

**EFEKTIVITAS EKSTRAK BIJI JINTAN HITAM (*Nigella sativa* Linn.) TERHADAP INFEKSI BAKTERI *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus* Linn.)*****The effectiveness of Nigella sativa Linn Extract on Oreochromis niloticus Linn infected with Streptococcus agalactiae***

Gustiana\*, Alexander Rantetondok, Elmi Nurhaidah Zainuddin

Diterima : ; Disetujui :

**ABSTRACT**

*Black Cumin Seeds (Nigella sativa L.), commonly known as black seed, have been used in traditional medicine. Streptococcus agalactiae is a Gram-positive bacteria that causes the disease Streptococcosis in Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.). This study aims to find the bioactivity of black cumin seeds (N. sativa L.) against bacterial pathogens in Nile tilapia (O. niloticus L.). The research activities include preparation of samples black cumin seeds (N. sativa L.), extraction with kinetic maceration method using solvents from different polarity (n-hexane, ethanol and methanol), determination of antibacterial activity and minimum inhibition concentration (MIC) by agar diffusion method. The results of antibacterial activity against S. agalactiae of pathogenic bacteria showed that the highest activity was performed by semi-polar extract ethanol (inhibition zone diameter of 15.33 mm), followed by extract polar methanol with inhibition zone diameter of 12.67 mm. Extract non-polar n-hexane did not show any activities against the bacterial test. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of ethanol extract against S. agalactiae showed a value of 250 ppm.*

*Keywords: Antibacteria, Streptococcus agalactiae, Nile Tilapia (Oreochromis niloticus L.), Nigella Sativa L.*

**PENDAHULUAN**

Jintan hitam (*Nigella sativa* L.) yang dikenal dengan nama *black cumin* atau *Habbatusauda* merupakan tanaman asli dari Eropa Selatan dan banyak ditemukan di India. Tumbuhan ini telah digunakan sebagai pengobatan herbal selama lebih dari 2000 tahun. Bagian tumbuhan jintan hitam yang digunakan untuk pengobatan adalah bijinya, yang memiliki peran medis dan telah diaplikasikan dalam sistem pengobatan herbal tradisional di Arab dan Yunani. Biji jintan hitam dilaporkan telah menunjukkan efek farmakologis yang meliputi antibakterial, antihelminik, anticestoda, antischistosoma, antifungi, antiviral, antioksidan, dan memiliki aktivitas antiinflamasi, serta dapat meningkatkan respon imun (Abdulelah & Zainal, 2007).

Ikan nila (*Oreochromis niloticus* L.) merupakan ikan air tawar yang paling banyak dibudidayakan di dunia. Budidaya ikan nila telah memberikan kontribusi untuk akuakultur dunia sejak zaman Mesir kuno dan tetap menjadi spesies ikan air tawar utama yang terus dibudidayakan. Untuk memenuhi permintaan produk perikanan yang terus meningkat, penerapan intensifikasi budidaya tidak dapat dihindarkan. Namun, intensifikasi budidaya dapat menimbulkan berbagai dampak penyakit (Shelton & Popma, 2006).

Salah satu jenis penyakit bakterial yang sering menyerang budidaya ikan nila adalah penyakit Streptococcosis. Penyakit ini disebabkan oleh serangan dari bakteri *Streptococcus agalactiae* yang dapat menyebabkan kematian yang tinggi pada organisme budidaya perairan (Shoemaker & Klesius, 1997). Ikan nila yang terinfeksi bakteri *S. agalactiae* memperlihatkan gejala-gejala seperti kehilangan nafsu makan, tulang belakang bengkak, pendarahan di mata, pendarahan pada dasar sirip dan operkulum. Tanda-tanda yang paling menonjol adalah perut menjadi buncit dan berenang tidak menentu (Evans dkk., 2006a).

---

\* Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin, Jln. Perintis Kemerdekaan Km. 16, Makassar, 90245, email: tinjordan23@yahoo.com

Untuk menanggulangi infeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila para pembudidaya menerapkan beberapa tindakan pencegahan dan terapi antibiotik. Selama ini antibiotik sintetis banyak digunakan untuk menghambat atau membunuh bakteri patogen pada budidaya ikan. Namun dampak dari penggunaan antibiotik sintetis secara terus-menerus dapat menghasilkan strain bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik yang telah ada. Akumulasi residu antibiotik dalam organisme budidaya berpotensi merusak kesehatan manusia dan hewan yang mengkonsumsinya dan juga terhadap lingkungan sekitarnya (Muniruzzaman & Chowdhury, 2004).

Oleh karena itu, untuk menghindari efek samping yang ditimbulkan akibat penggunaan antibiotik sintetis, maka dilakukan solusi dengan fitoterapi (penggunaan bahan alami dari tanaman untuk pengobatan penyakit). Penggunaan bahan-bahan alami untuk mengendalikan hama dan penyakit pada organisme budidaya lebih disarankan karena relatif lebih aman dan tidak meninggalkan residu antibiotik dalam organisme budidaya (Zainuddin & Malina, 2009).

Sampai saat ini penanggulangan infeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus* L.) masih menggunakan antibiotik sintesis, sehingga perlu dilakukan upaya penanggulangan dengan menggunakan antibiotik alami seperti biji jintan hitam yang dapat berperan sebagai zat antibakteri. Tujuan penelitian adalah untuk menemukan potensi bioaktif dari biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap bakteri patogen *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus* L.).

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2015 sampai dengan Juli 2015 di Laboratorium Mikrobiologi Laut, Hatcheri (Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan), Laboratorium Kualitas Air, Laboratorium Biofarmaka, dan di Laboratorium Oseonografi Kimia Universitas Hasanuddin, Makassar Sulawesi Selatan.

Bahan yang digunakan adalah ikan nila (*Oreochromis niloticus*), biji jintan hitam (*Nigella sativa*), strain bakteri patogen uji *Streptococcus agalactiae*, media TSA (*Triptic Soy Agar*), media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*) pelarut n-heksana, etanol, metanol (MeOH), kloramfenikol, dimetilsulfoksida (DMSO), alkohol 70%, larutan fisiologis NaCl 0,9%, akuades, air laut steril, safranin, spiritus, kertas saring Whatman no.1, *paper disc*, kapas, kertas label, tisu, dan aluminium foil.

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut inkubator, rotavapor, *laminar air flow*, lemari pendingin, *hot plate*, *magnetic stirrer*, oven, mikropipet, *vortex mixer*, timbangan analitik, *autoclave*, pisau/gunting, ember, blender, saringan, *gloves*, jarum ose bundar, lampu bunsen, botol sampel, gelas piala, cawan petri, tabung reaksi, spatula, *cool box*, labu Erlenmeyer, gelas ukur, tabung Eppendorf, corong, botol vial, jangka sorong, akuarium, bak fiber, aerator, serokan, timbangan digital.

### Sterilisasi Peralatan

Alat-alat yang digunakan dicuci bersih dengan deterjen lalu dibilas dengan air kran dan terakhir dengan akuades. Alat tersebut kemudian dikeringkan di oven pada suhu 60-70°C. Peralatan yang terbuat dari gelas, tidak tahan pada pemanasan dengan suhu tinggi, distersilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Jarum ose disterilkan dengan cara pemanasan langsung pada api bunsen hingga memijar.

### Proses Ekstraksi Biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.)

Proses ekstraksi biji jintan hitam (*Nigella sativa*) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Proses ekstraksi dilakukan secara berturut-turut, dimulai dari pelarut non-polar, sampai polar. Pelarut yang digunakan secara berturut-turut mulai dari n-heksana, etanol, dan metanol.

Sampel serbuk jintan hitam sebanyak 25 gram dimaserasi menggunakan pelarut n-heksan sebanyak 200 mL dalam labu Erlenmeyer dan diekstraksi di atas *magnetic stirrer* dengan putaran sedang. Ekstraksi dilakukan selama 24 jam dan diulang sebanyak tiga kali. Setelah diekstraksi dengan pelarut n-heksan, ampas dikeringkan terlebih dahulu sebelum diremaserasi dengan pelarut etanol dan begitu seterusnya hingga pelarut terakhir yaitu metanol.

Setelah selesai proses ekstraksi, pelarut organik diuapkan secara vakum pada rotavapor sampai diperoleh ekstrak kasar. Ekstrak yang belum kering sempurna, selanjutnya diuapkan airnya dengan cara diliofilisasi dengan menggunakan *freeze dryer*.

Ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam vial yang telah diketahui beratnya. Setelah pelarut kering, ekstrak ditimbang beratnya dan disimpan di *freezer* sampai akan digunakan untuk pengujian. Untuk menghitung rendemen ekstrak digunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

### **Pengujian Antibakteri Dengan Metode Difusi Agar**

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri adalah metode difusi agar (Zainuddin, 2006). Setiap ekstrak kasar (n-heksana, etanol, dan metanol) ditimbang dengan konsentrasi 2 mg/50  $\mu$ L/disk, lalu dimasukkan ke dalam tabung Ependorf dan dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya. Selanjutnya dihomogenkan dengan menggunakan vortex dan siap untuk dilakukan pengujian.

Organisme yang digunakan dalam pengujian adalah bakteri patogen yang biasa menginfeksi ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Bakteri patogen yang digunakan sebagai bakteri uji adalah kultur murni *Streptococcus agalactiae* yang berasal dari Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor (IPB).

Pembuatan suspensi bakteri uji dilakukan dengan cara mengambil 2 ose kultur murni bakteri yang akan diuji, kemudian disuspensikan dalam 3 mL media cair TSB steril dan divortex hingga merata. Sebanyak 200  $\mu$ L suspensi bakteri uji dicampurkan dalam 20 mL media TSA (*Tryptic Soy Agar*) yang hangat dan diaduk perlahan di dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Kemudian tiap-tiap ekstrak diteteskan sebanyak 50  $\mu$ L pada kertas disk yang berbeda dan kemudian dibiarkan menguap sehingga betul-betul kering sebelum diletakkan secara hati-hati dan aseptis pada permukaan media agar yang telah dihomogenkan dengan mikroba. Kemudian diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24 jam. Sebagai kontrol positif, digunakan antibiotik komersil tetrasiklin 30 ppm. Kontrol negatif yang digunakan adalah pelarut yang digunakan untuk ekstraksi (n-heksan, etanol, dan metanol). Setelah masa inkubasi aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona penghambatan (Zona bening/Zona halo) di sekitar kertas disk dimana hal tersebut menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri dan diukur menggunakan jangka sorong.

Setelah masa inkubasi, diameter zona hambat (daerah terang atau halo) dinyatakan berdasarkan zona bening yang dihasilkan di sekitar *paper disc*. Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri diukur dalam satuan mm dan dijadikan ukuran kuantitatif untuk ukuran zona hambat. Jika = 6 mm (tidak aktif), >6 dan  $\leq$ 10 (aktivitas rendah), >10 dan  $\leq$ 15 (aktivitas sedang), >15 dan  $\leq$ 20 (aktivitas tinggi) dan >20 (aktivitas sangat tinggi) (Zainuddin, 2006).

### **Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)**

Konsentrasi hambat minimum (KHM) dari ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) ditentukan dengan metode difusi agar menggunakan *paper disc*. Penentuan KHM dari ekstrak dilakukan terhadap bakteri patogen uji menggunakan kisaran konsentrasi kelipatan 0,5 yang dimulai dari 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm dan 15,625 ppm/disk. Efek penghambatan dianalisa secara deskriptif terhadap grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak dan diameter zona hambat. Penentuan nilai KHM hanya dilakukan terhadap ekstrak yang ditemukan berpotensi menghambat bakteri patogen uji

### **Analisis Data**

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen dengan pengambilan data dilakukan secara pengamatan langsung. Data dianalisis statistik menggunakan *one way ANOVA (Analysis of Variance)* dengan program software SPSS dan dilanjutkan dengan uji Tukey untuk melihat perbedaan

antara perlakuan. Sedangkan data kelangsungan hidup ikan dalam uji LC<sub>50</sub> dianalisis melalui program Probit Analysis yang dibantu dengan tabel probit dan untuk persamaan regresi digunakan *Microsoft Excell*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil Rendamen Ekstrak Biji jintan hitam (*Nigella sativa*)

Proses ekstraksi biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi kinetik memakai pelarut dengan polaritas yang berbeda secara berkelanjutan (n-heksana, etanol dan metanol). Setelah diuapkan dengan menggunakan rotavapor berat ekstrak kemudian ditimbang. Serbuk biji jintan (*Nigella sativa* L.) sebanyak 300 g yang diekstraksi memberikan hasil rendemen ekstrak tertinggi dari pelarut non-polar yaitu n-heksana (6.83%) disusul oleh pelarut etanol (5.25%) sedangkan pelarut metanol memberikan rendemen ekstrak sebesar (4.1%) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil ekstrak kasar dari berat biomas dan volume pelarut yang berbeda yang diperoleh selama penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin, Makassar.

Berat Biomassa (g)	Pelarut	Volume Pelarut (ml)	Berat Ekstrak Kasar		Warna
			(mg)	%	
300	n-Heksana	200	20.482	6.83	Coklat Tua
	Etanol	200	15.754	5.25	Coklat kehitaman
	Metanol	200	13.259	4.41	Coklat Muda

### Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.)

Uji aktivitas antibakteri biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) dilakukan menggunakan metode difusi agar. Secara keseluruhan 3 ekstrak non-polar, semi-polar dan polar (n-heksana, etanol dan metanol) dari biji jintan hitam (*N. sativa*) diuji aktivitasnya terhadap bakteri patogen *Streptococcus agalactiae* yang berasal dari koleksi kultur murni Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor (IPB).

Uji Tukey menunjukkan bahwa terhadap bakteri *Streptococcus agalactiae* diameter zona hambat tertinggi diperlihatkan oleh ekstrak etanol yaitu sebesar 15,33 mm yang berbeda nyata dengan ekstrak n-heksana (6,00 mm) dan metanol (12.67 mm). Adapun zona hambat antibiotik kontrol tetrasiklin (30 ppm) yaitu sebesar 18.0 mm dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata diameter zona hambat dari ekstrak biji jintan (*Nigella sativa*) terhadap bakteri *Streptococcus agalactiae* yang diperoleh selama penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin, Makassar.

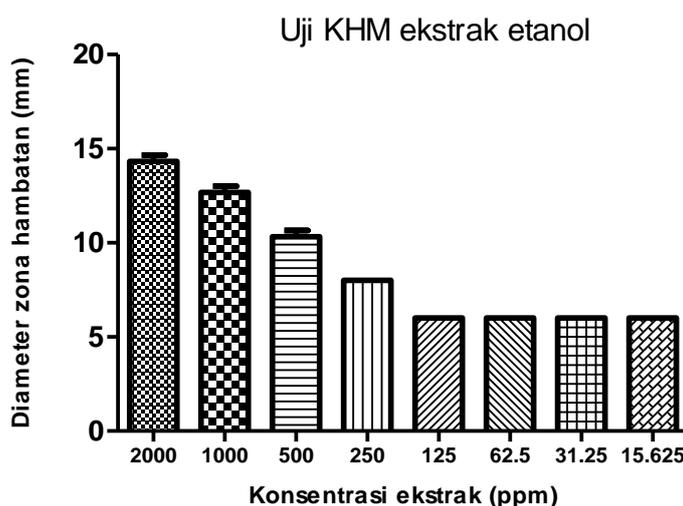
Ekstrak	Rata-rata diameter zona hambat terhadap <i>Streptococcus agalactiae</i>
n-Heksana	6,00±0 <sup>a</sup>
Etanol	15,33±0,58 <sup>c</sup>
Metanol	12.67±0,58 <sup>b</sup>

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan pada taraf p<0,05.

### Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Ekstrak aktif dari biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) yaitu ekstrak etanol digunakan dalam penentuan nilai KHM. Penentuan nilai KHM dilakukan dengan metode difusi agar terhadap strain bakteri patogen *Streptococcus agalactiae* dengan menggunakan kisaran konsentrasi ekstrak berkelipatan 0,5 dimulai dari 2000 ppm sampai 15,625 ppm yang dibuat secara *triplo*.

Dari hasil uji KHM diperoleh hasil yaitu konsentrasi minimum ekstrak etanol untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalactiae* adalah 250 ppm, karena pada konsentrasi lebih rendah yaitu 15,625 ppm tidak ada daya hambat yang dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Konsentrasi hambat minimum (KHM) dari ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Streptococcus agalactiae* [Metode Difusi Agar; n= 2; 2000-15,625 ppm, Ø zona hambat (mm) termasuk Ø disk (6 mm)] yang diperoleh selama penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin, Makassar.

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak biji jintan hitam memiliki potensi antibakteri terhadap bakteri uji *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila. Ekstrak etanol memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalactiae* yang dilihat dari uji difusi bakteri.

Berdasarkan penelitian Sultan dkk (2009), menemukan bahwa biji jintan hitam (*N. sativa*) mengandung karbohidrat, protein dan lemak yang tinggi. Menurut Hosseinzadeh dkk (2007), senyawa yang umumnya terekstrak oleh n-heksana adalah lilin, lemak, minyak, dan minyak atsiri. Tingginya rendemen ekstrak n-heksana menunjukkan kandungan lemak biji jintan hitam (*N. sativa*) cukup tinggi. Senyawa yang umum larut dalam etanol adalah glikosida dan *Thymoquinone*, sedangkan senyawa yang umum larut dalam metanol adalah alkaloid, aglikon, dan glikosida.

Menurut Thongson dkk (2004), komponen antibakteri dalam ekstrak bahan alami umumnya adalah golongan fenolik yang bersifat polar. Komponen yang umumnya larut dalam n-heksana adalah lilin, lemak, komponen terpenoid. Ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) yang menunjukkan spektrum antibakteri yang luas adalah ekstrak etanol dan ekstrak metanol karena dapat menghambat bakteri uji *Streptococcus agalactiae*. Ekstrak etanol dan metanol mengandung komponen antibakteri yang cenderung bersifat polar.

Hasil penelitian Najah (2012), menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) dengan diameter zona hambat sebesar 12.7 mm dan 10.4 mm terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus mitis*. Penelitian Salman dkk (2008), melaporkan bahwa ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) menghasilkan aktivitas antibakteri terhadap berbagai mikroba dan terutama terhadap bakteri Gram-positif.

Melalui uji LC<sub>50</sub> selama 24 jam, dosis 2000 ppm menyebabkan kematian pada larva ikan nila (*O. niloticus*). Hal ini diduga karena senyawa *nigellin* yang berlebihan dan terasa pahit dari ekstrak

etanol mengganggu laju pernafasan dan proses fisiologis dari larva ikan uji sehingga menyebabkan kematian pada larva ikan nila (*O. niloticus*).

Nilai KHM adalah konsentrasi terendah dari ekstrak uji yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Hal ini sangat bermanfaat guna menghindari efek toksik atau mematikan terhadap organisme budidaya yang merupakan inang dari bakteri patogen pada ikan serta terhadap manusia yang mengkonsumsi ikan akibat terakumulasinya antibiotik dalam ikan konsumsi (Zainuddin, 2006). Konsentrasi hambat minimum (KHM) didefinisikan sebagai nilai terendah dari konsentrasi antimikroba yang akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme setelah inkubasi 24 jam (Andrews, 2001).

## KESIMPULAN

Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar terhadap bakteri patogen *Streptococcus agalactiae*, diperoleh aktivitas tertinggi pada ekstrak semi-polar etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) dengan diameter zona hambat 15,33 mm, disusul ekstrak polar metanol dengan diameter zona hambat 12,67 mm. Ekstrak non-polar n-heksana tidak memperlihatkan aktivitas terhadap bakteri uji. Hasil pengujian sitotoksitas dari ekstrak semi-polar etanol, memperlihatkan hanya konsentrasi 2000 ppm yang memperlihatkan efek toksik yang sedang terhadap larva ikan nila (*Oreochromis niloticus*) ( $LC_{50}$ = 630.9 ppm). Konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak etanol terhadap bakteri *Streptococcus agalactiae* adalah 125 ppm.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Alexander Rantetondok, M.Fish, Sc dan Dr. rer. nat. Elmi Nurhaidah Zainuddin, DES yang telah banyak membantu membimbing selama penelitian.

## Daftar Pustaka

- Abdulelah H.A.A. & Zainal – Abidin B.A.H. (2007). *In vivo Anti-Malarial Test of Nigella sativa (Black Seed) Different Extracts*. American Journal of Pharmacology and Toxicology, Vol. 2 (2): 46-50. ISSN: 1557-4962.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2001) 48, 5-16.
- Evans J.J., Pasnik D.J., Klesius P.H., & Shoemaker C.A. (2006a). Identification and epidemiology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* in tilapia, *Oreochromis* spp. *International Symposium on Tilapia in Aquaculture* 7 (pp. 25-42). Charles Town, WV, USA, American Tilapia Association.
- Hosseinzadeh H., Parvardeh S. Asl M.N. Sadeghnia H.R & Ziaee T. (2007). Effect of thymoquinone and *Nigella sativa* seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus. *Phytomedicine*, 14: 621-627. DOI: 10.1016/j.phymed.2006.12.005
- Muniruzzaman M. & Chowdhury M.B.R. (2004). Sensitivity of fish pathogenic bacteria to various medicinal herbs. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 2004; 2 (1): 75-82.
- Najah A. Mohammed. (2012). Effect of *Nigella Sativa* L. extracts against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus mitis* in Vitro. *J Bagh Coll Dentistry* 2012; 24(3):154-157.
- Salman MT., Khan RA., & Shukla I. (2008). Anti-microbial activity of *Nigella sativa* Linn. Seed oil against multi drug resistant bacteria from clinical isolates. *Nat Prod Rad* 2008; 7: 10-14.
- Shelton W.L. & Popma T.J. (2006). *Biology: Tilapia biology, culture and nutrition*. New York, NY, USA: Food Production Press.
- Shoemaker, C.A., & Klesius, P.H. (1997). *Streptococcal disease problem and control: A review*. Tilapia Aquaculture Ithaca, NY, USA. Northwest Regional Aquaculture Engineering Service.
- Sultan, M.T., Masood, S.B., Faqir, M.A., Amer, J., Saeed, A., dan Muhammad, N. (2009). *Nutritional Profile of Indigenous Cultivar of Black Cumin Seeds and Antioxidant Potential of Its Fixed and Essential Oil*. *Pakistan Journal Botani*, Vol. 41(3): 1321-1330.
- Thongson, C., P. M. Davidson, W. Mahakarnchanakul & J. Weiss. (2004). Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent-extracted spices. *Letters in Applied Microbiology*. 39:401-406.
- Zainuddin, E.N. (2006). Chemical and Biological Investigations of Selected Cyanobacteria (Blue-green Algae). PhD Thesis, University Greifswald.
- Zainuddin, E.N. & A.C. Malina. (2009). Skrining rumput laut komersil asal Sulawesi Selatan sebagai antibiotik melawan bakteri patogen pada ikan. Penelitian Research Grant, Biaya IMHERE-DIKTI.