

Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Minyak Atsiri Daun Asam Jungga (*Citrus jambhiri* Lush)

Helmina Br. Sembiring

Departmen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara, Padang Bulan Medan 20155

*Penulis korespondensi: helmina.sembiring@usu.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v6.n1.16446>

Abstrak: Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis senyawa kimia yang terdapat pada minyak atsiri daun asam jungga (*Citrus jambhiri* Lush) serta menguji aktivitas antioksidan dan antibakteriminyak atsiri tersebut. Minyak atsiri daun asam jungga diisolasi dengan metode hidrodestilasi menggunakan alat Stahl. Minyak atsiri diperoleh sebanyak 3,6 g (0,8%) dari 450 g serbuk kering daun asam jungga. Berdasarkan analisis spektroskopi GC-MS yang dilakukan minyak atsiri daun asam jungga memiliki sepuluh senyawa kimia, namun sebanyak sembilan senyawa yang dapat diinterpretasi. Kesembilan senyawa kimia tersebut adalah γ -terpinen (36,67%), toluena (18,15%), β -osimen (9,35%), 1-metil-2-(1-metiletil)-benzena (8,85%), limonen (8,78%), β -pinen (7,80%), germasren (6,39%). α -thujen (1,69%) dan 2,3,5-trimetil-1,3,6-heptatriena (1,41%). Aktivitas antioksidan minyak atsiri daun asam jungga diuji berdasarkan metode penangkapan radikal bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan aktivitas antibakteri diuji berdasarkan metode difusi kertas cakram. Minyak atsiri daun asam jungga memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 52,14 μ g/mL sedangkan asam askorbat sebagai control positif memiliki nilai IC₅₀ sebesar 12,08 μ g/mL dan aktivitas antibakteri dengan kategori sedang terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli* pada konsentrasi 40% (v/v) dengan zona bening masing-masing sebesar 14,7 dan 14,4 mm.

Kata kunci: *Citrus jambhiri* Lush, minyak atsiri, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), difusi, hidrodestilasi

Abstract: This study aims to analyze the chemical compounds found in the essential oil of asam jungga leaves (*Citrus jambhiri* Lush) as well as to test the antioxidant and antibacterial activity of the essential oil. The essential oil of asam jungga leaves was isolated by hydrodistillation method using Stahl tool. Essential oil obtained as much as 3.6 g (0.8%) of 450 g of fresh asam jungga leaves. Based on GC-MS analysis essential oil of asam jungga leaves had ten chemical compounds, but as many as nine compounds that can be interpreted. The nine chemical compounds are γ -terpinen (36.67%), toluene (18.15%), β -osimen (9.35%), 1-methyl-2- (1-methylethyl) -benzene (8.85 %), limonene (8.78%), β -pinen (7.80%), germasren (6.39%). α -thujen (1.69%) and 2,3,5-trimethyl-1,3,6-heptatriene (1.41%). The antioxidant activity of essential oils of asam jungga leaves was tested based on free radical scavenger DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method and antibacterial activity was tested by disc-paper diffusion method. The essential oil of asam jungga leaves had antioxidant activity with IC₅₀ value of 52.14 μ g/mL whereas ascorbic acid as positive control had IC₅₀ value of 12.08 μ g/mL and medium antibacterial activity against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* bacteria at concentration of 40% (v/v) with clear zone of 14.7 and 14.4 mm, respectively.

Keywords: *Citrus jambhiri* Lush, essential oil, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), diffusion, hydrodistillation

PENDAHULUAN

Asam jungga (*Citrus jambhiri* Lush) sering disebut jeruk sundai atau asam sundai. Buah asam jungga ini mirip dengan jeruk purut, namun memiliki aroma yang berbeda dengan jeruk purut (Baymolo 2002). Asam jungga banyak dipergunakan oleh masyarakat Batak Toba sebagai bahan utama pembuatan makanan khas *dekke naniura*. Daging ikan mas yang sudah dibelah dipercikkan sari asam jungga, kemudian ditambah bumbu-bumbu lain, dibiarkan setengah jam, ikan mas tersebut sudah dapat dimakan (Purba, 2011). Penambahan asam jungga akan meningkatkan aroma sedap pada ikan

mas dengan tidak mempengaruhi kandungan gizi ikan mas tersebut (Tarigan *et al.* 2016; Manalu, 2009). Di dalam sari asam jungga terdapat vitamin C sebesar 70.0 mg/100 g yang berperan penting sebagai zat antioksidan alami (Muhammed *et al.* 2013).

Antioksidan merupakan zat yang mampu menghambat/menunda oksidasi suatu molekul dengan cara mengakhiri reaksi berantai, inisiasi dan propagasi (Molyneux 2004). Gupta (2011) menyebutkan bahwa berbagai macam penyakit di dalam tubuh manusia disebabkan oleh radikal bebas atau spesi oksigen reaktif yang menyebabkan degradasi oksidatif (Shimamura *et al.* 2014). Radikal

bebas mampu bereaksi dengan lipid, protein, dan asam nukleat yang pada akhirnya dapat menyebabkan kanker, sehingga dibutuhkan antioksidan untuk menetralkisir radikal bebas beserta spesi oksigen reaktif tersebut (Tsai *et al.* 2011).

Bahan pangan seperti ikan mas dapat bertindak sebagai substrat untuk pertumbuhan mikroorganisme patogenik penyebab penyakit seperti bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus* (Siagian 2002) sehingga diperlukan suatu zat yang dapat membunuh mikroorganisme tersebut seperti sari asam jugga. Kulit buah segar asam jungga mengandung minyak atsiri. Minyak atsiri adalah campuran kompleks dari minyak yang mudah menguap atau minyak terbang yang diperoleh dari tanaman dengan cara destilasi (Sastrohamidjojo 2004; Baser 2010; Guenther 1987).

Muhamed *et al.* (2013) telah melakukan isolasi dan identifikasi komponen kimia minyak atsiri kulit segar buah asam jungga dan terdapat 6 komponen kimia minyak atsiri dengan kadar paling banyak adalah limonen sebesar 84,5%. Minyak atsiri mempunyai kemampuan sebagai antibakteri, antijamur, antioksidan dan antiviral (Bassolé & Juliani 2012), antiinflamasi (Hamdan *et al.* 2011) dan banyak digunakan sebagai bahan pewangi atau penyedap baik dalam kosmetik, makanan, minuman, sabun maupun obat-obatan (Mulyani *et al.* 2009).

Minyak atsiri asam jungga bermanfaat sebagai antiinflamasi, antitumor, antibakteri dan anti jamur (Hamdan *et al.* 2013). Berdasarkan uji organoleptik yang dilakukan, daun asam jungga juga mengandung minyak atsiri, namun belum ada penelitian yang dilakukan terhadap daun asam jungga tersebut.

Berdasarkan uraian di atas pada penelitian ini diteliti komponen senyawa kimia minyak atsiri daun asam jungga (*Citrus jambhiri* Lush) serta aktivitas antioksidan dan antibakterinya. Minyak atsiri tersebut diisolasi dengan metode hidrodestilasi menggunakan alat Stahl, penentuan komponen senyawa kimia dilakukan dengan metode spektroskopi GC-MS, uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dengan menggunakan asam askorbat sebagai pembanding dan uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi kertas cakram terhadap bakteri *B. cereus* dan *E. coli*.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Daun asam jungga yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari desa Pangaloan, kecamatan Pahae Jae, Kabupaten Tapanuli Utara, Sumatera Utara.

Isolasi Minyak Atsiri Daun Asam Jungga

Sebanyak 150 g serbuk keringdaun asam jungga dimasukkan ke dalam labu Stahl volume 1000 mL ditambahkan air suling 200 mL dan dididihkan selama 5 jam di atas penangas minyak hingga minyak atsiri menguap. Destilat yang diperoleh merupakan

campuran minyak atsiri dengan air yang selanjutnya dipisahkan dengan corong pisah. Minyak atsiri yang diperoleh dikeringkan dengan penambahan natrium sulfat anhidrat (Bausbia *et al.* 2009). Komponen kimia minyak atsiri tersebut dianalisis dengan spektrofotometer GC-MS (QP2010S SHIMADZU) dan dilakukan uji aktivitas antioksidan dan antibakteri.

Uji Aktivitas Antioksidan Minyak Atsiri Daun Asam Jungga

Sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,3 mM dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2,5 mL minyak atsiri daun asam jungga dengan konsentrasi 10 µg/mL, dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit pada ruang gelap. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis (SP-300) pada panjang gelombang maksimum (515 nm). Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali. Perlakuan yang sama dilakukan untuk konsentrasi 20, 30 dan 40 µg/mL kemudian dihitung persentase peredaman radikal bebas DPPH berdasarkan persamaan (1) (Molyneux 2004), dengan menggunakan asam askorbat sebagai pembanding.

$$\text{Persentase peredaman} = \left(\frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{blanko}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

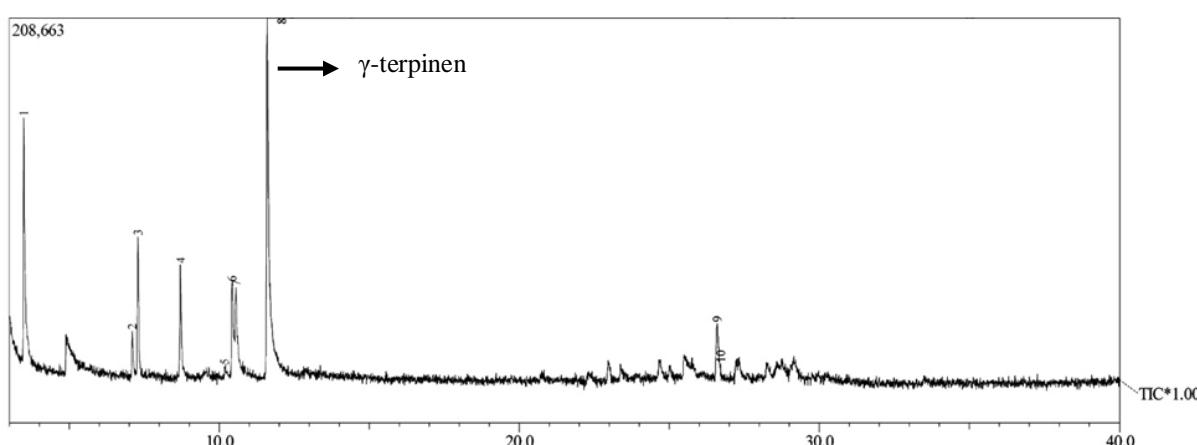
Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Asam Jungga

Media Mueller Hinton Agar (MHA), media Nutrient Broth (NB) dan inokulum bakteri dalam media NB dibuat sesuai dengan prosedur Ruangpan & Tendencia (2004) dan Bauer *et al.* (1966). Variasi konsentrasi minyak atsiri daun asam jungga dibuat sebesar 10, 20, 30, 40 dan 50% (v/v) dengan menggunakan pelarut DMSO. Sebanyak 0,1 mL inokulum bakteri *B. cereus* dimasukkan kedalam cawan petri, kemudian ditambahkan 15 mL media MHA dengan suhu 45-50°C dan dibiarkan sampai media memadat. Kertas cakram yang telah mengandung minyak atsiri diletakkan pada cawan petri dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam dalam inkubator (Mithraja *et al.* 2012). Zona bening yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Minyak Atsiri Daun Asam Jungga

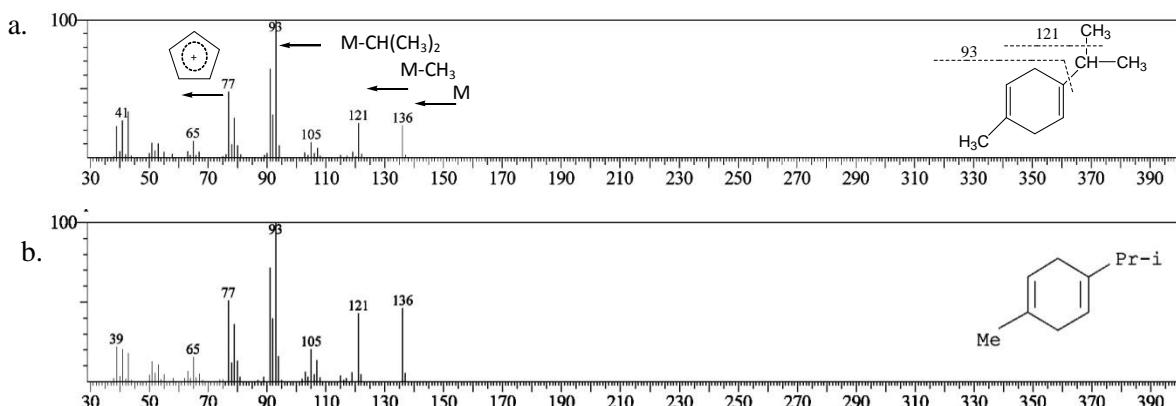
Minyak atsiri daun asam jungga diperoleh sebanyak 3,6 g (0,8%) dari 450 g serbuk kering daun asam jungga. Minyak atsiri tersebut berwarna kuning pucat dan berbau khas. Berdasarkan kromatogram spektroskopi GC-MS terhadap minyak atsiri daun asam jungga (Gambar 1) terdapat 10 puncak kromatogram yang menunjukkan bahwa minyak atsiri daun asam jungga tersebut mengandung 10 senyawa kimia minyak atsiri, namun sebanyak 9 senyawa yang dapat diinterpretasi sesuai dengan Wiley Library seperti tertera dalam Tabel 1. Senyawa kimia yang paling dominan dalam minyak atsiri daun



Gambar 1. Kromatogram GC-MS minyak atsiri daun asam jungga

Tabel 1. Komponen senyawa kimia yang terdapat dalam minyak atsiri daun asam jungga

No Puncak	Waktu Retensi (Menit)	Massa Molekul	Rumus Molekul	Nama Senyawa	Area (%)
1	3,49	92	C_7H_8	Toluena	18,15
2	7,11	136	$C_{10}H_{16}$	α -Thujen	1,69
3	7,30	136	$C_{10}H_{16}$	β -Osimen	9,35
4	8,71	136	$C_{10}H_{16}$	β -Pinen	7,80
5	10,18	136	$C_{10}H_{16}$	2,3,5-trimetil-1,3,6-Heptatriena	1,41
6	10,43	134	$C_{10}H_{14}$	1-metil-2-(1-metiletik)-Benzena	8,85
7	10,56	136	$C_{10}H_{16}$	Limonen	8,78
8	11,60	136	$C_{10}H_{16}$	γ -Terpinen	36,67
9	26,60	204	$C_{15}H_{24}$	Germasren	6,39



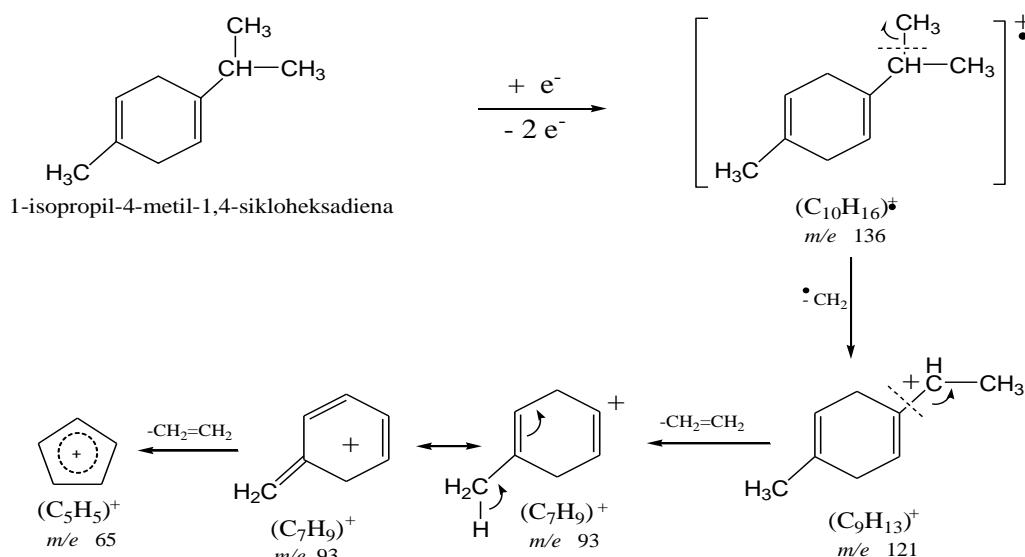
Gambar 2. (a) Spektrum massa hasil analisa spektroskopii GC-MS senyawa γ -terpinen (1-isopropil-4-metil-1,4-sikloheksadien) dan(b) Standard Wiley library

asam jungga dengan kadar sebesar 36,67% adalah γ -terpinen (1-isopropil-4-metil-1,4-sikloheksadien) dengan waktu retensi 11,60 menit merupakan senyawa dengan rumus molekul $C_{10}H_{16}$. Data spektrum (Gambar 2a) menunjukkan puncak ion molekul pada m/e 136 dan puncak-puncak fragmentasi pada m/e 121, 93 dan 65. Berdasarkan perbandingan data spektrum wiley library (Gambar 2b) data spektrum yang diperoleh yang lebih mendekati adalah senyawa γ -terpinen (1-isopropil-4-

metil-1,4-sikloheksadien) dengan pola fragmentasi secara hipotesis ditunjukkan pada Gambar 3.

Aktivitas Antioksidan Minyak Atsiri Daun Asam Jungga

Aktivitas antioksidan minyak atsiri daun asam jungga dapat ditentukan berdasarkan pengukuran absorbansi larutan minyak atsiri yang telah ditambah dengan larutan DPPH 0,3 mM. Berdasarkan absorbansi yang diperoleh persentase peredaman radikal bebas DPPH dapat dihitung menggunakan



Gambar 3. Pola Fragmentasi MS Senyawa 1-isopropil-4-metil-1,4-sikloheksadiena

persamaan (1). Absorbansi dan persentase peredaman radikal bebas DPPH oleh minyak atsiri daun asam jungga tertera dalam Tabel 2.

Tabel 2. Absorbansi dan persentase peredaman radikal bebas DPPH oleh minyak atsiri daun asam jungga

Konsentrasi Minyak Atsiri ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi	Peredaman (%)
Blanko	0,89	0,00
10	0,76	8,41
20	0,71	12,57
30	0,64	16,38
40	0,54	21,32

Antioksidan dapat mendeaktivasi radikal bebas dengan dua mekanisme yaitu dengan cara mentransfer atom hidrogen atau transfer elektron tunggal (Prior *et al.* 2005). Semakin tinggi konsentrasi maka persentase peredaman semakin besar. Aktivitas antioksidan suatu senyawa dinyatakan dengan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi suatu senyawa antioksidan yang dibutuhkan untuk manangkap 50% radikal bebas DPPH pada waktu 15-30 menit yang ditandai dengan perubahan warna ungu pada larutan menjadi warna kuning pucat (Saifu *et al.* 2012). Nilai IC_{50} dapat dihitung dari persamaan garis regresi $y = ax + b$ (Molineux 2004). Persamaan garis regresi untuk minyak aksiri daun asam jungga yaitu $y = 0,92x + 1,98$ sehingga diperoleh nilai IC_{50} sebesar 52,14 $\mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan Sembiring *et al.* (2015) nilai IC_{50} asam askorbat sebesar 12,08 $\mu\text{g/mL}$. Ini menunjukkan bahwa aktivitas minyak atsiri daun asam jungga memiliki kekuatan sekitar 1:3 dibandingkan dengan kekuatan asam askorbat sebagai senyawa antioksidan.

Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Asam Jungga

Kemampuan minyak atsiri daun asam jungga menghambat pertumbuhan bakteri ditentukan berdasarkan zona bening yang ditimbulkan disekitar kertas cakram terhadap bakteri *E. coli* dan *B. cereus* seperti yang tertera dalam Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3 dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri maka zona bening semakin besar karena semakin banyak bahan aktif yang berdifusi melalui kertas cakram kearah bakteri. Minyak atsiri kulit buah asam jungga dapat dikatakan memiliki aktivitas sebagai terhadap bakteri *B. cereus* dan *E. coli* karena membentuk zona bening disekitar kertas cakram yang telah dibasahi dengan minyak atsiri. Berdasarkan Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), suatu zat dikatakan memiliki aktivitas antibakteri dengan kategori lemah jika diameter zona bening ≤ 12 mm, kategori sedang jika diameter zona bening berada diantara 13-17 mm dan kategori kuat jika diameter zona bening ≥ 18 mm. Minyak atsiri daun asam jungga termasuk kategori sedang terhadap bakteri *B. cereus* dan *E. coli* pada konsentrasi 40% dengan zona bening masing-masing sebesar 14,7 dan 14,4 mm.

Tabel 3. Diameter zona bening pertumbuhan bakteri yang ditimbulkan oleh minyak atsiri daun asam jungga

Konsentrasi Minyak Atsiri (%)	Diameter Zona Bening Minyak Atsiri Terhadap Bakteri (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>
10	7,9	8,5
20	9,6	10,6
30	11,2	11,8
40	14,4	14,7
50	15,8	16,4

Minyak atsiri daun asam jungga mengandung monoterpen dan seskuiterpen seperti tertera dalam Tabel 1, sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Yamasaki *et al.* 2007; Vardar-Ünlü *et al.* 2003). Diameter zona bening yang ditimbulkan oleh minyak atsiri daun asamjungga lebih besar terhadap bakteri Gram positif (*B. cereus*) dibandingkan bakteri Gram negatif (*E. coli*). Hal ini disebabkan karena bakteri Gram positif lebih sensitif terhadap senyawa aktif dibandingkan bakteri Gram negatif. Struktur dinding sel bakteri Gram positif lebih sederhana dan berlapis tunggal dengan kandungan lipid yang lebih sederhana (1-4 %) sehingga memudahkan bahan aktif masuk ke dalam sel. Sedangkan sel bakteri Gram negatif lebih kompleks yang terdiri dari lapisan luar lipoprotein, lapisan tengah polisakarida yang berperan menghalangi masuknya bahan senyawa aktif dan lapisan dalam berupa peptidoglikan dengan kandungan lipid tinggi (11-22 %) (Mulyani 2009; Chan *et al.* 2010).

KESIMPULAN

Minyak atsiri daun asam jungga diperoleh sebanyak 3,6 g (0,8%) dari 450 g serbuk kering daun asam jungga. Berdasarkan analisis spektroskopi GC-MS minyak atsiri daun asam jungga memiliki 10 komponen senyawa kimia, namun sebanyak 9 senyawa yang dapat diinterpretasi yaitu γ -terpinen (36,67%), toluena (18,15%), β -osimen (9,35%), 1-metil-2-(1-metiletil)-benzena (8,85%), limonen (8,78%), β -pinen (7,80%), germasren (6,39%). α -thujen (1,69%) dan 2,3,5-trimetil-1,3,6-heptatriena (1,41%). Minyak atsiri daun asam jungga memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 52,14 μ g/mL dan aktivitas antibakteri dengan kategori sedang terhadap bakteri *B. cereus* dan *E. coli* pada konsentrasi 40% dengan zona bening masing-masing sebesar 14,7 dan 14,4 mm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Kepala Laboratorium Kimia Bahan Alam Hayati, Kepala Laboratorium Penelitian Farmasi Universitas Sumatera Utara, Kepala Laboratorium Penelitian dan Pengembangan UGM Yogyakarta dan masyarakat Desa Pangaloan Kecamatan Pahae Jae Kabupaten Tapanuli Utara Sumatera Utara.

DAFTAR PUSTAKA

- Baser, K.H.C. (2010). *Handbook of Essential Oils Science, Technology and Applications*. CRC Press. London.
- Bassolé, I.H.N. & Juliani, H.R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*. 17(4): 3989-4006.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45(4): 493-496.
- Bousbia, N., Vian, M.A., Ferhat, M.A., Petitcolas, E., Meklati, B.Y. & Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*. 114(1): 355-362.
- Baymolo, G. (2002). The effects of potting sizes on the growth of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) Rootstocks. [Disertasi]. School of Agricultural Sciences. University of Zambia.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K. & Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*. 144(1): 51-63.
- Guenther, E. (1987). *Minyak Atsiri*. Jilid 1. UI-Press. Jakarta.
- Gupta, A.D. & Rajpurohit, D., 2011. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Nutmeg (*Myristica fragrans*). In Preedy, V.R., Watson, R.R. & Patel, V.B. (eds). *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (pp. 831-839). Elsevier. Amsterdam.
- Hamdan, D.I., Abdulla, R.H., Mohamed, M.E. & El-Shazly, A.M. (2013). Chemical composition and biological activity of essential oils of *Cleopatra mandarin* (*Citrus reshni*) cultivated in Egypt. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 5(5): 83-90.
- Hamdan, D., El-Readi, M.Z., Tahrani, A., Herrmann, F., Kaufmann, D., Farrag, N., El-Shazly, A. & Wink, M. (2011). Chemical composition and biological activity of *Citrus jambhiri* Lush. *Food Chemistry*. 127(2): 394-403.
- Manalu, M.B.F. (2009). Memperkenalkan naniura makanan khas batak sebagai hidangan appetizer. *Majalah Ilmiah Panorama Nusantara*. 7: 52-61.
- Mithraja, M.J., Irudayaraj, V., Kiruba, S. and Jeeva, S. (2012). Antibacterial efficacy of *Drynaria quercifolia* (L.) J. Smith (Polypodiaceae) against clinically isolated urinary tract pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(1): S131-S135.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26(2): 211-219.
- Mohammed, A.M.H., Ibrahim, M.A., Omran, A.A., Mohamed, E.M. & Elsheikh, S.E. (2013). Minerals content, essential oils composition and physicochemical properties of *Citrus jambhiri* Lush. (Rough Lemon) from the Sudan. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*. 9: 25-30.
- Mulyani, S., Susilowati & Hutabarat, M.M. (2009). Analisis GC-MS dan daya antibakteri minyak atsiri *Citrus amblycarpa* (Hassk) Ochse. *Majalah Farmasi Indonesia*. 20(3): 127-132.
- Prior, R.L., Wu, X. & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and

- dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53(10): 4290-4302.
- Purba, A. (2011). Pengaruh Proses Pembuatan Dekke Naniura Terhadap Pertumbuhan Bakteri. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Sumatera Utara Medan.
- Sastrohamidjojo, H. (2004). *Kimia Minyak Atsiri.* Cetakan Pertama. UGM-Press. Yogyakarta.
- Seifu, D., Assefa, F. & Abay, S.M. (2012). Medicinal plants as antioxidant agents: understanding their mechanism of action and therapeutic efficacy. In Capasso, A. (eds). *Medicinal Plants as Antioxidant Agents: Understanding Their Mechanism of Action and Therapeutic Efficacy.* pp. 97-145.
- Sembiring, H.Br., Barus, T., Marpaung, L. & Simanjuntak, P. (2015). Antioxidant and antibacterial activity of some leaves extracts (methanol, ethyl acetate and *n*-hexane) of *Scurrula fusca* G. Don. *International Journal of PharmTech Research.* 8(9): 24-30.
- Siagian, A. (2002). Mikroba patogen pada makanan dan sumber pencemarannya. Skripsi. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Shimamura, T., Sumikura, Y., Yamazaki, T., Tada, A., Kashiwagi, T., Ishikawa, H., Matsui, T., Sugimoto, N., Akiyama, H. & Ukeda, H. (2014). Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives–inter-laboratory evaluation study. *Analytical Sciences.* 30(7): 717-721.
- Tarigan, O.J., Lestari, S. & Widiastuti, I. (2016). Pengaruh jenis asam dan lama marinasi terhadap karakteristik sensoris, mikrobiologis, dan kimia naniura ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Teknologi Hasil Perikanan.* 5(2): 112 – 122.
- Ruangpan, L. & Tendencia, E.A. (2004). Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquaculture. Southeast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Department, Iloilo, Philippines. 55 p.
- Tsai, S.Y., Huang, S.J., Chyau, C.C., Tsai, C.H., Weng, C.C. & Mau, J.L. (2011). Composition and antioxidant properties of essential oils from *Curcuma rhizome*. *Asian Journal of Arts and Sciences.* 2(1): 57-66.
- Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M., Dönmez, E. & Tepe, B. (2003). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51(1): 63-67.
- Yamasaki, Y., Kunoh, H., Yamamoto, H. & Akimitsu, K. (2007). Biological roles of monoterpenes volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense. *Journal of General Plant Pathology.* 73(3): 168-179.