

Status Mikrobiologi Tepung Ikan Rucah yang Diberi Ekstrak Daun Kersen sebagai Antibakteri pada Berbagai Lama Penyimpanan

Status of Microbiology Fish Meal Given Cherry Leaf Extract as Antibacterial in Various Storage Periods

Tito Maulana Akbar, Baginda Iskandar Moeda T., dan Retno Iswarin Pujaningsih

Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro
Corresponding e-mail : tito.maulanaakbar@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to determine and evaluate the quality of microbiological of fishmeal given cherry leaf extract on various storage periods. Cherry leaf extract was extracted by using soxhletation method. The concentration of cherry leaf extract used was 50%. Fish meal was added with cherry leaf extract in a ratio of 10: 1 (w / v), given treatment storage duration of each T₀ (0 storage time), T₁ (2nd storage time) and T₂ (4th storage time). Design used was Completely Randomized Design (CRD) with 3 treatments and 5 replications. Parameters observed were total bacteria, Gram +/- bacteria and identification of *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* qualitatively. Storage time treatment (T₁) was significantly different (P<0.05) on total bacteria, but not significantly different against Gram +/- bacteria. Qualitatively, *Escherichia coli* and *Salmonella sp* bacteria were not found in the sample used. Cherry leaf extract added to fish meal can reduce the total number of bacteria, the growth of Gram-bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* during storage.

Key words: fishmeal, cherry leaf extract, quality of microbiological, soxheltation.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan mengkaji kualitas tepung ikan rucah yang diberi ekstrak daun kersen secara mikrobiologi pada berbagai lama penyimpanan. Ekstrak daun kersen diekstraksi menggunakan metode sokletasi. Konsentrasi ekstrak daun kersen yang digunakan adalah 50%. Tepung ikan rucah ditambahkan ekstrak daun kersen dengan perbandingan 1 : 10 (v/w), diberi perlakuan lama penyimpanan masing-masing T₀ (lama penyimpanan minggu ke -0), T₁ (lama penyimpanan minggu ke-2) dan T₂ (lama penyimpanan minggu ke - 4). Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 5 ulangan. Parameter yang diamati adalah total bakteri, bakteri Gram +/- dan identifikasi *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* secara kualitatif. Perlakuan lama penyimpanan berbeda nyata (P < 0,05) terhadap total bakteri, namun tidak berbeda nyata (P > 0,05) terhadap bakteri Gram +/- . Secara kualitatif, tidak ditemukan bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* pada sampel yang digunakan. Ekstrak daun kersen yang ditambahkan pada tepung ikan rucah mampu mengurangi jumlah total bakteri, menekan bakteri Gram negatif, *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* selama penyimpanan.

Kata Kunci: Tepung ikan rucah, ekstrak daun kersen, kualitas mikrobiologi, sokletasi.

PENDAHULUAN

Ikan rucah merupakan hasil perikanan tangkap yang berukuran kecil atau limbah perikanan dari industri yang kurang memiliki nilai ekonomis. Ketersediaan dan kuantitas ikan rucah melimpah pada musim tangkap nelayan. Ikan rucah digunakan sebagai bahan pakan alternatif karena memiliki harga yang relatif murah dengan kandungan protein tinggi yaitu berkisar antara 40 - 65%. Harga ikan rucah berkisar antara Rp. 2.500 –

4.000/kg (Hidayatullah *et al.*, 2014). Kandungan nutrisi yang terdapat dalam ikan rucah meliputi protein kasar 58,97%, abu 27,89%, lemak 6,54%, serat kasar 1,64% (Utomo *et al.*, 2013). Kualitas pada tepung ikan sangat dipengaruhi oleh jenis ikan yang digunakan proses pengolahan serta metode pengawetan yang dilakukan. Permasalahan dari tepung ikan rucah yaitu memiliki kadar protein tinggi menjadi media yang baik untuk pertumbuhan mikroba, sehingga kualitas

tepung ikan dapat menurun selama proses penyimpanan.

Penurunan kualitas selama proses penyimpanan terjadi karena interaksi bahan pakan dengan kondisi organisme dan lingkungan (Suparjo, 2010). Batasan maksimum cemaran bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* adalah < 3 per g dan negatif per g dari 25g sampel (Standar Nasional Indonesia, 1996). Penurunan kualitas pakan selama penyimpanan dapat dihindari dengan penambahan bahan yaitu antijamur dan antibakteri.

Pengawetan merupakan suatu cara agar bahan dapat disimpan lebih lama dan dapat dipertahankan sifat fisik, kimia maupun mikrobiologinya. Pengawetan dapat dilakukan dengan penjemuran menggunakan sinar matahari ataupun oven. Penjemuran bertujuan untuk mengurangi kadar air bahan, sehingga menghambat bakteri untuk tumbuh. Penggunaan bahan pengawet kimia dapat dilakukan seperti antijamur, antikutu bahan pakan yang akan disimpan, namun akan menghasilkan residu yang berbahaya bagi manusia. Penggunaan bahan pengawet alami digunakan untuk menggantikan bahan pengawet buatan yaitu dengan menggunakan daun kersen yang mempunyai senyawa antibakteri.

Kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah sejenis pohon yang memiliki buah yang kecil dan manis. Tanaman kersen merupakan tanaman asli dari benua Amerika, namun telah tersebar di wilayah Asia. Tanaman kersen banyak ditemukan disetiap lahan kosong atau di tepi jalan (Ami, 2016). Bagian-bagian tanaman kersen yaitu batang, buah dan daunnya digunakan sebagai obat tradisional. Daun kersen memiliki potensi sebagai antibakteri karena mengandung flavonoid, saponin dan tanin (Zakaria *et al.*, 2006). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan mengkaji pengaruh perbedaan lama penyimpanan (0, 2, 4 minggu) terhadap tepung ikan rucah yang ditambahkan ekstrak daun kersen 1% (1/10 v/w) terhadap status mikrobiologi. Penelitian ini bermanfaat untuk memperoleh informasi

mengenai lama penyimpanan terbaik pada penyimpanan (0, 2, 4 minggu).

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan bulan Agustus 2017 sampai dengan Mei 2018 di Laboratorium Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis Mikrobiologi di Laboratorium Analisis Kesehatan SMK Theresiana, Semarang.

Materi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat yang terdiri dari timbangan digital, plastik cor, dandang, blender, saringan, seperangkat alat sokletasi, tabung reaksi, cawan petri, mikroskop, pipet, jarum ose, bunsen dan inkubator.

Bahan terdiri tepung ikan rucah, ekstrak daun kersen, etanol 97%, NaCl 0,85%, Medium NA (*Nutrient Agar*), Media *MacConkey*, larutan kristal violet, iodin, alkohol, media biokimia, *reagen kovac*, reagen *naphthol reagen*, *methyl red* dan KOH *creatin*.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi rancangan penelitian, prosedur penelitian dan analisis data.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan 5 ulangan, perlakuan yang dilakukan sebagai berikut :

- T1 : Tepung ikan + 1% (v/w) ekstrak daun kersen lama penyimpanan 0 minggu.
- T2 : Tepung ikan + 1% (v/w) ekstrak daun kersen lama penyimpanan 2 minggu.
- T3 : Tepung ikan + 1% (v/w) ekstrak daun kersen lama penyimpanan 4 minggu.

Prosedur penelitian ini meliputi tahap persiapan, tahap perlakuan dan tahap analisis.

Tahap Persiapan

Pembuatan tepung ikan rucah dan ekstrak daun kersen. Tahapan pembuatan tepung ikan rucah yaitu pengadaan ikan rucah, pengukusan selama 1 jam, penjemuran selama 3-4 hari, penggilingan dan penyaringan. Tahapan pembuatan serbuk

daun kersen yaitu pemetikan, pencucian dengan air mengalir, pengeringan udara, pengeringan menggunakan oven dengan suhu 60 °C selama 24 jam, penggilingan dan penyaringan. Pembuatan ekstrak daun kersen menggunakan metode ekstraksi sokletasi.

Tahap Perlakuan

Tepung ikan rucah dicampur dengan hasil ekstraksi (sokletasi) daun kersen konsentrasi 50% (1 : 1, ekstrak daun kersen : etanol 97%) dengan pencampuran ekstrak 100 ml per 1000 g berat tepung ikan rucah dengan perbandingan 1:10. Pengamatan dilakukan pada minggu ke-0, ke-2 dan ke-4 pada penyimpanan suhu ruang dan tidak dikemas.

Total Bakteri

Analisis jumlah bakteri dilakukan berdasarkan (Fardiaz, 1992) menggunakan metode *tuang/pour plate*. Pengujian jumlah bakteri dilakukan dengan menyiapkan 4 buah tabung reaksi steril dan memberi tanda 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} , kemudian menambahkan NaCl 0,85% steril sebanyak 9 ml. Menimbang tepung ikan sebanyak 1 g, kemudian dimasukkan dalam tabung 10^{-1} dan dihomogenkan.

Melakukan pengenceran sampai dengan tabung 10^{-4} dengan mengambil 1 ml dari tabung sebelumnya dan menambahkan pada tabung selanjutnya kemudian dihomogenkan. Menyiapkan 5 buah cawan petri dan memberi tanda label blanko dan pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , kemudian memasukkan 1 ml NaCl 0,85% pada blanko dan 1 ml dari pengenceran bahan pada cawan petri sesuai dengan tanda masing-masing. Menambahkan media NA (*Nutrient Agar*) sebanyak 20 ml, kemudian homogenisasi dan menunggu sampai agar memadat.

Menginkubasi pada inkubator pada suhu 37 °C selama 18 – 24 jam. Menghitung jumlah koloni yang tumbuh. Data yang dilaporkan berdasarkan perhitungan *Standar Plate Count* (SPC). Perhitungan jumlah koloni adalah sebagai berikut:

Jumlah Bakteri = Jumlah Koloni x Volume yang ditanam x Pengenceran

Bakteri Gram

Pengujian pewarnaan Gram +/- dilakukan dengan memanaskan ose untuk pengambilan sampel, kemudian meletakkan sampel pada kaca objektif. Meneteskan larutan kristal violet dan menunggu selama 1 menit, kemudian bilas dengan air mengalir posisi kaca objek miring 45°. Menuangkan larutan iodin dan menunggu selama 1 menit. Bilas dengan air kembali, kemudian meneteskan larutan alkohol selama 10-30 detik. Membilas dengan air, kemudian direndam dengan larutan safranin selama 10 – 30 detik. Mencuci dengan air dan keringkan, kemudian mengamati menggunakan mikroskop.

Escherichia coli dan *Salmonella sp.*

Pengujian identifikasi *Escherichia Coli* dan *Salmonella sp.* dilakukan dengan mengambil suspensi pengenceran 10^{-1} menggunakan ose secara aseptis, kemudian diinokulasikan pada media *MacConkey* dan diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 18 – 24 jam. Mengamati koloni yang terbentuk berwarna merah yang menunjukkan memfermentasikan laktosa, kemudian ditanam pada media biokimia yang memiliki karakteristik yang berbeda. Media uji biokimia meliputi: Indol, Motil, Glukosa, Laktosa, Maltosa, Manitol, Sakarosa, *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), Urea, *Voges Proskauer* (VP), *Methyl Red* (MR), *Simon Citrate* secara aseptis, kemudian diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 18 – 24 jam. Penambahan masing-masing 5 tetes reagen kovac untuk media Indol, apabila positif akan terbentuk cincin merah, reagen *naphthol* dan KOH *creatin* untuk media *Voges Proskauer* (VP) reagen *methyl red* untuk media *methyl red*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total Bakteri

Berdasarkan hasil penelitian pada (Tabel 1.) yang menunjukkan bahwa tepung ikan yang diberi ekstrak daun kersen pada berbagai lama penyimpanan berbeda terhadap total bakteri. Hasil rata-rata total bakteri T_1 ($3,08 \times 10^5$ cfu/g) berbeda ($P < 0,05$) lebih tinggi dari T_0 ($1,16 \times 10^4$ cfu/g) dan T_2 ($1,44 \times 10^4$ cfu/g), sedangkan untuk T_0 dan T_2 tidak berbeda.

Tabel 1. Hasil Total Bakteri, Bakteri Gram, Identifikasi *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.*

Parameter	T1	T2	T3
Total Bakteri (cfu/g)	$1,16 \times 10^4$	$3,08 \times 10^5$	$1,44 \times 10^4$
Bakteri Gram *	3,6	4	4
<i>Escherichia coli</i> **	Negatif	Negatif	Negatif
<i>Salmonella sp.</i> **	Negatif	Negatif	Negatif

Keterangan : * : nilai skor 1 – 4

** : secara kualitatif

Pertumbuhan bakteri tertinggi pada T_2 dan mengalami penurunan di minggu ke-4, diduga bakteri mengalami pertumbuhan fase log dan fase kematian. Fase log ditandai dengan jumlah bakteri yang meningkat dari T_0 ($1,16 \times 10^4$ cfu/g) ke T_1 ($3,08 \times 10^5$ cfu/g), sedangkan fase kematian ditandai dengan jumlah bakteri yang berkurang T_1 ($3,08 \times 10^5$ cfu/g) ke T_2 ($1,44 \times 10^4$ cfu/g). Menurut Buckle *et al.* (1985), bakteri mengalami pertumbuhan yang terbagi menjadi 4 fase yaitu fase lag, fase log, fase tetap dan fase kematian. Fase lag atau fase lambat merupakan fase bakteri menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru. Fase log merupakan fase pertumbuhan bakteri meningkat secara eksponensial. Fase tetap merupakan fase bakteri berhenti tumbuh dipengaruhi oleh nutrisi yang tersedia. Fase kematian merupakan bakteri mulai menurun

jumlahnya dan tidak dapat tumbuh kembali, kecuali pada media baru.

Kematian mikroba dapat disebabkan oleh beberapa hal diantaranya yaitu faktor nutrisi atau zat antibakteri. Ekstrak daun kersen mengandung senyawa bioaktif yaitu tannin, saponin dan flavonoid yang dapat digunakan sebagai antibakteri. Zakaria *et al.* (2006) melaporkan bahwa terdapat aktivitas antimikroba pada ekstrak daun kersen yaitu senyawa tanin, saponin dan flavonoid. Surjowardojo *et al.* (2014) menyatakan bahwa ekstrak daun kersen memiliki kadar flavonoid yang lebih banyak dibandingkan dengan tanin dan saponin, flavonoid, digunakan sebagai antimikroba dan antikanker. Konsentrasi antibakteri berpengaruh terhadap daya hambat bakteri. Konsentrasi ekstrak daun kersen yang digunakan yaitu 50% tergolong ke dalam konsentrasi kuat. Menurut Arum *et al.* (2012), semakin tinggi konsentrasi ekstrak memiliki daya hambat yang tinggi terhadap pertumbuhan mikroba. Prasetyanti *et al.* (2016) melaporkan bahwa konsentrasi 20% ekstrak daun kersen dapat digunakan sebagai *teat dipping* pada sapi perah karena menurunkan jumlah bakteri dan nilai CMT.

Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun kersen akan menghambat atau merusak pertumbuhan bakteri. Cushnie dan Lamb (2005) melaporkan bahwa flavonoid memiliki beberapa mekanisme untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau merusak diantaranya yaitu dengan menghambat sintesis asam nukleat, fungsi membran dan metabolisme energi. Hal ini diperkuat oleh pendapat Mahardika *et al.* (2014) flavonoid akan bekerja menghambat metabolisme energi, yang menyebabkan sel berhenti beraktivitas atau mati.

Bakteri Gram

Berdasarkan hasil penelitian pada (Tabel 1.) yang menunjukkan bahwa tepung ikan yang diberi ekstrak daun kersen pada berbagai lama penyimpanan tidak berbeda terhadap bakteri Gram +/- . Hasil rata-rata skor bakteri Gram +/- T_0 (3,6) T_1 (4) dan T_2 (4) tidak berbeda ($P < 0,05$). Perlakuan T_1

ditemukan bakteri Gram -, namun pada T₂ dan T₃ bakteri Gram negatif tidak ditemukan, hal ini diduga bakteri Gram negatif mati oleh flavonoid dari ekstrak daun kersen. Menurut Poeloengan dan Praptiwi (2010), flavonoid akan menghentikan kerja sel bakteri dengan mendenaturasi protein. Dinding sel yang terkena flavonoid kehilangan permeabilitas sel.

Bakteri Gram negatif memiliki ketebalan dinding yang tipis sehingga cairan mudah masuk. Pelczar dan Chan (1986) menyatakan bahwa bakteri Gram negatif memiliki dinding yang tipis dibandingkan dengan bakteri Gram positif. Lingga dan Rustama (2005) menyatakan bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang kurang rentan terhadap antimikroba, namun bakteri Gram negatif dapat mati dengan antimikroba yang memiliki konsentrasi yang pekat. Bahan pakan yang digunakan juga berbeda.

Escherichia coli

Berdasarkan hasil penelitian pada (Tabel 1.) Identifikasi *Escherichia coli* menunjukkan bahwa tepung ikan yang diberi ekstrak daun kersen pada berbagai lama penyimpanan tidak mengandung bakteri *Escherichia coli* secara keseluruhan, namun ditemukan 1 sampel positif bakteri *Escherichia coli*. Menurut Standar Nasional Indonesia (2009), bahan pangan dari ikan memiliki batas cemaran maksimum untuk bakteri *Escherichia coli* adalah < 3 g. Bahan pangan atau pakan tidak layak konsumsi apabila melebihi standar yang ditetapkan. Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri patogen yang menyebabkan penyakit pada saluran pencernaan. Suwito (2010) melaporkan bakteri *Escherichia coli* dapat menyebabkan infeksi pada saluran pencernaan yang biasa disebut dengan kolobasilosis pada unggas, sedangkan pada anak sapi dapat menyebabkan diare. Rahmawati *et al.* (2014) menyatakan penyebaran bakteri *Escherichia coli* dari pakan dan lingkungan yang kurang higienis.

Proses pembuatan tepung ikan mengalami penjemuran dan penggilingan. Penjemuran bertujuan untuk menurunkan

kadar air dari bahan. Kadar air yang rendah menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut Buckle *et al.* (1985), bakteri tumbuh pada aktivitas air 0,91, sedangkan jamur dan khamir lebih rendah.

Salmonella sp.

Berdasarkan hasil penelitian pada (Tabel 1.) identifikasi *Salmonella sp.* menunjukkan bahwa tepung ikan yang diberi ekstrak daun kersen pada berbagai lama penyimpanan (0, 2, 4 minggu) tidak mengandung bakteri *Salmonella sp.* Menurut Standar Nasional Indonesia (2009), batas cemaran maksimum bakteri *Salmonella sp.* pada bahan pangan atau pakan dari ikan yaitu negatif per 25g. Bahan pangan atau pakan tidak layak konsumsi apabila melebihi standar yang ditetapkan.

Menurut Afriyani *et al.* (2016), bakteri *Salmonella sp.* menyebabkan penyakit *pullorum* atau berak kapur pada unggas. Bakteri *Salmonella sp.* dapat menyebar melalui udara dan dapat menular dengan cepat. Ikawikanti *et al.* (2012) melaporkan penularan bakteri *Salmonella sp.* berasal dari kontak induk ke anak ayam dan kontak ayam sakit dengan ayam sehat, pakan dan air yang tercemar serta kotoran..

KESIMPULAN

Ekstrak daun kersen yang ditambahkan pada tepung ikan rucah mampu mengurangi jumlah total bakteri, menekan bakteri Gram negatif, *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* selama penyimpanan.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriyani, Darmawi, Fakhurrazi, Z.H. Manaf, M. Abrar dan Winaruddin. 2016. Isolasi bakteri *Salmonella sp.* pada feses anak ayam broiler di Pasar UleeKareng, Banda Aceh. *J. Medika Veterinaria* 1 (10) : 74 – 76.
- Ami, M. S. 2016. Kajian daya antibakteri etanol kulit batang dan buah kersen (*Muntingia calabura*) terhadap

- bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. Prosiding Seminar Biologi. Surabaya, 20 Februari. 2016. Universitas Negeri Surabaya. 162 – 166.
- Arum, Y.P., Supartono dan Sudarmin. 2012. Isolasi dan uji daya antimikroba ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura*). J.MIPA 35 (2) : 165 – 174.
- Buckle, K.A., R.A. Edward, G.H. Fleet dan M. Wotton. 1985. Ilmu Pangan. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Cushnie, T.P.T. dan A. J. Lamb. 2005. Antimicrobial activity of flavonoid. International Journal of Antimicrobial Agents 26 : 343 356.
- Fardiaz, S. 1993. Analisis Mikrobiologi Pangan. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Hidayatullah, F.N., I.F. Djunaidi dan M.H. Natsir. 2014. Pengaruh tingkat penggunaan tepung ikan rucah nila (*Oreochromis niloticus*) dalam pakan terhadap penampilan produksi ayam buras. Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang.
- Ikawikanti, A., M.C. Padaga dan D.A. Oktabiane. 2012. Isolasi dan karakterisasi *Salmonella spp.* pada lingkungan peternakan ayam broiler di Kota Malang. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya, Malang.
- Lingga, M.E., dan M.M. Rustama. 2005. Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak air dan etanol bawang putih (*Allium sativum L.*) terhadap bakteri Gram negatif dan Gram positif yang diisolasi dari udang dogol (*Metapenaeus monoceros*), udang lobster (*Panulirus sp.*) dan udang rebon (*Mysis dan Acetes*). Universitas Padjajaran, Sumedang.
- Mahardika, H. A., Sarwiyono dan P. Surjowardojo. 2014. Ekstrak metanol daun kersen (*Muntingia calabura L.*) sebagai antimikroba alami terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* penyebab mastitis subklinis pada sapi perah. J. Ternak Tropika 2 (4) : 15 – 22.
- Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan. 1986. Dasar - dasar Mikrobiologi. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Poeloengan, M. dan Praptiwi. 2010. Uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) Media Litbang Kesehatan 20 (2) : 65 – 69.
- Prasetyanti, D. R., C. Budiarti dan D.W. Harjanti. 2016. Efektifitas daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dalam menurunkan jumlah bakteri dalam susu dan peradangan pada ambing sapi perah. J. Ilmu-ilmu Peternakan 1 (19) : 10 – 16.
- Rahmawati, N. E. Sudjarwo dan E. Widodo. 2014. Uji aktivitas ekstrak herbal terhadap bakteri *Escherichia coli*. J. Ilmu-ilmu Peternakan. 8978 24 (3) : 24 – 31.
- Standarisasi Nasional Indonesia. 1996. Tentang Tepung Ikan/Bahan Baku Pakan No. 01-2715-1996. Dewan Standarisasi Nasional, Jakarta.
- Standarisasi Nasional Indonesia. 2009. Batas Maksimum Cemar Mikroba dalam Pangan. No. 7388-1996. Badan Standarisasi Nasional, Jakarta.
- Suparjo. 2010. Teknik Penyimpanan Pakan : Kerusakan Bahan Pakan Selama Penyimpanan. Fakultas Peternakan. Universitas Jambi, Jambi.
- Surjowardojo, P., Sarwiyono, I. Thohari dan A. Ridhowi. 2014. Quantitative and qualitative phytochemicals analysis of *Muntingia calabura*. J of Biology, Agriculture and Healthcare. 16 (4) : 84 – 88.

- Suwito, W. 2010. Monitoring *Salmonella sp.* dan *Escherichia Coli* dalam bahan pakan ternak. Buletin Peternakan 34 (3) : 165 – 168.
- Utomo, N. B. P., Susan dan M. Setiawati. 2013. Peran tepung ikan dari berbagai bahan baku terhadap pertumbuhan lele sangkuriang *Clarias sp.* J. Akuakultur Indonesia. 12 (2): 158 - 168.
- Zakaria, Z. A., C. A. Fatimah, A. M. Mat Jais, H. Zaiton, E.F.P Hernie, M.R. Sulaimam, M. N. Somchit, M. Thenamutha dan D. Kasthuri. 2006. The in vitro antibacterial activity of *Muntingia calabura* extract. International Journal of Pharmacology. 2 (4) : 439 – 442.