingin, yaitu maserasi. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Dasar dari maserasi adalah melarutnya bahan kandungan simplisia dari sel yang rusak, yang terbentuk pada saat penghalusan, dan difusi bahan kandungan dari sel yang masih utuh. Proses maserasi akan berakhir ketika bahan yang diekstraksi dari bagian dalam sel telah berdifusi ke larutan dan terjadi keseimbangan yang menandakan berakhirnya proses difusi (Istiqomah,

2013). Pelarut yang dipakai dalam penelitian ini adalah etanol (96%) karena menurut Harborne (1996) pelarut yang dipakai dalam proses ekstraksi harus sesuai dengan sifat kepolaran senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman. Tanaman ketapang (*Terminalia catappa* L.) mengandung senyawa aktif seperti

flavonoid, tanin, fenol, diterpen, dan asam lemak (Lin *et al.*, 2000; Pauly, 2001; Ahmed *et al.*, 2005; Jaziroh, 2008; Saroja *et al.*, 2011). Senyawa-senyawa tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri dan bersifat polar sehingga perlu digunakan pelarut yang juga bersifat polar, yaitu etanol.



Gambar 1. Daun tanaman ketapang (*Terminalia catappa* L.) yang telah dihaluskan (a) dan dimaserasi (b).

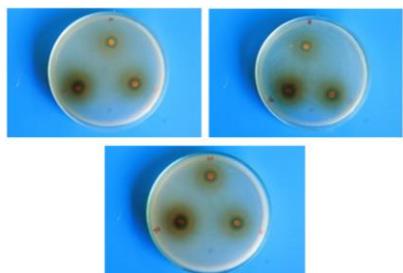
Hasil penyaringan akan meninggalkan filtrat yang merupakan senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman (Gambar 1). Proses evaporasi harus dilakukan untuk memastikan kandungan residu sepenuhnya merupakan senyawa-senyawa aktif tanaman, tanpa etanol. Etanol merupakan senyawa volatil yang mudah menguap, sehingga yang tersisa setelah proses evaporasi adalah senyawa-senyawa aktif yang diinginkan. Residu setelah evaporasi berupa pasta diambil dan dibuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 30%, 60% dan 90% untuk mewakili konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Pembuatan larutan

ekstrak dengan berbagai konsentrasi dilakukan karena menurut Lathifah (2008), kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri tergantung pada konsentrasi senyawa aktif yang terkandung dalam larutan ekstrak.

Hasil Identifikasi Bakteri

Hasil sekuens yang didapatkan dari penyedia jasa sekuens berupa kromatogram kemudian disunting dan diedit dengan menggunakan pro gam *Geneious v.5.6* untuk mendapatkan daerah inti (*core region*). Sekuens urutan awal dan urutan akhir dihapus kurang lebih 150 bp. Penghapusan sekuens dilakukan untuk

menghilangkan sisa sekuens dari primer yang digunakan, sisa primer tersebut menempel pada bagian awal dan akhir sekuens. Setelah dilakukan pengeditan sekuens, maka didapatkan urutan sekuens DNA gen 16s rRNA *gene* dengan panjang 795 bp. Urutan sekuens tersebut disalin dalam format FASTA (*Fast Alignment*) untuk dilakukan pencarian kemiripan sekuens dalam situs NCBI BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Hasil identifikasi bakteri yang diidentifikasi memiliki keidentikan dengan spesies bakteri dalam genus *Bacillus* diantaranya *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus subtilis* dan *Bacillus amyloliquefaciens*. Hasil yang paling banyak ditunjukkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* dengan jumlah yang tinggi dalam basis data. Maka spesies bakteri yang diidentifikasi merupakan spesies yang termasuk dalam genus *Bacillus*, yaitu *Bacillus amyloliquefaciens*.



Gambar 2. Zona Bening Ekstrak Ketapang (*Terminalia catappa* L.) pada Pertumbuhan Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*.

Daya Hambat Ekstrak Tanaman Ketapang (*Terminalia catappa* L.)

Diameter zona bening yang menunjukkan daya hambat ekstrak ketapang terhadap pertumbuhan bakteri diukur setelah 1x24 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa faktor konsentrasi ekstrak menyebabkan adanya perbedaan diameter zona bening pada pertumbuhan bakteri setelah masa inkubasi. Zona bening pada ekstrak ketapang dengan konsentrasi 30% menunjukkan rata-rata diameter sebesar 8,8267 mm, lebih kecil daripada zona bening pada konsentrasi 60% yakni dengan rata-rata diameter 11,2533 mm. Di lain pihak, zona bening ekstrak ketapang pada konsentrasi 90% menunjukkan diameter zona bening rata-rata sebesar 12,4976 mm, lebih tinggi daripada diameter zona bening pada konsentrasi ekstrak 30% dan 60% (Tabel 1).

Tabel 1. Diameter Zona Bening Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*.

Konsentrasi	Diameter Zona Bening (mm)
30%	8,8267 ±1,0408
60%	11,2533±1,1209
90%	12,4967±0,1650

Zona bening menunjukkan area dimana pertumbuhan bakteri terhambat oleh adanya suatu senyawa aktif. Semakin tinggi diameter zona bening menunjukkan semakin tinggi pula kemampuan suatu senyawa aktif menghambat pertumbuhan bakteri, yang tentu saja bergantung pada konsentrasi senyawa tersebut. Davis dan Stout (1971) menggolongkan kemampuan daya hambat suatu ekstrak berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk. Diameter zona bening pada konsentrasi ekstrak 30% (8,8267 mm) termasuk dalam kategori daya hambat sedang (5-10 mm), konsentrasi ekstrak 60% (11,2533 mm) termasuk dalam kategori daya hambat kuat (10-20 mm) dan konsentrasi ekstrak 90% (12,4967 mm) termasuk dalam kategori daya hambat kuat.

Diameter zona bening pada konsentrasi 30% (8, 8267 mm) dan 60% (11, 2533 mm) berada dalam kategori penghambatan yang berbeda berdasarkan Davis dan Stout (1971), yakni sedang dan kuat. Hal tersebut dikarenakan jumlah senyawa aktif yang terdifusi keluar dari kertas cakram pada konsentrasi 60% lebih banyak daripada konsentrasi 30%. Zona bening pada konsentrasi ekstrak 90% menunjukkan rata-rata diameter 12,4967 mm dimana jumlah senyawa aktif yang terikat pada kertas cakram konsentrasi ekstrak 90% sangat banyak sehingga laju difusi senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri pada ekstrak daun ketapang lebih tinggi (Gambar 2). Penurunan laju difusi disebabkan oleh karena gradien konsentrasi yang mulai menurun antara

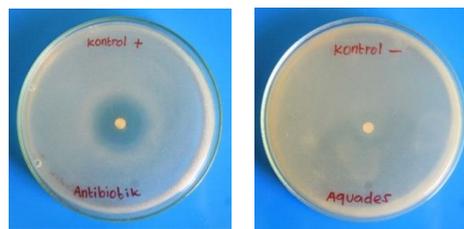
kertas cakram dengan media sekitarnya. Media tumbuh bakteri yang awalnya bersifat hipotonik mulai menunjukkan peningkatan kelarutannya karena akumulasi senyawa-senyawa produk bakteri *B. amyloliquefaciens*.

Senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh *B. amyloliquefaciens* tidak mempengaruhi aktivitas dari bakteri *B. amyloliquefaciens* karena gen-gen bakteri mengenal senyawa yang merupakan hasil ekspresi gen dari bakteri *B. amyloliquefaciens* tersebut (Campbell, 2002). Jumlah bakteri di akhir masa inkubasi 1x24 jam menjadi lebih banyak, sehingga produk-produk kimia yang dihasilkan sebagai aktivitas biokontrol seperti senyawa-senyawa antimikroba dari kelompok surfaktin bacillomycin D, fengycin, macrolatin, bacillane, bacilysin dan difficidin juga terakumulasi lebih banyak. Senyawa-senyawa ini tidak berdampak secara langsung terhadap senyawa-senyawa aktif dari ekstrak daun ketapang, tetapi akumulasi senyawa-senyawa produk bakteri ini menghambat senyawa aktif ekstrak ketapang untuk berdifusi lebih jauh lagi. Akumulasi senyawa-senyawa produk bakteri ini mempercepat terjadinya kesetimbangan, yang menandakan difusi berhenti.

Pembentukan zona bening dalam media tumbuh bakteri harus disertai dengan kontrol sebagai pembanding. Kontrol adalah kelompok/unit penelitian yang tidak diberi perlakuan apa-apa, dalam hal ini tidak dibuat dalam tiga

konsentrasi yakni 30%, 60% dan 90%. Dalam penelitian ini digunakan dua macam kontrol yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif haruslah berupa bahan yang mengandung senyawa yang sudah terbukti menunjukkan aktivitas antibakteri, misalnya kotrimoksazol. Di lain pihak, kontrol negatif haruslah berupa larutan/bahan yang sama sekali tidak menunjukkan aktivitas antibakteri, misalnya aquades. Kotrimoksazol merupakan kombinasi dari sulfametoksazol dan trimetoprim dengan perbandingan 5:1, bersifat bakterisida dengan spektrum kerja lebih lebar dibandingkan dengan sulfonamida. Trimetoprim sama dengan sulfametoksazol, meskipun daya antibakterinya 20-100 kali lebih kuat dari sulfametoksazol (Mariana, 1995).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pemberian kontrol positif kotrimoksazol mengakibatkan terbentuknya zona bening dengan diameter 24,16 mm yang menurut Davis dan Stout (1971) tergolong dalam kategori sangat kuat (> 20 mm). Di lain pihak, pada cawan petri yang diberikan kontrol negatif berupa aquades, tidak ditemukan adanya zona bening yang terbentuk (Gambar 3). Hal tersebut menunjukkan bahwa zona bening hanya akan terbentuk apabila ada aktivitas antibakteri dari suatu senyawa. Berbeda dengan kotrimoksazol, aquades tidak menunjukkan aktivitas antibakteri karena aquades merupakan air murni tanpa kandungan senyawa aktif yang memiliki sifat antibakteri.



Gambar 3. Kontrol Positif (Kotrimoksazol) dan Kontrol Negatif (Aquades) pada Pertumbuhan Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*.

Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa-senyawa aktif dalam ekstrak daun ketapang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B. amyloliquefaciens*. Penghitungan nilai efektivitas antibakteri dari data diameter zona bening diperoleh nilai efektivitas antibakteri pada konsentrasi ekstrak 30% sebesar 36,53, lebih rendah daripada nilai efektivitas pada konsentrasi 60% (46,57) dan 90% (51,72). Di lain pihak, hasil tersebut juga menunjukkan bahwa efektivitas antibakteri senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam daun ketapang tidak sebaik kontrol positif yang dipakai, yaitu kotrimoksazol, karena masih dalam kisaran 30-50% efektivitas kotrimoksazol (Tabel 2).

Tabel 2. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L.)

terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*.

Konsentrasi	Efektivitas Antibakteri (%)
30%	36,53±0,04
60%	46,57±0,04
90%	51,72±0,006

Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun ketapang, maka diameter zona bening yang dihasilkan dan nilai efektivitas antibakteri akan menjadi semakin tinggi. Penelitian Ainurrochmah *et al.*, 2013 menunjukkan pemberian optimal ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* strain BW 1201 adalah konsentrasi 100% dengan diameter 27,2 mm dan dalam penelitian yang dilakukan oleh Razak *et al.*, 2013 semakin tinggi konsentrasi (100%) air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) maka zona bening yang dihasilkan untuk menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* semakin besar (10,5 mm). Nilai efektivitas dan ukuran zona bening mengalami peningkatan, karena pemberian konsentrasi ekstrak yang tinggi. Hal tersebut diakibatkan oleh jumlah senyawa bioaktif yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak yang telah diencerkan.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* menunjukkan perbedaan respons bakteri di tiap konsentrasi ekstrak 30%, 60%, dan 90%. Ekstrak daun ketapang di tiga macam konsentrasi menunjukkan adanya zona bening pada daerah sekitar kertas cakram yaitu 8,8267 (30%), 11,2533 (60%), dan 12,4967 (90%) sehingga menunjukkan adanya daya hambat terhadap bakteri *B. amyloliquefaciens* yang berperan sebagai agen biokontrol. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun ketapang, semakin tinggi pula diameter zona bening yang terbentuk. Meskipun demikian, nilai efektivitas antibakteri ekstrak daun ketapang tidak lebih baik daripada kotrimoksazol, karena nilai efektivitasnya 51,72 (90%) hanya separuh dari kotrimoksazol 24,16 mm.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, S.M., V. Swamy., P.G.R. Dhanapal dan V.M. Chandrashekara. 2005. Antidiabetic Activity of *Terminalia cattapa*. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*. 4(1):36-40
- Ainurrochmah, A., E. Ratnasari dan L. Lisdiana. 2013. Efektivitas Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap Penghambatan

- Pertumbuhan Bakteri *Shigella flexneri* dengan Metode Sumuran. *LenteraBio*. 2(3): 233-237
- Arguelles-Arias, A., Marc Ongena., B. Halimi., Y. Lara., A. Brans., B. Joris dan P. Fickers. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*. 8:63 doi: 10.1186/1475-2859-8-63
- Borriss, R., X.H Chen., C. Rueckert., J. Blom., A. Becker., B. Baumgarth., B. Fan., R. Pukall., P. Schumann., C. Spröer., H. Junge., J. Vater., A. Pühler dan H.P Klenk. 2011. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *Int J Syst Evol Microbiol*. 61: 1786-1801, doi: 10.1099/ij.s.0.023267-0
- Cambell, N.A., J.B. Reece dan L.G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Edisi 5 jilid 1. Penerbit Erlangga.
- Chee Mun, F. 2003. Ketapang (*Terminalia cattapa* L.) Leaves-Black Water: Understanding Black Water. *INBS ForumIndex*.
<http://www.joyabetta.com>
- Davenport, C. 2014. *Using DNA Barcodes to Identify and Classify Living Things*. Cold Spring Harbor Laboratory DNA Learning Center: United Stated
- Davis, W.W dan T.R Stout. 1971. Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay. *Microbiology*. 22(4):659-665.
- De Azeredo, L.A.I., D.M.G Freire, R.M.A Soares, S.G.F Leite dan R.R.R Coelcho. 2004. Production and Partial Characterization of Thermophilic Proteases from *Streptomyces* sp. Isolated from Brazilian Cerrado Soil. *Enzyme Microbiology Technology*. 34:354-358.
- De Vasconcellos, R.L.F dan E.J.B.N Cardoso. 2009. Rhizospheric *Streptomyces* as Potential Biocontrol Agents of *Fusarium* and *Armillaria* Pine Rot and as PGPR for *Pinus taeda*. *Biocontrol*. 54:807-816.
- Gül, A., F. Kidoglu., Y. Tüzel dan I. H. Tüzel. 2008. Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) growing in perlite. *Spanish Journal of Agricultural*. 6(3), 422-429
- Gustiani, E. 2009. Pengendalian Cemaran Mikroba pada Bahan Pangan Asal

- Ternak (Daging dan Susu) Mulai dari Peternakan sampai Dihidangkan. *Jurnal Litbang Pertanian*. 28(3) 96-100
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Bandung. Institut Teknologi Bandung.
- Hardhiko, R.S., A.G. Suganda dan E.Y. Sukandar. 2004. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol, Ekstrak Air Daun yang Dipetik dan Daun Gugur Pohon Ketapang (*Terminalia cattapa* L.). *Acta Pharmaceutica Indonesia*. 29: 129-133.
- Hasbi, H.M dan H.F. Tobo. 2002. *Teknik Penapisan dan Uji Efekbiologik Senyawa Bioaktif dari Bahan Alam*. FMIPA UNHAS. Makassar
- Istiqomah. 2013. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (*Piperis retrofracti fructus*). [SKRIPSI] Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif hidayatullah Jakarta.
- Jacobsen, B.J., N.K. Ridack dan B.J. Larson. 2004. The Role of Bacillus-Based Biological Control Agents in Intergrated Pest Management System: Plant Diseases. *The America Phytopathological Society*. 94(11): 1272-1275
- Jaziroh, S. 2008. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif dalam Ekstrak n-Heksana Daun Ketapang (Terminalia cattapa L.)* [SKRIPSI]. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Diponegoro Semarang.
- Kloepper, J.W., C.M Ryu dan S. Zhang. 2009. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant growth by Bacillus spp. *Phytopathol*. 94:1259-1266.
- Kolondam, B.J. 2015. Applying matK Gene for Identification of Liliopsida Plant Species from North Sulawesi through BOLD System. *Int. J. App. Biol. Pharm. Tech*. 6(2): 242-245.
- Lathifah, Q.A. 2008. Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri Pada Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan Variasi Pelarut [SKRIPSI]. Universitas Islam Negeri Malang.
- Lin, Y., Y. Kuo, M. Shiao, C. Chen dan J. Ou. 2000. Flavonoid Glycosides from Terminalia cattapa L. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 47(1) : 253-256
- Lubenow, H., M. Scherer dan D. Herold. 2008. Automated Extraction of Forensic Samples Using Established Spin Column Technology on the QIACube. *R&D Departement QIAGEN*. Germany

- Maji, E.A dan A.A Shaibu. 2012. Effect of Antibiotics on Biological Control Agents and their Efficacy to Control Rice Sheath Blight (*R. solani* AG-I.1). *Journal of Agricultural Technology*. 8(3) 993-997.
- Mariana, Y dan R. Setiabudy. 1995. *Sulfonamid, Kotrimoksazol. Dalam S. G. Ganiswara: Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Pastra, D.A, Melki dan H. Surbakti. 2012. Penapisan Bakteri yang Bersimbiosis dengan Spons Jenis *Aplysina* sp. sebagai Penghasil Antibakteri dari Perairan Pulau Tegal Lampung. *Maspari Journal*. 4(1), 77-82
- Pradhap, M, Selvisabhanayakam, V. Mathvianan., Parthasarathy, J.V.A.A Ayyapan dan S.S Kumar. 2011. Study on 16S rRNA based PCR method for spesific detection of *Salmonella entrica* typhi from gut of infected silkworm *Bombyx mori* (Linn.). *J Sci Ind Res*. 70:909–911.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta. Erlangga Medical Series.
- Rahadjo, B., A.R. Erwiyani dan A. Muhziddin. 2014. Effectiveness of Gel Formulation Leafs Extract of Ketapang (*Terminalia catappa* L.) 0.03% As an Antiseptic Hand Sanitizer Bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. chalmers.academia.edu
- Razak, A. Djamal dan G. Revilla. 2013. Uji daya hambat air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*
- Rodas-Junco, B.A., H.F Magana-Sevilla, J.M Tun-Suarez dan A. Reyes-Ramirez. 2009. Antifungal Activity In Vitro of Native *Bacillus* sp. Strains against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Research Journal of Biological*. 2(4):83-86
- Sambrook, J dan D.W. Russell. 2006. Agarose Gel Electrophoresis Protocol. *Csh Protocols* (doi: 10.1101/pdb.prot4020)
- Saroja, M., R.Santhi dan S.Annapoorani.2011. Antioxidant Activity of Phenolic of Terminalia Catappa in Ela Propagated Swiss Albino Mice. *Journal of Advanced Scientific Research*. 2(3): 70-72
- Sumino, A. Supriyadi dan Wardiyanto. 2013. Efektivitas Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia cattapa* L.) untuk Pengobatan Infeksi *Aeromonas salmonicida* pada Ikan Patin (*Pangasioniodon hypophthalmus*). *JURNAL SAINS VETERINER*. JSV 31 (1), ISSN: 0126 - 0421

Tangapo, A.M. 2005. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Tumbuhan Daun Sendok (*Plantago major*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* [SKRIPSI]. Universitas Sam Ratulangi Manado.

Wang, Y., R.M Tian., Z.M Gao., S. Bougouffa dan P.Y Qian. 2014. Optimal Eukaryotic 18S and Universal 16S/18S Ribosomal RNA Primers and Their Application in a Study of Symbiosis. *PLoS ONE* .9(3): e90053.
doi:10.1371/journal.pone.0090053