

**AKTIVITAS ANTI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*
EKSTRAK *Excoecaria agallocha***

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Oleh:

**JOKO TRIMULYONO
NIM. 0610830055**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2012

**AKTIVITAS ANTI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*
EKSTRAK *Excoecaria agallocha***

**SEBAGAI SALAH SATU SYARAT MEMPEROLEH GELAR SARJANA
PADA FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG**

Oleh:

**JOKO TRIMULYONO
NIM. 0610830055**

Dosen Penguji I

**Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS
NIP. 19640604 199002 2 002
Tanggal:**

Dosen Penguji II

**Ir. YAHYA, MP
NIP. 19630706 199003 1 003
Tanggal:**

**Menyetujui,
Dosen Pembimbing I**

**Ir. Darius, M. Biotech
NIP : 19500531 198103 1 003
Tanggal:**

Dosen Pembimbing II

**Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP
NIP : 19680919 200501 1 001
Tanggal:**

**Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP**

**(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal:**



PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 14 Februari 2012
Yang membuat pernyataan,

Joko Trimulyono
NIM 0610830055

RINGKASAN

JOKO TRIMULYONO, (0610830055). Aktivitas Anti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Ekstrak *Excoecaria agallocha* (Dibawah Bimbingan Ir. Darius, M.Biotech dan Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP)

Keracunan pangan merupakan penyebab kematian kedua terbesar setelah Infeksi Saluran Pernafasan Atas atau ISPA. *World Health Organization* (WHO) mendefinisikan kejadian luar biasa keracunan pangan atau dikenal dengan istilah "foodborne disease". *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen yang sering ditemukan pada kasus-kasus keracunan makanan. Antibiotik untuk penyakit keracunan makanan akibat bakteri patogen ialah antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen tersebut. Bahan antibakteri dapat disintesis dari bahan organik maupun anorganik. Antibakteri anorganik biasa disintesis dari bahan-bahan kimiawi, sedangkan antibakteri organik disintesis dari bahan alam atau tumbuhan, seperti mangrove.

Bagi masyarakat pesisir, ekstrak dan bahan mentah dari mangrove banyak dimanfaatkan untuk obat-obatan alamiah. Mangrove merupakan vegetasi pantai yang banyak sekali bermanfaat bagi kehidupan manusia, mulai ekologis sampai sumber pangan dan obat. Mangrove kaya metabolit sekunder yaitu alkaloid, terpenoid, saponin, alkana, alkohol rantai panjang, dan fitosterol. Salah satu metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri, yaitu terpenoid, juga terdapat dalam komposisi senyawa mangrove. *Excoecaria agallocha* telah digunakan secara tradisional untuk mengobati luka, dan borok. Uji klinis dilakukan pada tanaman ini menunjukkan potensi anti-HIV, antikanker, antibakteri dan antivirus. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung dalam *E. agallocha*, mendapatkan aktivitas antibakteri ekstrak *E. agallocha* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, dan mendapatkan senyawa yang paling kuat aktivitas anti *S. aureus* dan *E.coli* yang terkandung di dalam ekstrak *E. agallocha*.

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2010 - Februari 2011, di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang. Prosedur penelitian untuk aktivitas anti *S. aureus* dan *E. coli* dari *E. agallocha* secara umum terbagi 9 tahapan, yaitu persiapan bahan, uji fitokimia, ekstraksi, uji antibakteri dari ekstrak, fraksinasi, uji antibakteri dari fraksi, partisi, uji antibakteri dari partisi, dan identifikasi senyawa aktif dengan ultraviolet dan inframerah.

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode deskriptif merupakan metode penyelidikan yang menuturkan dan mengklasifikasikan data yang diperoleh dari berbagai teknik pengambilan data. Tujuannya adalah untuk memaparkan secara sistematis, faktual, dan akurat mengenai fakta serta sifat dari suatu populasi tertentu.

Hasil analisis uji fitokimia dapat diketahui bahwa *E. agallocha* mengandung senyawa metabolit sekunder antara lain alkaloid, tanin, saponin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, dan glikosida.

Hasil penelitian ini menunjukkan, bahwa bioaktif *E. agallocha* dapat digunakan sebagai anti *S. aureus* dan *E. coli*, terutama pada bagian kulit yang diekstraksi dengan metanol. Ini ditunjukkan dengan adanya zona hambat oleh ekstrak kulit *E. agallocha* dengan metanol pada *S. aureus* dan *E. coli*, yaitu rata-rata sebesar $14,63 \pm 5,10$ mm untuk zona hambat *S. aureus* dan $14,45 \pm 2,75$ mm untuk zona hambat *E. coli*.

Identifikasi dari senyawa bioaktif *E. agallocha* sebagai anti *S. aureus* dan *E. coli*, yaitu bersifat polar, karena sebagian besar senyawa bioaktif *E. agallocha* terlarut dalam metanol yang merupakan pelarut polar. Hasil identifikasi dengan spektrofotometer ultraviolet dan inframerah senyawa bioaktif ekstrak metanol kulit *E. agallocha* adalah triterpenoid. Hasil ini diperkuat dengan uji fitokimia, yang menunjukkan triterpenoid terdeteksi dalam senyawa - senyawa yang terkandung pada kulit *E. agallocha*. Hasil tersebut menunjukkan senyawa yang paling berpotensi sebagai antibakteri pada kulit *E. agallocha*, merupakan triterpenoid.



KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberi rahmat sehingga penulisan skripsi ini dapat diselesaikan. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa laporan ini tidak akan tersusun tanpa bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, rasa hormat dan terima kasih kami sampaikan kepada :

1. Ir. Darius, M.Biotech selaku dosen pembimbing I dan Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP selaku dosen pembimbing II, yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga laporan ini dapat tersusun.
2. Asep Awaluddin, S.Pi, MP yang mau bersedia membimbing saya dengan kesabaran, memberi pengarahan, dan memberikan banyak ilmu.
3. Tim mangrove (Budi, Mahfudin, dan Yusrina) yang selalu kompak semoga sukses bagi kalian.
4. Bapak dan Ibu atas limpahan kasih sayang, do'a, dukungan, serta materi yang diberikan.
5. Mas Hadi dan Mbak Atik yang sabar memberiku uang saku.
6. Semua Temen-temen teknologi hasil perikanan angkatan 2006 atas bantuan dan dorongan sehingga laporan ini dapat dapat terselesaikan dengan baik.

Semoga ALLAH SWT memberikan balasan yang lebih atas jasa dan kebaikan mereka.

Penulis menyadari bahwa dalam laporan ini masih terdapat banyak kekurangan, sehingga adanya kritik dan saran dari pembaca nantinya kami harapkan dapat menambah kesempurnaan laporan ini. Akhirnya, semoga dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan perikanan khususnya bagi penulis dan pembaca.

Malang, 15 Februari 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	i
PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Tempat dan Waktu	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Excoecaria agallocha</i>	5
2.2 Senyawa Bioaktif	7
2.3 Fitokimia	8
2.3.1 Flavonoid	8
2.3.2 Tanin	9
2.3.3 Terpenoid	10
2.3.4 Alkaloid.....	11
2.3.5 Fenolik.....	12
2.3.6 Glikosida.....	12
2.3.7 Steroid.....	13
2.3.8 Saponin	14
2.4 Isolasi.....	15
2.4.1 Ekstraksi Bioaktif	15
2.4.2 Fraksinasi	17
2.4.2.1 Kromatografi Kolom	18
2.4.2.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	19
2.4.3 Spektrofotometri	21
2.4.3.1 Spektrofotometer <i>Ultraviolet Visible</i> (UV-Vis).....	22
2.4.3.2 Spektrofotometer FT-IR	22
2.5 Pelarut.....	23
2.5.1 Metanol	24
2.5.2 Kloroform.....	25
2.5.3 Etil Asetat	26
2.5.4 Heksane	26
2.6 Bakteri	27
2.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	27
2.6.2 <i>Eschericia coli</i>	29
2.7 Mekanisme Kerja Antibakteri	30



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitan	33
3.1.1 Bahan Penelitian	33
3.1.2 Alat Penelitian	33
3.2 Metode Penelitian	34
3.3 Prosedur Penelitian	34
3.4 Skema Kerja Penelitian	36
3.4.1 Tahap 1	37
3.4.1.1 Persiapan Bahan	37
3.4.1.2 Perhitungan Rendemen	38
3.4.1.3 Uji Fitokimia	38
3.4.2 Tahap 2	39
3.4.2.1 Ekstraksi	39
3.4.2.2 Perhitungan Rendemen Ekstraksi	40
3.4.2.3 Pembuatan Media	40
3.4.2.4 Uji Aktifitas Ekstrak <i>Excoecaria agallocha</i>	41
3.4.3 Tahap 3	42
3.4.3.1 Metode Pemisahan / Partisi	42
3.4.3.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	43
3.4.3.3 Identifikasi Bioaktif <i>E. agallocha</i>	44
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Rendemen Pengeringan	47
4.2 Analisis Uji Fitokimia	48
4.3 Ekstraksi dan Uji Antibakteri dari <i>Excoecaria agallocha</i>	54
4.4 Aktivitas Anti <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i> Ekstrak <i>E. agallocha</i>	58
4.5 Fraksinasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi	64
4.5.1 Fraksi Polar Terhadap <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i>	64
4.5.2 Fraksi Non Polar Terhadap <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i>	66
4.6 Fraksinasi Kolom Kromatografi	68
4.7 Pemurnian Senyawa Bioaktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	70
4.8 Identifikasi senyawa Anti <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i> dari Ekstrak Kulit <i>E. agallocha</i>	71
4.8.1 Uji Spektrofotometer <i>Ultraviolet Visible</i> (UV-Vis)	71
4.8.2 Uji Spektrofotometer <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR) ...	73
4.9 Mekanisme Anti <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i> Terpenoid dari Ekstrak Kulit <i>E. Agallocha</i>	75
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	78
5.2 Saran	78
DAFTAR PUSTAKA	79
LAMPIRAN	88

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. <i>Excoecaria agallocha</i> (a. Tumbuhan Utuh, b. Daun, c. Batang, dan d. Akar)	6
2. Struktur Flavonoid.....	9
3. Struktur Tanin	10
4. Struktur Terpenoid	11
5. Struktur Alkaloid.....	11
6. Struktur Fenolik.....	12
7. Struktur Glikosida.....	13
8. Struktur Steroid	13
9. Struktur Saponin	14
10. Kromatografi Kolom	18
11. <i>Staphylococcus aureus</i>	27
12. <i>Escherichia coli</i>	29
13. Struktur Dinding Sel Bakteri Gram Positif	31
14. Struktur Dinding Sel Bakteri Gram Negatif.....	31
15. Warna Ekstrak dalam: (a) Metanol, (b) Kloroform, (c) Etil Asetat, dan (d) Heksan.....	54
16. Zona Hambat <i>S. aureus</i> Ekstrak Metanol Kulit <i>E. agallocha</i>	61
17. Zona Hambat <i>E. coli</i> Ekstrak Metanol Kulit <i>E. agallocha</i>	63
18. Zona Hambat Ekstrak Metanol Fraksi Polar Kulit.....	66
19. Zona Hambat Ekstrak Metanol Fraksi Non Polar Kulit	68
20. Kromatografi Kolom Ekstrak Metanol Kulit <i>E. agallocha</i> Fraksi Polar.....	69
21. Sub Fraksi Metanol : Akuades (7:3) Ekstrak Kulit <i>E. agallocha</i>	69
22. Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Kulit <i>E. agallocha</i>	70
23. Spektra Uv- Vis Senyawa Bioaktif Ekstrak Kulit <i>E. agallocha</i>	71
24. Spektra Inframerah Senyawa Bioaktif Ekstrak Kulit <i>E. agallocha</i>	73

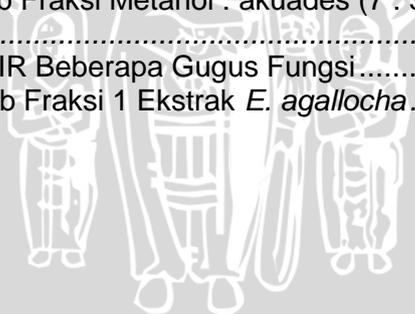
DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Jenis-jenis Pelarut untuk Ekstraksi Komponen Aktif.....	24
2. Indeks Polaritas Pelarut.....	24
3. Sifat-Sifat Metanol.....	25
4. Rendemen Pengeringan berbagai bagian <i>E. agallocha</i>	47
5. Fitokimia Berbagai Bagian <i>E. agallocha</i>	49
6. Warna dan Rendemen Ekstrak <i>E. agallocha</i> dalam Berbagai Pelarut.....	55
7. Zona Hambat <i>S. aureus</i> dari Berbagai Bagian <i>E. agallocha</i> , Pelarut, dan Konsentrasi.....	59
8. Zona Hambat <i>E. coli</i> dari Berbagai Bagian <i>E. agallocha</i> , Pelarut, dan Konsentrasi.....	62
9. Zona Hambat Fraksi Polar <i>E. agallocha</i> terhadap <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i>	65
10. Zona Hambat Fraksi Non Polar <i>E. agallocha</i> Terhadap <i>S. aureus</i> dan <i>E. Coli</i>	67



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Data Pengeringan Berbagai Bagian <i>E. agallocha</i>	88
2. Rendemen Pengeringan Berbagai Bagian <i>E. agallocha</i>	89
3. Warna Ekstrak <i>E. agallocha</i> dalam Berbagai Pelarut.....	90
4. Berat Ekstrak Berbagai Bagian <i>E. agallocha</i> (Rendemen Ekstrak 1).....	91
5. Berat Ekstrak Berbagai Bagian <i>E. agallocha</i> (Rendemen Ekstrak 2).....	92
6. Berat Ekstrak Berbagai Bagian <i>E. agallocha</i> (Rendemen Ekstrak 3).....	93
7. Rendemen Ekstrak <i>E. agallocha</i> dalam Berbagai Pelarut.....	94
8. Rata- Rata Rendemen Ekstrak <i>E. agallocha</i> dalam Berbagai Pelarut.....	94
9. Skema Uji Cakram Metode Kirby-Bauer	95
10. Pengenceran Bahan Uji.....	96
11. Zona Hambat <i>S. aureus</i> dari Berbagai Bagian <i>E. agallocha</i> Konsentrasi Ekstrak, dan Pelarut.....	97
12. Zona Hambat <i>E. coli</i> dari Berbagai Bagian <i>E. agallocha</i> Konsentrasi Ekstrak, dan Pelarut.....	98
13. Zona Hambat <i>E. coli</i> Ekstrak Metanol, Kloroform, Etil asetat, dan Heksan <i>E. agallocha</i>	99
14. Zona Hambat <i>S. aureus</i> Ekstrak Metanol, Kloroform, Etil asetat, Dan Heksan <i>E. agallocha</i>	100
15. Data Zona Hambat Ektrak Kulit <i>E. agallocha</i> Fraksi Non Polar.....	101
16. Data Zona Hambat Ektrak Kulit <i>E. agallocha</i> Fraksi Polar	101
17. Data Zona Hambat Sub Fraksi Metanol : akuades (7 : 3) Ekstrak Kulit <i>E. agallocha</i>	102
18. Data Korelasi Spektra IR Beberapa Gugus Fungsi.....	103
19. Spektra Inframerah Sub Fraksi 1 Ekstrak <i>E. agallocha</i>	104



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keracunan pangan merupakan penyebab kematian kedua terbesar setelah Infeksi Saluran Pernafasan Atas atau ISPA. *World Health Organization* (WHO) mendefinisikan kejadian luar biasa keracunan pangan atau dikenal dengan istilah “*foodborne disease*” sebagai suatu kejadian dimana terdapat dua orang atau lebih yang menderita sakit setelah mengkonsumsi pangan yang secara epidemiologi terbukti sebagai sumber penularan (WHO,2005).

Bahan makanan merupakan sumber gizi bagi manusia dan sumber makanan bagi mikroorganisme. Pertumbuhan mikroorganisme dalam bahan pangan dapat mengakibatkan perubahan fisik atau kimia yang tidak diinginkan, sehingga bahan pangan tersebut tidak layak dikonsumsi. Mikroba pembusuk dapat menyebabkan pembusukan bahan pangan (Siagian, 2002).

Mikroba pembusuk merupakan mikroba yang dapat menguraikan bahan sehingga menjadi busuk. Mikroba patogen adalah mikroba yang dapat menimbulkan penyakit pada manusia. *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dapat menghasilkan racun yang akan membahayakan kesehatan manusia. Kedua jenis bakteri berada di tempat-tempat persiapan bahan pangan melalui bahan baku, tangan, permukaan alat-alat, tempat-tempat masakan dan peralatan masak lainnya kemudian masuk ke makanan yang telah dimasak (Buckle, *et al.*, 2007). Dalam bahan pangan kedua bakteri tersebut sangat berbahaya sehingga perlu dikaji penggunaan antibakteri yang baik untuk membunuh atau menghambat bakteri tersebut.

Bahan antimikroba adalah komponen alam semisintesis atau sintesis yang mengganggu metabolisme dan menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroba. Bahan antimikroba dapat berupa senyawa kimia sintesis yang berasal

dari tumbuh-tumbuhan ataupun bahan-bahan kimiawi lainnya (Pelczar dan Chan, 1988).

Antibiotik yang paling sering digunakan sebagai agen antimikroba memberikan efek samping antara lain alergi, toksisitas, hingga terjadinya resistensi pada penggunaan jangka panjang (Yunita *et al.*, 2009). Maka diperlukan alternatif antimikroba yang lebih aman dan ekonomis.

Salah satu alternatif yang menjanjikan, baik dari segi keamanan maupun ekonomi, adalah penggunaan bahan alam mengingat Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia, dengan keanekaragaman hayatinya nomor dua di dunia (Litbang-Deptan, 2009).

Mangrove merupakan vegetasi pantai yang banyak sekali bermanfaat yang bersinggungan langsung dengan kehidupan manusia, mulai ekologis sampai sumber pangan dan obat. Mangrove mengandung metabolit sekunder yaitu alkaloid, terpenoid, saponin, alkana, alkhohol rantai panjang, dan fitosterol (Basyuni, 2008 dan Agoramoorthy, 2008). Senyawa tersebut digunakan sebagai obat anticacing, antimikroba, antivirus, antijamur, antikanker, antitumor, antidiare, antioksidan, dan racun ikan. Salah satu spesies mangrove yang memiliki sifat antimikroba adalah *Excoecaria agallocha*.

Excoecaria agallocha telah digunakan secara tradisional untuk mengobati luka, dan borok. Uji klinis dilakukan pada tanaman ini menunjukkan potensi anti-HIV, antikanker, antibakteri dan antivirus. Penyelidikan fitokimia sebelumnya pada spesies ini mengungkapkan adanya diterpenoid, triterpenoid, flavonoid, dan forbol ester (Varahalarao *et al.*, 2009).

1.2 Rumusan Masalah

Excoecaria agallocha adalah salah satu spesies mangrove yang mengandung bioaktif. Bioaktif yang dihasilkan oleh mangrove telah banyak diketahui manfaatnya antara lain adalah anti-HIV, antikanker, antibakteri, dan antivirus (Varahalarao *et al.*, 2009). Studi sebelumnya ditemukan informasi tentang kandungan bioaktif *E. agallocha* dan belum diketahui data-data mengenai pemanfaatan bioaktif mangrove *E. agallocha* sebagai antibakteri *S. aureus* dan *E. coli*, sehingga pemanfaatannya masih memerlukan kajian yang meliputi :

1. Senyawa apa saja yang terkandung pada bagian daun, akar, batang, kulit, dan bunga *E. agallocha* ?
2. Apakah bioaktif mangrove *E. agallocha* dapat sebagai anti *S. aureus* dan *E. coli* ?
3. Senyawa bioaktif *E. agallocha* apa yang paling kuat aktivitas anti *S. aureus* dan *E.coli* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mendapatkan senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung dalam *E. agallocha*.
2. Mendapatkan aktivitas antibakteri ekstrak *E. agallocha* terhadap *S. aureus* dan *E. coli*.
3. Mendapatkan struktur senyawa yang paling kuat aktivitas anti *S. aureus* dan *E.coli* yang terkandung di dalam ekstrak *E. agallocha*.

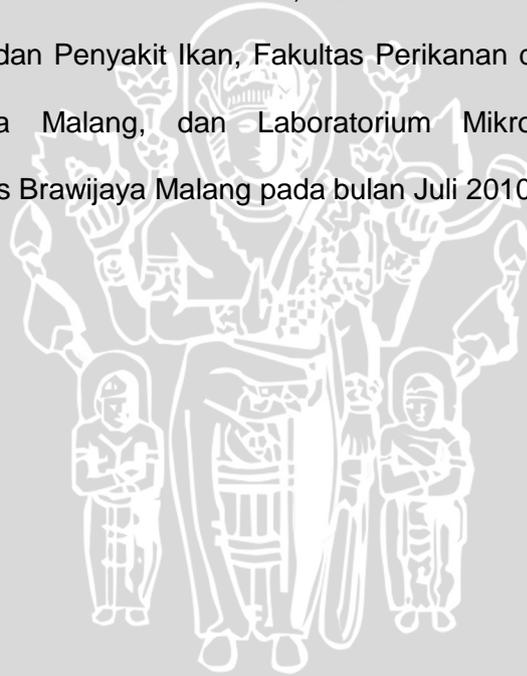
1.4 Kegunaan

Hasil dari penelitian ini diharapkan :

1. Memberikan informasi kepada masyarakat, lembaga, dan institusi lain mengenai manfaat bioaktif yang ada pada *E. agallocha*.
2. Masyarakat dapat memanfaatkan *E. agallocha* sebagai alternatif antibakteri alami.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Dasar, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juli 2010- Februari 2011.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Excoecaria agallocha*

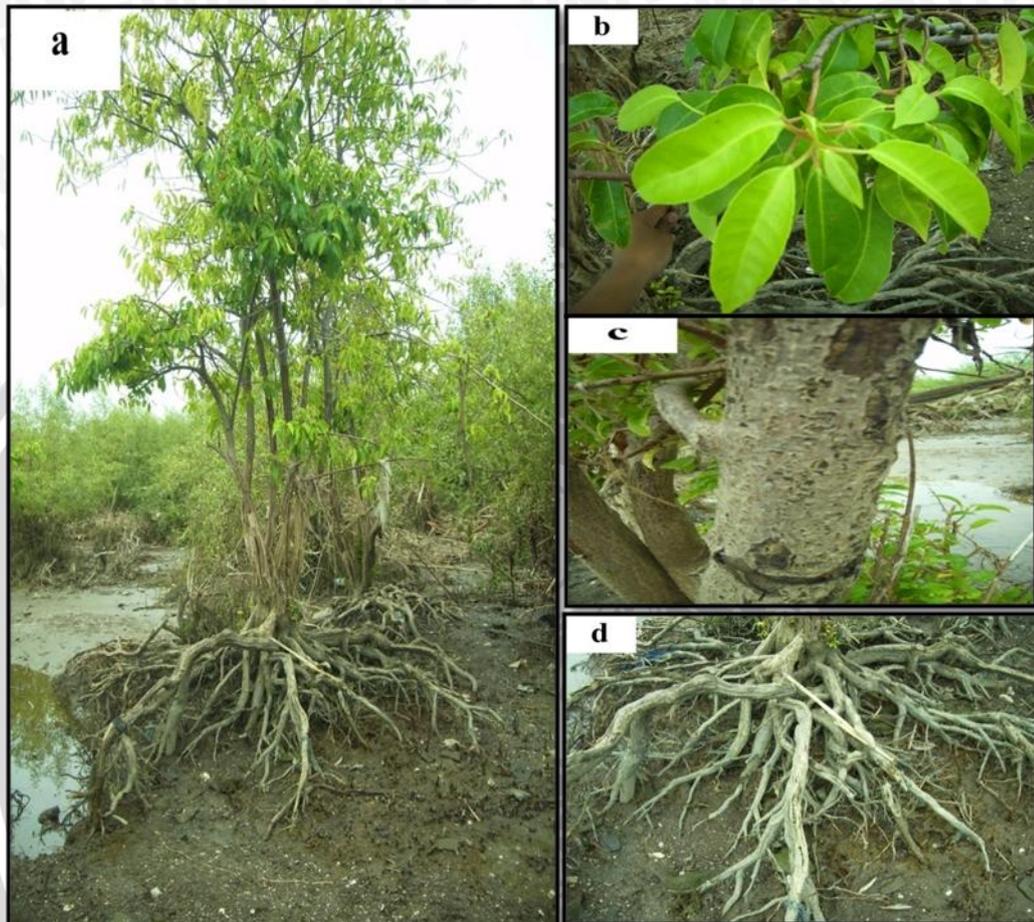
Tumbuhan mangrove di Indonesia merupakan paling banyak di dunia, baik dari segi kuantitas area ($\pm 42.550 \text{ km}^2$) maupun jumlah spesies (± 45 spesies). Mangrove mempunyai banyak sekali manfaat yang bersinggungan langsung dengan kehidupan manusia di daratan, mulai dari manfaat ekologi sampai dengan sebagai sumber pangan dan obat. Spesies *Excoecaria agallocha* banyak ditemukan diperairan Asia (Purnobasuki, 2004).

Excoecaria agallocha tersebar di sepanjang pantai India selatan dan Sri Lanka sampai Burma (Myanmar), Indo-Cina, Cina, Taiwan, Kepulauan Ryukyu, Thailand, seluruh Malaysia termasuk Indonesia, kemudian ke Australia utara dan Pasifik. Menurut Rao (1998), Klasifikasi *E. agallocha* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malpighiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: <i>Excoecaria</i>
Spesies	: <i>Excoecaria agallocha</i>

E. agallocha memiliki nama lokal buta-buta, madengan, menengan, kalibuda, kayu buta-buta, betuh, bebutah, dan warejit. Tinggi *E. agallocha* mencapai 15 m. Bentuk akar tanpa pneumatophora. Susunan daun sederhana dan bersilangan, berbentuk elip dan memiliki ujung yang runcing dengan ukuran daun 6 - 9 cm. *E. agallocha* tidak memiliki biji. Buah berdiameter 0,7 cm, bercuping 3, berwarna hijau, dan berbuah pada bulan Januari hingga Maret. *E. agallocha* memiliki getah lateks pada batang berwarna putih yang mengandung

racun dan berbahaya jika terkena mata dan kulit. *E. agallocha* tumbuh di tepi hutan mangrove, ke arah daratan pada tanah pasir atau berlumpur (Setyawan *et al.*, 2002). *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Excoecaria agallocha* a. Tumbuhan Utuh, b. Daun, c. Batang, dan d. Akar

E. agallocha digunakan sebagai wangi-wangian, obat kudis, kejang perut, dan borok pada kaki. Getah dipergunakan sebagai racun ikan. Dalam dosis kecil dipakai sebagai obat kuat laki-laki (afrodisiaka). *E. agallocha* memiliki kandungan kimia antara lain : 2,4 - dimetoksi - 3 (Y, Y - diometil alil sinnaoil), *Piperidide Pulcherol* , *Excocarianin* , *Excocarinin A*, *Excocarinin B*.

2.2 Senyawa Bioaktif

Produk bioaktif alami adalah senyawa-senyawa kimia yang diproduksi oleh organisme hidup yang memiliki efek biologi terhadap organisme lain. Dalam beberapa kasus, produk bioaktif alami ini adalah produk sekunder yang diproduksi oleh organisme tetapi memiliki aktivitas yang tidak berhubungan dengan sistem biologi (Colgate dan Molyneux, 2008).

Identifikasi dan pengelompokan mangrove dapat dilihat dari keberagaman metabolit, struktur kimia dan perbedaan kelas kimianya. Senyawa kimia yang biasa ditemukan dalam mangrove, antara lain asam dan alkohol alifatik, asam amino dan alkaloids, karbohidrat, karotenoid, hidrokarbon, asam lemak bebas termasuk *polyunsaturated fatty acid* (PUFA), lipid, feromon, forbol ester, fenolik, dan kandungan yang berhubungan, steroid, triterpenoid, dan glikosida, tanin, terpen dan yang berhubungan, dan sejenisnya (Bandaranayake, 2002).

Mangrove merupakan salah satu biota penyusun ekosistem pesisir pantai yang berfungsi sebagai tempat berlindung larva ikan dan biota lain dan juga penahan ombak, dan lain-lain. Berdasarkan hasil penelitian pada tanaman mangrove disebutkan bahwa, selain mengandung tanin sebagai metabolit sekunder utama, juga mengandung steroid, triterpen, saponin, flavonoid, dan alkaloid (Agoramoorthy, *et al.*, 2007). Senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan tersebar merata ke seluruh bagian tumbuhan tetapi dalam kadar yang berbeda-beda.

Mangrove mengandung senyawa seperti alkaloid, flavonoid, fenol, terpenoid, steroid dan saponin. Golongan senyawa ini merupakan bahan obat-obatan modern (Eryanti, *et al.*, 1999). Ditambahkan Effendi (1998), dari kajian awal yang telah dilakukan, diketahui bahwa beberapa spesies mangrove memiliki efek antimikrobia.

2.3 Fitokimia

Fitokimia secara umum diartikan sebagai kandungan kimia atau nutrisi dalam tumbuhan. Biasanya fitokimia digunakan untuk merujuk pada senyawa tumbuhan yang tidak dibutuhkan untuk fungsi normal tubuh, tapi memiliki efek yang menguntungkan bagi kesehatan atau memiliki peran aktif bagi pencegahan penyakit. Senyawa fitokimia tidak termasuk ke dalam zat gizi karena bukan berupa karbohidrat, protein, lemak, vitamin, mineral maupun air. Menurut Harborne (2006), kandungan kimia tumbuhan dapat digolongkan berdasarkan asal biosintesis, sifat kelarutan dan adanya gugus fungsi tertentu.

Senyawa fitokimia memberikan aroma khas, rasa dan warna tertentu bagi tanaman dalam berintegrasi dengan lingkungan. Fitokimia mempunyai pengaruh biologis sebagai antioksidan yang berpengaruh untuk menghambat pertumbuhan kanker, mempunyai sifat menghambat pertumbuhan bakteri, menurunkan kolesterol, menurunkan kadar glukosa darah, bersifat antibiotik, dan menimbulkan pengaruh peningkatan kekebalan tubuh. Fitokimia yang telah diketahui adalah sekitar 30.000 jenis dan sebanyak 5.000-10.000 jenis terdapat dalam bahan pangan serta hampir 400.000 jenis tanaman mengandung fitokimia (Andriana, 2009).

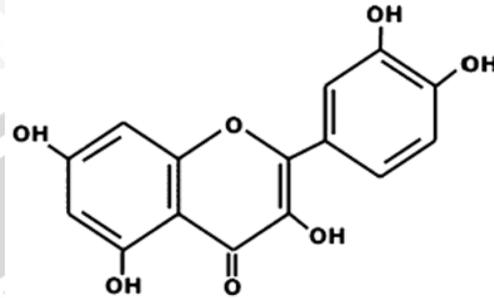
Fitokimia yang merupakan hasil metabolit sekunder tumbuhan digolongkan, menjadi alkaloid, antrakuinon, kumarin, minyak esensial (sebagian terpenoid dan fenilpropanoid), flavonoid, steroid, dan terpenoid (Channel, 1998).

2.3.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan sekelompok senyawa yang memiliki struktur dasar flavon atau flavan (Lemmens dan Wulijarni, 1991). Salah satu turunan flavonoid yaitu katekin, ditemukan pada apel, anggur, pear dan teh. Secara *invitro* mampu menghambat *Vibrio cholera*, *Streptococcus* dan *Shigella*. Sifat antibakteri

flavonoid disebabkan karena kemampuannya membentuk kompleks dengan dinding sel bakteri, serta protein ekstraseluler (Cowan, 1999). Flavonoid memiliki rumus kimia $C_{15}H_{10}O_2$ dengan berat molekul 222,24 g/mol (Metacyc, 2011).

Struktur flavonoid dapat dilihat pada Gambar 2.



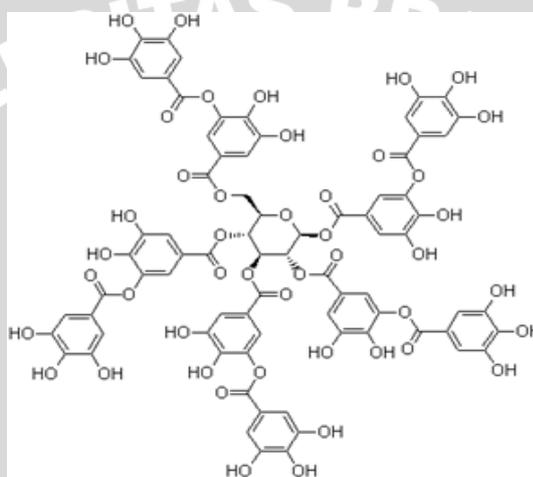
Gambar 2. Struktur Flavonoid (Pract, 2006)

Senyawa yang begitu mencolok seperti flavonoid memberikan kontribusi keindahan dan kesemarakkan pada bunga dan buah-buahan di alam. Flavin memberikan warna kuning atau jingga, antosianin memberikan warna merah, ungu atau biru, yaitu semua warna yang terdapat pada pelangi kecuali warna hijau. Secara biologis, flavonoid memainkan peranan penting dalam kaitan penyerbukan pada tanaman oleh serangga. Sejumlah flavonoid memiliki rasa pahit hingga dapat bersifat menolak sejenis ulat tertentu. Flavonoid adalah senyawa yang mengandung C_{15} terdiri atas dua inti fenolat yang dihubungkan dengan tiga satuan karbon. Cincin A memiliki karakteristik bentuk hidroksilasi phloroglusinol atau resorsinol, dan cincin B biasanya 4, 3, 4 atau 3, 4, 5-terhidroksilasi (Sastrohamidjojo, 2007).

2.3.2 Tanin

Tanin merupakan fenol polihidrid kompleks, bersifat larut dalam air (Lemmens dan Wulijarni, 1991). Ada dua jenis tanin yaitu tanin hidrolisis, dan tanin kondusi, yang mana keduanya memiliki daya antibakteri. tanin hidrolisis adalah tanin yang dapat dihidrolisi dengan asam, alkali atau enzim menjadi

senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti gula dan asam tanat (asam galat dan asam elaganat). Galotanin adalah contoh tanin hidrolisis, yang mana molekulnya tersusun dari asam galat dan gula, sedangkan elagitanin adalah tanin hidrolisis yang molekulnya tersusun dari asam elagat dan gula (Hagerman 2002). Menurut Nangude (2007), rumus kimia tanin adalah $C_{76}H_{52}O_{46}$ dan memiliki berat molekul sangat besar yaitu 1700 g/mol. Struktur tanin dapat dilihat pada Gambar 3.



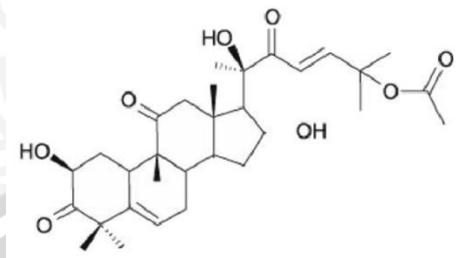
Gambar 3. Struktur Tanin (Nangude, 2007)

Menurut Cowan (1999), tanin dapat membentuk kompleks dengan protein transmembran, enzim-enzim pada permukaan membran, dan protein pili (adhesin), melalui ikatan hidrogen sehingga dapat mengganggu kehidupan bakteri. Ikatan hidrogen antara tanin dan protein terjadi melalui interaksi antara gugus hidroksil pada tanin dengan gugus karbonil pada protein.

2.3.3 Terpenoid

Terpena merupakan senyawa hidrokarbon yang mempunyai struktur umum $C_{10}H_{16}$, dan terdapat dalam bentuk diterpena, triterpena, tetraterpena serta sesquiterpena, berturut-turut dengan C_{20} , C_{30} , C_{40} , C_{5} , dan C_{15} . Terpena yang mengandung elemen lain (biasanya oksigen) disebut terpenoid (Cowan, 1999).

Terpena dan terpenoid mempunyai daya antimikroba terhadap bakteri, kapang, virus, dan protozoa (Hill, 1993). Terpenoid memiliki berat molekul sebesar 464,6 g/mol (Cruz, 2007). Struktur terpenoid dapat dilihat pada Gambar 4.

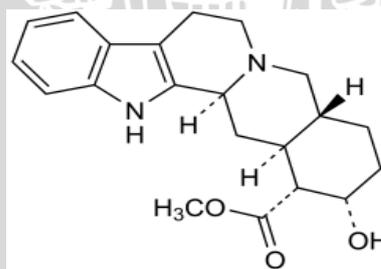


Gambar 4. Struktur Terpenoid (Thoennissen *et al.*, 2009)

Terpenoid mempunyai daya antimikroba terhadap bakteri, kapang, virus dan protozoa. Mekanisme penghambatannya diduga melalui perusakan lipibilayer membran sel akibat gugus hidrofobik yang dimilikinya (Cowan, 1999).

2.3.4 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa organik yang memiliki cincin heterosiklik dengan atom nitrogen yang bersifat basa. Alkaloid memiliki struktur kimia $C_{21}H_{20}N_2O_3 \cdot HNO_3$ dan berat molekulnya sebesar 411,41 g/mol (Druglead, 2009). Struktur alkaloid dapat dilihat pada Gambar 5.

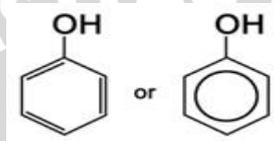


Gambar 5. Struktur Alkaloid (Dinda, 2008)

Beberapa alkaloid memiliki kemampuan menghambat mikroba dan mekanismenya diduga karena dapat menyebabkan kerusakan DNA (Cowan, 1999).

2.3.5 Fenolik

Menurut Cowan (1999), tumbuh-tumbuhan dapat mensintesa berbagai jenis fenolik melalui metabolisme sekunder yang ditujukan sebagai mekanisme pertahanan terhadap serangan mikroba, insekta, maupun herbivora. Asam fenolat merupakan fenolik yang memiliki gugus karboksilat. Salah satu turunan asam fenolat yaitu asam kafeat, yang dilaporkan memiliki daya hambat terhadap bakteri, kapang, dan virus (Brantner, *et al.*, 1996). Struktur fenolik dapat dilihat pada Gambar 6.



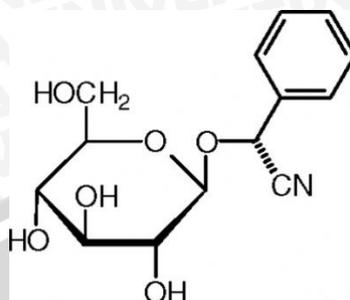
Gambar 6. Struktur Fenolik (Freeman dan Gwyn, 2008)

Menurut Cowan (1999), sifat daya hambat fenolik terhadap mikroba disebabkan karena gugus hidroksil yang dimilikinya dapat berinteraksi dengan protein membran sel mikroba melalui ikatan hidrogen, sehingga protein tersebut kehilangan fungsinya. Gugus hidroksil dapat menjadi donor hidrogen yang baik untuk membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karbonil pada protein (Lemmens dan Wulijarni, 1991). Protein bersama fosfolipid merupakan senyawa penting yang menyusun membran sel mikroba, yang sama protein disini berfungsi sebagai pengatur keluar masuknya material dari dan ke dalam sel (Black, 2005).

2.3.6 Glikosida

Glikosida adalah senyawa yang menghasilkan satu atau lebih gula (glikon) diantara produk hidrolisisnya dan sisanya berupa senyawa bukan gula (aglikon). Bila gula yang terbentuk glukosa maka golongan senyawa tersebut disebut glukosida, sedangkan bila terbentuk gula lainnya disebut glikosida. Di alam ada O-glikosida, C-glikosida, N-glikosida dan S-glikosida (Mustakim, 2008).

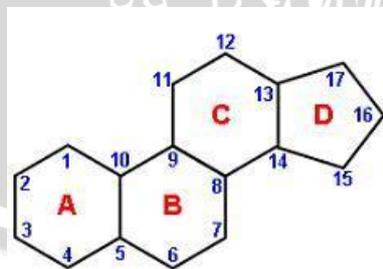
Rumus glikosida adalah $C_{14}H_{28}O_6$ dan berat molekul sebesar 292,37 g/mol (Wikipedia, 2010). Struktur glikosida dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur Glikosida (Coffey, 2011)

2.3.7 Steroid

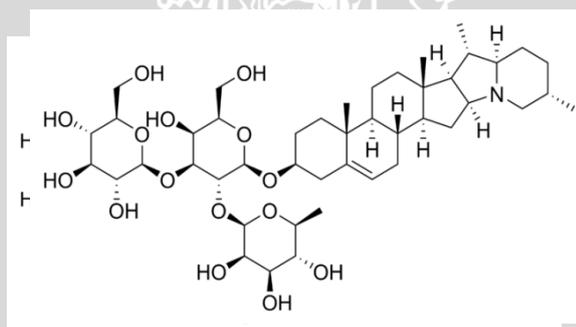
Steroid adalah triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Dahulu sering digunakan sebagai hormon kelamin dan asam empedu. Tetapi pada tahun-tahun terakhir ini makin banyak steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan. Tiga senyawa yang biasa disebut fitosterol terdapat pada hampir setiap tumbuhan tinggi yaitu: sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol (Harborne, 1987). Rumus kimia steroid adalah $C_{17}H_{19}N_5$ dan berat molekul sebesar 293,366 g/mol (Druglead, 2009). Struktur steroid dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Struktur Steroid (Zulfikar, 2010)

2.3.8 Saponin

Saponin adalah jenis glikosida yang banyak ditemukan dalam tumbuhan. Saponin memiliki karakteristik dapat membentuk buih, sehingga ketika direaksikan dengan air dan dikocok maka akan terbentuk buih yang dapat bertahan lama. Saponin mudah larut dalam air dan tidak larut dalam eter. Saponin memiliki rasa pahit menusuk dan menyebabkan bersin serta iritasi pada selaput lendir. Saponin merupakan racun yang dapat menghancurkan butir darah atau hemolisis pada darah. Saponin bersifat racun bagi hewan berdarah dingin dan banyak diantaranya digunakan sebagai racun ikan (Hartono, 2009). Rumus saponin adalah $C_{27}H_{42}O_3$ (Chemical, 2010). Struktur saponin dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Struktur Saponin (Wikipedia, 2011)

Saponin diklasifikasikan menjadi 2 yaitu: saponin steroid dan saponin triterpenoid. Saponin steroid tersusun atas inti steroid (C_{27}) dengan molekul karbohidrat. Steroid saponin dihidrolisis menghasilkan suatu aglikon yang dikenal sebagai saraponin. Tipe saponin ini memiliki efek anti jamur. Pada binatang menunjukkan penghambatan aktifitas otot polos. Saponin steroid diekskresikan setelah konjugasi dengan asam glukoronida dan digunakan sebagai bahan baku pada proses biosintesis dari obat kortikosteroid.

2.4 Isolasi

Isolasi adalah usaha untuk memisahkan senyawa yang bercampur sehingga didapat senyawa tunggal yang murni. Dalam hal ini faktor yang paling utama yang harus dipertimbangkan sebelum merancang sebuah prosedur isolasi adalah sifat alami senyawa target yang terdapat dalam suatu ekstrak atau fraksi. Gambaran sifat umum molekul yang akan diisolasi sangat membantu dalam proses isolasi meliputi kelarutan (hidrofobisitas dan hidrofilisitas), sifat asam basa, stabilitas, dan ukuran molekul. Jika mengisolasi suatu senyawa yang sudah diketahui atau dari sumber yang baru, dapat dicari informasi dari literatur mengenai sifat kromatografi dari senyawa target tersebut, sehingga mudah untuk menentukan metode isolasi yang sesuai. Penentuan prosedur isolasi untuk ekstrak dengan kandungan senyawa yang belum sama sekali diketahui tipe senyawanya dapat menimbulkan kesulitan. Oleh karena itu disarankan, untuk dilakukan uji kualitatif untuk mengetahui tipe senyawa seperti: fenolik, steroid, alkaloid, flavonoid, dan sebagainya (Sa'ad, 2009).

2.4.1 Ekstraksi Bioaktif

Ekstraksi diartikan sebagai proses pemisahan zat dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Berdasarkan bentuk campurannya yang diekstrak, ekstraksi dibedakan menjadi dua macam yaitu ekstraksi padat-cair : campuran yang diekstrak berbentuk padat, dan ekstraksi cair-cair: cairan yang diekstrak berbentuk cair. Ekstraksi bentuk padat cair paling sering digunakan untuk mengisolasi zat yang terkandung dalam bahan alami. Sifat-sifat seperti kepolaran dan kelarutan bahan alami yang diisolasi berperan penting terhadap sempurnanya proses ekstraksi (Vogel, 1987).

Proses ekstraksi dibedakan menjadi dua fase, yaitu fase pencucian dan fase ekstraksi. Pada fase pencucian terjadi penyatuan cairan ekstraksi, melalui

rusaknya sel-sel zat yang diekstrak atau rusak akibat proses operasi penghalusan, langsung kontak dengan bahan pelarut. Diharapkan komponen sel yang terdapat dalam sel mudah diambil atau dicuci. Sedangkan yang dimaksud dengan fase ekstraksi, peristiwanya lebih kompleks, yaitu suatu peristiwa yang memungkinkan terjadinya pelintasan bahan pelarut ke dalam bagian dalam sel. Dengan mengalirnya bahan pelarut kedalam sel menyebabkan protoplasma membengkak, dan bahan kandungan sel akan terlarut sesuai dengan kelarutannya. Zat tersebut berpindah sejauh mereka terlarut molekular, mengikuti difusi melalui ruang antar miselar (Voigt, 1995).

Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat, daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna (Ansel, 1989). Metode-metode ekstraksi yang sering digunakan diantaranya :

✓ Maserasi

Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Bahan simplisia yang dihaluskan sesuai dengan syarat farmakop (umumnya terpotong-potong atau berupa serbuk kasar) disatukan dengan bahan pengekstraksi. Selanjutnya rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna) dan dikocok kembali. Waktu lamanya maserasi berbeda-beda antara 4 -10 hari. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi absolut. Semakin besar perbandingan cairan pengekstraksi terhadap simplisia, akan semakin banyak hasil yang diperoleh (Voigt, 1995).

✓ Perkolasi

Perkolasi dilakukan dalam wadah berbentuk silindris atau kerucut (perkolator), yang memiliki jalan masuk dan keluar yang sesuai. Bahan

pengekstraksi yang dialirkan secara terus-menerus dari atas, akan mengalir turun secara lambat melintasi simplisia yang umumnya berupa serbuk kasar. Melalui penyegaran bahan pelarut secara terus-menerus, akan terjadi proses maserasi bertahap banyak. Jika pada maserasi sederhana, tidak terjadi ekstraksi yang sempurna, karena akan terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan dalam sel dengan cairan disekelilingnya, maka pada perkolasi melalui suplai bahan pelarut segar, perbedaan konsentrasi tadi selalu dipertahankan. Dengan demikian ekstraksi total secara teoritis dimungkinkan (praktis jumlah bahan yang dapat diekstraksi mencapai 95%) (Voigt, 1995).

✓ *Sokletasi*

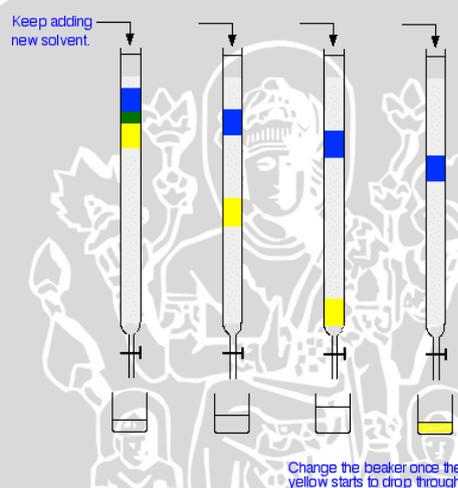
Sokletasi dilakukan dalam sebuah alat yang disebut soxhlet. Pelarut diisikan pada labu, sampel diisikan pada tabung dari kertas saring, atau tabung yang berlubang-lubang dari gelas, baja tahan karat, atau bahan lain yang cocok. Pelarut dipanaskan hingga mendidih. Uap pelarut naik ke atas melalui pipa samping, kemudian diembunkan kembali oleh pendingin tegak. Cairan turun ke labu melalui tabung yang berisi sampel. Pelarut sambil turun melarutkan zat aktif. Karena adanya sifon maka setelah cairan mencapai permukaan sifon, seluruh cairan akan kembali ke labu.

2.4.2 Fraksinasi

Menurut Yuliasih, *et al.* (2010), fraksinasi adalah proses pemisahan fraksi yang terkandung dalam suatu larutan suspensi yang mempunyai karakteristik berbeda. Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dengan kandungan yang lain. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar dan senyawa non polar akan masuk ke pelarut non polar (Harborne, 1987).

2.4.2.1 Kromatografi Kolom

Pemisahan komponen secara kromatografi kolom dilakukan dalam suatu kolom yang diisi dengan fase diam dengan eluen sebagai fase gerak untuk mengetahui banyaknya komponen contoh yang keluar melalui kolom. Pengisian kolom dilakukan dengan memasukan fase diam dalam bentuk larutan (*slurry*), dan partikelnya dibiarkan mengendap. Pemisahan komponen secara kromatografi kolom bertujuan untuk mengetahui komponen-komponen senyawa kimia yang dapat terpisah (Hayani, 2007). Kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Kromatografi Kolom (Chemistry, 2007)

Kecepatan bergerak dari suatu komponen tergantung pada berapa besarnya komponen terhambat atau tertahan oleh penyerap di dalam kolom. Jadi suatu senyawa yang diserap lemah akan bergerak lebih cepat daripada yang diserap kuat. Akan terlihat bahwa jika perbedaan-perbedaan dalam serapan cukup besar maka akan terjadi pemisahan yang sempurna (Sastrohamidjojo, 2001).

Partisi atau pemisahan kandungan senyawa bioaktif mangrove dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom. Kromatografi kolom merupakan metode untuk pemisahan campuran. Menurut Sastrohamidjojo (2007), prinsip

kerja kromatografi kolom ialah kolom pemisah diisi dengan penyerap zat padat seperti alumina (fasa tetap) dan dialiri dengan pelarut seperti benzena (fasa bergerak).

Pemisahan komponen suatu campuran tergantung pada tingkat kepolaran dari fase gerak dan senyawa yang terkandung dalam campuran tersebut (Sa'ad, 2009). Kecepatan bergerak dari suatu komponen tergantung pada berapa besarnya komponen terhambat atau tertahan oleh penyerap di dalam kolom. Jadi suatu senyawa yang diserap lemah akan bergerak lebih cepat daripada yang diserap kuat. Akan terlihat bahwa jika perbedaan-perbedaan dalam serapan cukup besar maka akan terjadi pemisahan yang sempurna (Sastrohamidjojo, 2001).

2.4.2.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis adalah cara pemisahan yang berdasarkan partisi cuplikan antara fasa bergerak dan fasa diam dengan membutuhkan penyerap dan cuplikan dalam jumlah yang sedikit dan noda-noda yang terpisahkan dilokalisasi pada plat seperti pada lembaran kertas.

Salah satu metode pemisahan yang sederhana adalah kromatografi lapis tipis (KLT). KLT dapat dipakai dengan dua tujuan. Pertama, dipakai sebagai metode untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif, ataupun preparatif. Kedua, dipakai untuk menjajaki sistem pelarut dan sistem penyangga yang akan dipakai pada kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Gritter, 1991).

Mekanisme pemisahan dengan kromatografi kertas prinsipnya sama dengan kromatografi kolom. Adsorben dalam kromatografi kertas adalah kertas saring, yakni selulosa. Sampel yang akan di analisis ditotolkan ke ujung kertas yang kemudian digantungkan dalam wadah. Kemudian dasar kertas saring

dicelupkan kedalam pelarut yang mengisi dasar wadah. Fase mobil (pelarut) dapat saja beragam. Kromatografi kertas dua dimensi (2D) menggunakan kertas yang luas bukan lembaran kecil, dan sampel di proses secara dua dimensi dengan dua pelarut (Mangatas, 2010).

Dalam kromatografi kertas satu tetes larutan cuplikan yang mengandung campuran yang akan dipisahkan ditetaskan atau diletakkan pada daerah yang diberi tanda di atas sepotong kertas saring diaman ia akan meluas membentuk noda yang bulat. Bila noda telah kering kertas dimasukkan dalam bejana yang tertutup yang sesuai dengan satu ujung, dimana tetesan cuplikan ditempatkan, tercelup dalam pelarut yang dipilih sebagai fase bergerak (Sastrohamidjojo, 2007).

Analisis dari KLT dapat membantu menentukan pelarut terbaik apa yang akan dipakai dan berapa perbandingan antar pelarut yang akan digunakan sebagai fase gerak pada kromatografi kolom. Menurut Widodo (2007), KLT sangat berhubungan dengan kromatografi kolom, hal ini karena fasa-fasa senyawa yang digunakan dalam teknik keduanya sama. Alumina dan silika gel adalah fasa diam yang biasa digunakan, dan fase geraknya menggunakan eluen yang sama. Walaupun demikian, tetap terdapat perbedaan antara KLT dan kromatografi kolom. Fase gerak (cair) di dalam kromatografi kolom bergerak turun, sedangkan dalam KLT bergerak naik.

KLT mempunyai beberapa keuntungan, diantaranya waktu yang dibutuhkan tidak lama (2-5 menit) dari sampel yang digunakan hanya sedikit sekali (2-20 μg). Kerugiannya dengan menggunakan KLT adalah tidak efektif untuk skala industri. Walaupun lembaran KLT yang digunakan lebih lebar dan tebal, pemisahannya sering dibatasi hanya sampai beberapa miligram sampel saja (Mayo, 2000).

Cara pemisahan dengan KLT, yaitu larutan cuplikan atau sampel ditotolkan pada plat dengan pipet mikro atau injektor pada jarak 1-2 cm dari batas plat. Setelah kering plat siap untuk dikembangkan dengan fase gerak sampai pada batas tertentu. Proses pengembangan dikerjakan dalam wadah tertutup yang diisi eluen dan telah dijenuhi uap eluen agar dihasilkan pemisahan yang baik. Selanjutnya dapat diamati langsung untuk noda/bercak yang tampak, atau diamati dengan lampu ultraviolet maupun pereaksi semprot penimbul warna untuk noda/bercak yang tidak tampak (Anwar, 1994).

2.4.3 Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah ilmu yang mempelajari tentang penggunaan spektrofotometer. Spektrofotometer adalah alat yang terdiri dari spektrofotometer dan fotometer. Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan, atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu, dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi (Setiawati, 2007).

2.4.3.1 Spektrofotometer *Ultraviolet Visible* (UV-Vis)

Spektrofotometer UV-Vis adalah anggota teknik analisis spektroskopik yang memakai sumber REM (radiasi elektromagnetik) ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380 nm - 780 nm) dengan instrumen spektrofotometer. Absorpsi cahaya ultraviolet mengakibatkan transisi elektronik, yaitu promosi elektron-elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi lebih tinggi. Energi yang terserap kemudian terbangun sebagai cahaya atau tersalurkan dalam reaksi kimia. Absorpsi cahaya tampak dan radiasi ultraviolet meningkatkan energi elektronik sebuah molekul, artinya

energi yang disumbangkan oleh proton-proton memungkinkan elektron-elektron itu mengatasi kekangan inti dan pindah keluar orbital baru yang lebih tinggi energinya. Semua molekul dapat menyerap radiasi dalam daerah ultraviolet karena mereka mengandung elektron, baik berkelompok maupun sendiri, yang dapat dieksitasi ke energi yang lebih tinggi (Setiawati, 2007).

Pengujian spektrofotometer ini digunakan untuk mengetahui panjang gelombang dan absorbansi sampel yang diamati, kemudian hasilnya digunakan untuk menganalisa karakteristik bioaktif ekstrak mangrove. Di dalam analisa kuantitatif dengan metode spektrofotometri, panjang gelombang sinar yang digunakan harus dipilih terlebih dahulu, agar komponen yang dianalisa menyerap sinar tersebut semaksimal mungkin. Jika bahan yang dianalisa mempunyai warna tertentu, maka warna komplementernya merupakan bagian panjang gelombang yang sesuai untuk analisa tersebut (Apriyantono, *et al.*, 1989).

2.4.3.2 Spektrofotometer FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*)

Spektrofotometri infra red atau inframerah adalah merupakan suatu metode yang mengamati interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada daerah panjang gelombang 0,75 – 1000 mikrometer atau pada panjang gelombang bilangan $13.000-10\text{ cm}^{-1}$ dengan menggunakan suatu alat yaitu spektrofotometer inframerah. Spektrum peresapan inframerah merupakan perubahan simultan dari energi vibrasi dan energi rotasi dari suatu molekul. Kebanyakan molekul organik cukup besar sehingga spektrum peresapannya kompleks. Konsep dasar dari spektra vibrasi dapat diterangkan dengan menggunakan molekul sederhana yang terdiri dari dua atom dengan ikatan kovalen. Dengan menggunakan hukum Hooke, dua atom tersebut dihubungkan dengan sebuah pegas. Persamaan yang diturunkan dari Hukum Hooke

menyatakan hubungan antara frekuensi, massa atom, dan tetapan kuatnya ikatan (Setiawati, 2007).

Uji spektrofotometer inframerah dilakukan untuk mengetahui gugus fungsional dari bioaktif ekstrak mangrove. Spektrofotometer inframerah merupakan merupakan spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan *transformasi Fourier* untuk mendeteksi dan analisis hasil spektrumnya. Spektrum inframerah dihasilkan dari pentransmisi cahaya yang melewati sampel. Spektra inframerah yang diperoleh, kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}). Analisis gugus fungsi sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorbansi yang terbentuk pada spektrum inframerah menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding yang sudah diketahui (Anam, *et al.*, 2007).

Menurut Sastrohamidjojo (2001), daerah pada spektrum inframerah di atas 1500 cm^{-1} menunjukkan pita spektrum atau gugus-gugus fungsi dalam molekul kimia. Sedangkan daerah dibawah 1500 cm^{-1} menunjukkan daerah sidik jari.

2.5 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan dalam proses ekstraksi. Menurut Vogel (1987), pelarut yang baik dalam proses ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan yang kuat bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar dan bagi senyawa nonpolar larut dalam pelarut nonpolar. Jenis-jenis pelarut yang sering digunakan untuk mengekstrak berbagai jenis senyawa antimikroba dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis-jenis Pelarut untuk Ekstraksi Komponen Aktif

Air	Etanol	Metanol	Kloroform	Dikloro Metanol	Eter	Aseton
Antosianin	Tanin	Antosianin	Terpenoid	Terpenoid	Alkaloid	Flavonol
Pati	Polipenol	Terpenoid	Flavonoid		Terpenoid	
Tanin	Poliasetilen	Saponin			Coumarin	
Saponin	Flavonol	Tanin			Asam lemak	
Terpenoid	Terpenoid	Xanthosillin				
Polipeptida	Sterol	Totarol				
Lectin	Alkaloid	Quassinoid				
	Propolis	Lakton				
		Flavon				
		Phenone				
		Polifenol				

Sumber : Cowan (1999)

Menurut Watson (2010), pelarut-pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi memiliki indeks polaritas yang berbeda. Semakin polar suatu pelarut atau campuran pelarut, semakin jauh pelarut tersebut akan menggerakkan senyawa polar. Indeks polaritas pelarut dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Indeks Polaritas Pelarut

Pelarut	Indeks Polaritas
Heksan (C ₆ H ₁₄)	0
Toluen (C ₇ H ₈)	2,4
Dietileter (C ₄ H ₁₀ O)	2,8
Diklorometan (CH ₂ Cl ₂)	3,1
Butanol (C ₄ H ₉ OH)	3,9
Kloroform (CHCl ₃)	4,1
Etil Asetat (C ₂ H ₅ COOCH ₃)	4,4
Aseton (CH ₃ COCH ₃)	5,1
Metanol (CH ₃ OH)	5,1
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	5,2
Asetonitril (CH ₃ CN)	5,8
Asam Asetat (CH ₃ COOH)	6,2
Air (H ₂ O)	9,0

Sumber : Watson (2010)

2.5.1 Metanol

Metanol juga disebut *metal alcohol*, *wood alcohol* atau spiritus senyawa kimia dengan rumus kimia CH₃OH. Metanol ini merupakan bentuk alkohol yang paling sederhana. Pada keadaan atmosfer, metanol ini berbentuk cairan ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan berbau khas. Metanol ini

biasa digunakan sebagai pendingin antibeku, pelarut, bahan bakar, dan sebagai bahan aditif bagi metanol industri (Basri, 1996). Menurut Komara (1991), metanol diproduksi secara alamiah dengan metabolisme anaerobik oleh bakteri. Hasil proses tersebut adalah uap metanol (dalam jumlah kecil) di udara. Setelah beberapa hari, uap metanol tersebut akan teroksidasi oleh oksigen dengan bantuan sinar matahari menjadi karbon dioksida dan air. Metanol kadang juga disebut *wood alcohol* karena dahulu merupakan produk samping dari destilasi kayu. Sifat-sifat metanol dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Sifat-sifat Metanol

Karakteristik	Metanol
Nama lain	Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat, alkohol kayu dan karbinol
Rumus molekul	CH ₃ OH
Sifat	Mudah terbakar, tidak berwarna
Titik leleh	-97 °C
Titik didih	64.7 °C
Massa molar	32.04 g/mol
Densitas	0,7918 g/cm ³ , cair
Titik nyala	11 °C
Konstanta dielektrik	33

Sumber : Wikipedia (2009)

2.5.2 Kloroform

Kloroform adalah nama umum untuk triklorometana (CHCl₃). Kloroform dikenal karena sering digunakan sebagai bahan pembius, meskipun kebanyakan digunakan sebagai pelarut non polar di laboratorium atau industri. Wujudnya pada suhu ruang berupa cairan, namun mudah menguap. Kloroform mampu menyerap kuat pada panjang gelombang 200 nm - 260 nm, sangat cocok untuk mengukur spektrum pigmen tumbuhan, seperti karotenoid, di daerah spektrum tampak. Kloroform biasa digunakan untuk memisahkan lipid dan terpenoid (Harborne, 1987). Menurut Fatmawati (2009), kloroform disebut juga haloform disebabkan karena brom dan klor juga bereaksi dengan metal keton, yang menghasilkan masing-masing bromoform (CHBr₃) dan Kloroform (CHCl₃). Hal ini

disebut CHX_3 atau haloform. maka reaksi ini sering disebut reaksi haloform. Penggunaan CHCl_3 untuk pelarut lemak, *dry cleaning* dan obat bius.

2.5.3 Etil Asetat

Etil asetat adalah cairan tidak berwarna, transparan, berbau harum, segar, seperti aseton, rasa aneh, dan membakar. Dapat bercampur dengan eter, alkohol, minyak lemak, dan atsiri (Wilson dan Gisvold, 1982). Menurut Harborne (1987) etil asetat merupakan pelarut semi polar dan dapat melarutkan senyawa seperti flavonoid.

2.5.4 Heksan

Pelarut yang terbaik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi. Hal ini berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diambil. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut kedalam pelarut non polar (Vogel, 1987). Heksan merupakan pelarut organik bersifat non polar. Pelarut heksan banyak digunakan untuk ekstraksi senyawa polar (Channel, 1998). Heksan memiliki rumus molekul C_6H_{14} , berat jenis 0.6548 g/mL dalam keadaan cair, daya larut dalam air 13 mg/L at 20°C , titik didih 69°C (342 K), dan titik beku -95°C (178 K).

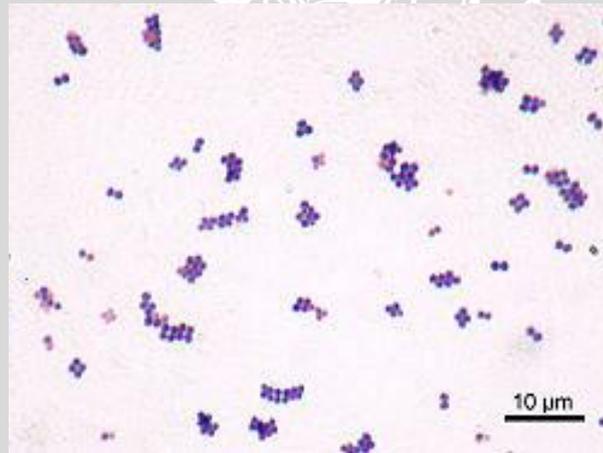
Pada industri, heksan biasa digunakan sebagai formula lem sepatu, produk kulit, dan atap. Selain itu, heksan juga digunakan untuk mengekstrak minyak tumbuhan. Menurut Widiyoko (2010), heksan tidak hanya mengestrak minyak tetapi juga terdapat senyawa lain yang terikut di antaranya fenolat, aldehid, klorofil, riboflavin, dan keton.

2.6 Bakteri

2.6.1 *Staphylococcus aureus*

Menurut Rachdie (2005), klasifikasi *Staphylococcus aureus* sebagai berikut :

Divisio	: Protophyta
Subdivisi	: Schizomycetea
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Micrococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>



Gambar 11. *Staphylococcus aureus*
(<http://www.google.co.id/imglanding?q=staphylococcus+aureus>)

S. aureus adalah bakteri aerob dan anaerob, fakultatif yang mampu menfermentasikan manitol dan menghasilkan enzim koagulase, hialurodinase, fosfatase, protease dan lipase. *Staphylococcus aureus* mengandung lisostaphin yang dapat menyebabkan lisisnya sel darah merah. Toksin yang dibentuk oleh *S. aureus* adalah haemolisin alfa, beta, gamma, delta, dan epsilon. Toksin lain ialah leukosidin, enterotoksin, dan eksfoliatin (Belqis, 2008).

S. aureus hidup sebagai saprofit di dalam saluran-saluran pengeluaran lendir dari tubuh manusia dan hewan-hewan seperti hidung, mulut dan tenggorokan dan dapat dikeluarkan pada waktu batuk atau bersin. Bakteri ini juga sering terdapat pada pori-pori dan permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus. Selain dapat menyebabkan intoksikasi, *S. aureus* juga dapat menyebabkan bermacam-macam infeksi seperti jerawat, bisul, meningitis, osteomielitis, pneumonia, dan mastitis pada manusia dan hewan (Belqis, 2008).

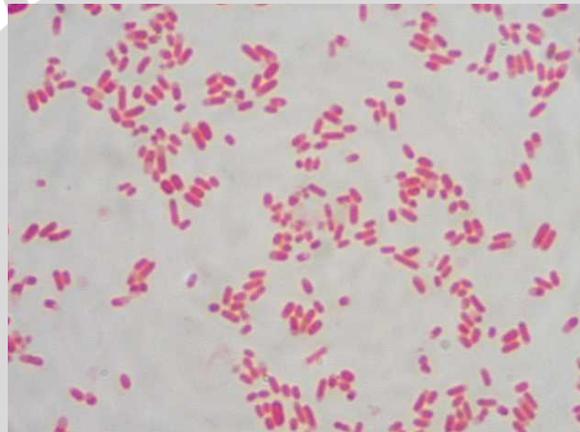
Foodborne Disease merupakan penyakit yang disebabkan kontaminasi bahan pangan oleh mikroorganisme patogen. *Foodborne Disease* dapat dikelompokkan menjadi 2 yaitu: keracunan makanan (*food poisoning*) dan Infeksi Makanan (*food infectio*). Keracunan makanan (*food poisoning*) itu sendiri dapat disebabkan oleh memakan makanan yang mengandung toksin dimana sel mikroorganisme yang ada dalam makanan tersebut belum tentu masih hidup, sedangkan infeksi makanan (*food infectio*) timbul akibat memakan makanan yang mengandung mikroorganisme patogen. *S. aureus* yang merupakan jenis mikroorganisme patogen oportunistik yang banyak ditemukan pada kulit dan saluran pernapasan manusia, serta jenis mikroorganisme ini dapat menimbulkan keracunan makanan (Asyhari, 2011).

S. aureus mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik. Antigen ini merupakan kompleks peptidoglikan asam teikhoat yang dapat menghambat fagositosis dan bagian ini yang diserang bakteriofaga. *S. aureus* bersifat lisogenik, yaitu mengandung faga yang tidak berpengaruh pada dirinya sendiri, tetapi menyebabkan lisis pada anggota dari spesies sama (Warsa, 1994).

2.6.2 *Escherichia coli*

Menurut Rachdie (2005), klasifikasi *E. coli* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Procaryota
Divisio	: Gracilicutes
Class	: Scotobacteria
Ordo	: Eubacteriales
Family	: Entobacteriaceae
Genus	: Escherichia
Species	: <i>Escherichia coli</i>



Gambar 12. *Escherichia coli*
(<http://www.google.co.id/imglanding?q=escherichia+coli&um>)

E. coli memproduksi lebih banyak asam didalam medium glukosa. Bakteri ini memproduksi CO₂ dan H₂ dengan perbandingan 1:1 dan tidak dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Sebaliknya *Enterobacter aerogenes* memproduksi asam lebih sedikit daripada aseton, tetapi tidak membentuk indol. Bakteri ini memproduksi CO₂ dan H₂ dengan perbandingan 1:2 dan dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon (Fardiaz, 1992).

Escherichia coli merupakan bekteri yang berasal dari kotoran hewan maupun manusia. *E. coli* termasuk dalam golongan bakteri koliform fekal yang digunakan sebagai indikator adanya polusi kotoran dan sanitasi yang tidak baik

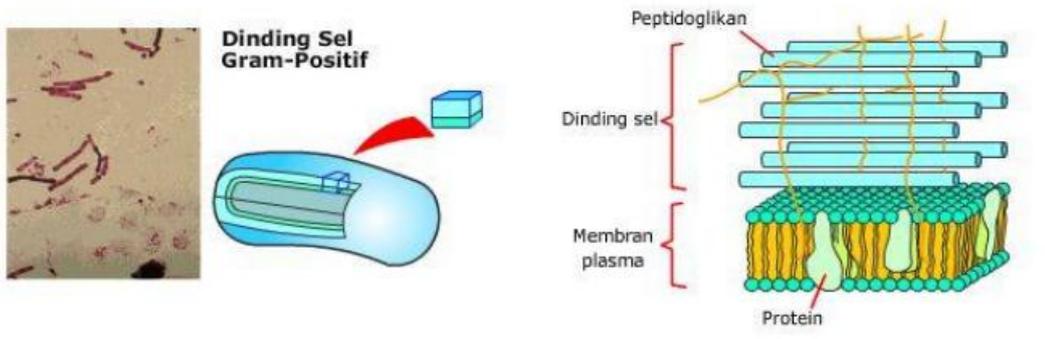
terhadap bahan pangan. *E. coli* adalah bakteri gram negatif, bersifat fakultatif anaerobik dan tidak berspora. Selnya memiliki panjang 2 μm dan diameter 0,5 μm dengan volume sel 0,6 – 0,7 μm^3 (Kubitschek, 1990).

2.7 Mekanisme Kerja Antibakteri

Struktur sel *Staphylococcus aureus* adalah gram positif yang sangat sensitif terhadap antimikroba yang mempunyai target menghambat sintesis dinding sel. Pada gram positif dinding selnya tebal dan homogen (10 nm - 80nm), komposisi kimianya terdiri dari peptidoglikan, asam teikoat, dan polisakarida. Penghambatan pertumbuhan bakteri melalui mekanisme penghambatan sintesis dinding sel melibatkan gangguan pada sintesis peptidoglikan. Padahal peptidoglikan merupakan komponen utama dinding sel bakteri gram positif. Peptidoglikan merupakan molekul besar yang disusun oleh senyawa gula dan asam amino. Dua gula penyusunnya adalah *N-acetyl glucosamin* (NAG) dan *N-Acetylmuramic Acid* (NAM). Lapisan peptidoglikan tunggal saling berikatan dengan lapisan lainnya melalui bagian rantai asam aminonya, sehingga membentuk suatu ikatan silang yang kuat menutupi seluruh sel (Kurnia, 2010).

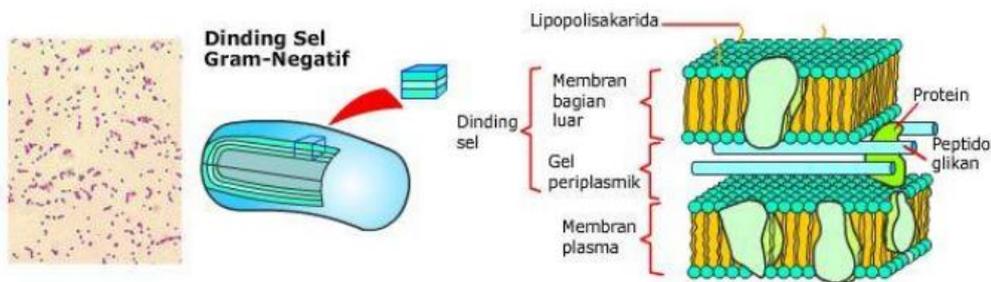
Masuknya antibakteri ke dalam sel dapat melalui beberapa cara antara lain melalui asam teikoat yang hanya ditemui pada dinding sel dan membran dinding sel dan membran sel dari gram positif, asam teikoat diketahui mempunyai muatan negatif sehingga dapat membatasi macam substansi yang akan diikat dan diteruskan dalam sel. Selain itu dapat melalui adsorpsi yang mempengaruhi permeabilitas dan porositas dinding sel yang menyebabkan terganggunya sintesis peptidoglikan sehingga pembentukan sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding selnya hanya meliputi membran sel. Keadaan ini menyebabkan sel bakteri mudah mengalami lisis, baik berupa fisik maupun osmotik dan menyebabkan kematian sel (Kurnia, 2010).

Bakteri gram positif cenderung lebih sensitif terhadap komponen antibakteri. Hal ini disebabkan oleh struktur dinding sel bakteri gram positif lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk masuk kedalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja (Kusmiati dan Agustini, 2006). Susunan struktur dinding sel bakteri gram positif dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Struktur Dinding Sel Bakteri Gram Positif (Padli, 2010)

Struktur sel *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif lebih banyak mengandung lipid, sedikit peptidoglikan, membran luar berupa bilayer (berfungsi sebagai pertahanan selektif senyawa-senyawa yang keluar atau masuk sel dan menyebabkan efek toksik). Membran luar terdiri dari fosfolipid (lapisan dalam), dan lipopolisakarida (lapisan luar) tersusun atas lipid A, yang berifat nonpolar (Dewi, 2010). Susunan struktur dinding sel bakteri gram negatif dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Struktur Dinding Sel Bakteri Gram Negatif (Padli, 2010)

Menurut Fadhillah (2010), perbedaan struktur dinding sel bakteri gram positif dan bakteri gram negatif, pada bakteri gram positif 90% dinding selnya terdiri lapisan peptidoglikan, sedangkan bakteri gram negatif lapisan peptidoglikan hanya sekitar 5 % - 20%. Senyawa antibakteri dapat mencegah sintesis peptidoglikan pada sel yang sedang tumbuh, maka bakteri gram positif umumnya lebih peka dibandingkan bakteri gram negatif. Fenol dapat bereaksi dengan komponen fosfolipid dari membran luar sel sehingga menyebabkan terjadinya perubahan permeabilitas membran dan akan mengakibatkan sel mengalami kebocoran. Perubahan permeabilitas membran akan menyebabkan keluarnya metabolit seluler selain protein, asam nukleat dan ion-ion logam (Ca^{2+} , K^+ , dan Mg^{2+}), dan perubahan morfologi.

Menurut Buck (2001), menyatakan dalam penelitiannya bahwa awal-awal terjadinya interaksi mekanisme antimikroba pada bakteri gram negatif umumnya senyawa antimikroba akan dihambat oleh membran luar berupa lipopolisakarida. Kemudian terjadi akumulasi yang kemudian mengganggu ikatan-ikatan hidrofilik membran luar. Secara selektif sebagian senyawa anti mikroba dengan ukuran molekul kecil masuk melalui protein porin hingga menuju sitoplasma.

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan adalah mangrove *Excoecaria agallocha* yang diperoleh dari muara sungai Porong, di daerah Sidoarjo, Jawa Timur, dan biakan murni bakteri *Escherichia coli* O-157 dan *Staphylococcus aureus* 2212-P dengan kepadatan 10^6 koloni/mL yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : metanol pro analisis (MeOH), kloroform pro analisis (CHCl_3), etil asetat pro analisis ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), dan heksan pro analisis (C_6H_{14}) yang digunakan sebagai pelarut. Bahan yang digunakan untuk media adalah MHA (*Mueller Hinton Agar*). Bahan pembantu yang digunakan adalah akuades, kertas saring, tisu, kertas label, kertas cakram (*Paper disk*) dengan diameter 5,25 mm, alumunium foil, kapas, *cotton swab*, DMSO (Dimetil sulfoksida), streptomisin, Na-fis 0,9%, koran, tali, pasir, dan silika gel 60 F₂₅₄.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Erlenmeyer 250 mL, spatula, termometer, cawan petri, *waterbath*, corong, *beaker glass* 100 mL, gelas ukur 100 mL, blender, timbangan analitik, dan botol vial. Peralatan yang digunakan untuk uji antibakteri antara lain : tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, pipet volume 10 mL, pipet serologis 1 mL, mikro pipet, jarum ose, bunsen, autoklaf, *beaker glass* 100 mL, *beaker glass* 50 mL, erlenmeyer 250 mL, *bottle sprayer*, panci, kompor, *incase*, statif, mikrobiuret, makrobiuret, gelas ukur 100 mL, spatula, botol vial 3 mL, kolom kromatografi 50 cm

erlenmeyer 100 mL, *beaker glass* 50 mL, timbangan analitik, spatula, statif, corong, dan pipet tetes. Alat yang digunakan untuk identifikasi pola spektra dengan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601, dan FTIR.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada pelaksanaan skripsi ini adalah metode eksploratif dan deskriptif. Metode penelitian ini bersifat eksplorasi, karena bertujuan untuk memberikan gagasan, wawasan, serta pemahaman sekaligus pemecahan masalah atas permasalahan yang dihadapi oleh peneliti.

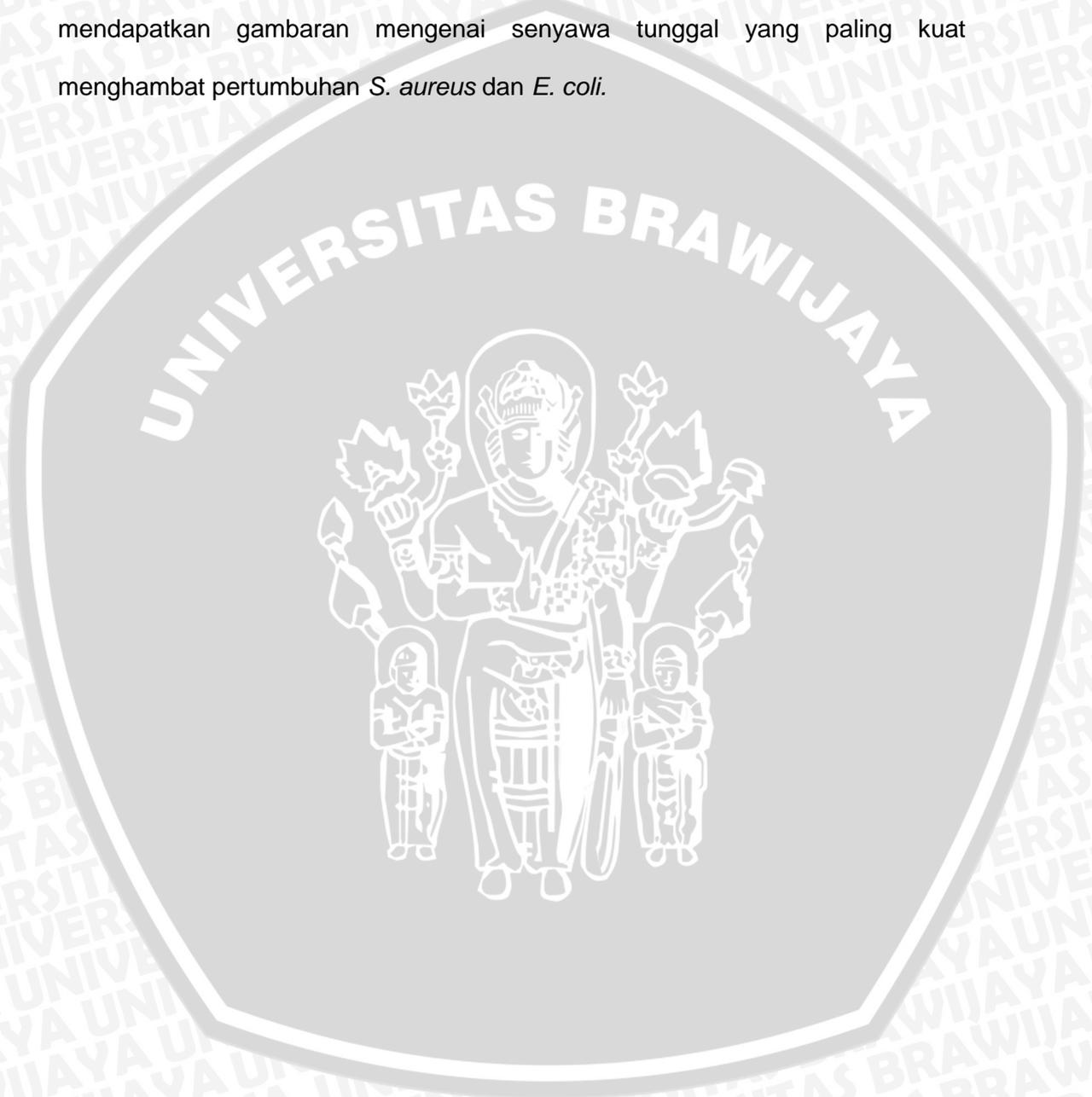
Menurut Surakhmad (1994), metode deskriptif merupakan metode penyelidikan yang menuturkan dan mengklasifikasikan data yang diperoleh dari berbagai teknik pengambilan data. Tujuan dari pelaksanaan metode deskriptif adalah untuk memaparkan secara sistematis, faktual, dan akurat mengenai fakta serta sifat dari suatu populasi tertentu. Pengumpulan data sesuai dengan tujuan dan secara rasional kesimpulan diambil dari data yang berhasil dikumpulkan.

3.3 Prosedur Penelitian

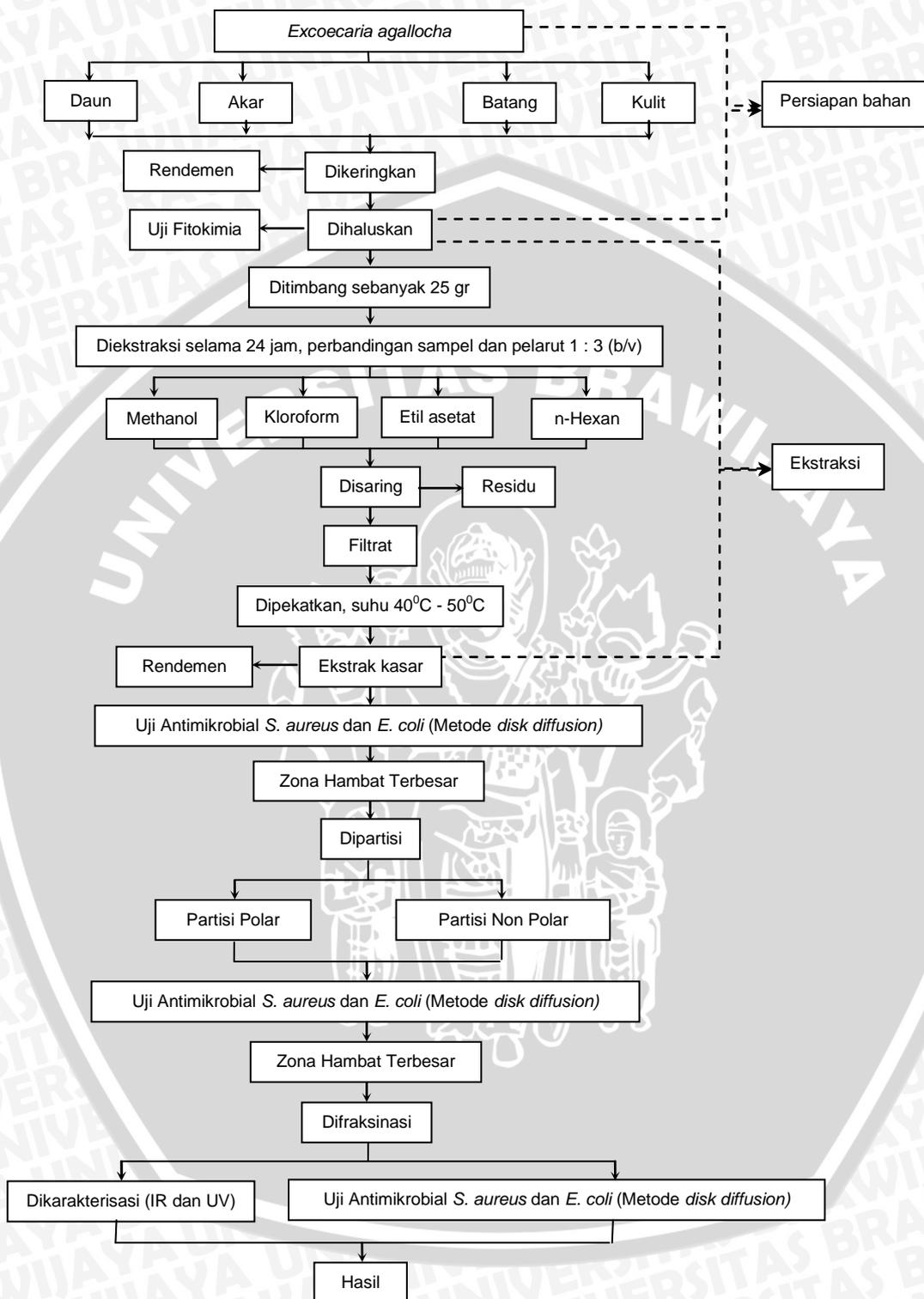
Prosedur penelitian tentang aktivitas antibakteri dari ekstrak *E. agallocha* terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* melalui 3 tahapan antara lain : Tahap 1 yaitu persiapan sampel dan pengeringan di bawah sinar matahari yang dimaksudkan untuk mendapatkan informasi mengenai rendemen pengeringan dan uji fitokimia yang bertujuan untuk mendapatkan deskripsi kandungan fitokimia dalam setiap bagian daun, akar, batang, dan kulit dari *E. agallocha*.

Tahap 2 yaitu proses ekstraksi dengan pelarut yang berbeda-beda dimaksudkan untuk memperoleh hasil rendemen ekstrak. Uji antibakteri terhadap ekstrak kasar yang dimaksudkan untuk mendapatkan informasi hasil zona penghambatan dari ekstrak *E. agallocha* terhadap *E. coli* dan *S. aureus*.

Tahap 3 yaitu proses pemisahan (partisi) dan uji antibakteri yang bertujuan untuk mendapatkan beberapa fraksi dan memperoleh informasi mengenai hasil fraksi terbaik dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli*. Identifikasi senyawa bioaktif *E. agallocha* yang dimaksudkan untuk mendapatkan gambaran mengenai senyawa tunggal yang paling kuat menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli*.



3.4 Skema Kerja Penelitian



Dalam penelitian ini dibagi menjadi 3 tahap yaitu :

3.4.1 Tahap 1

3.4.1.1 Persiapan Bahan

Mangrove yang digunakan adalah spesies *E. agallocha* yang diperoleh dari muara sungai *Porong* yang teraliri buangan lumpur *Lapindo*, tepatnya di *Dusun Tegal Sari, Desa Kupang, Kecamatan Jabon, Kabupaten Sidoarjo*. Setiap bagian mangrove yang terdiri dari : daun, akar, batang, dan kulit diambil sebanyak 1000 g. Cara pengambilan sampel yaitu dimulai dari daun, batang, kulit, dan akar. Mangrove yang sudah didapatkan dibersihkan dari kotoran yang menempel dengan air bersih. Semua bagian yang diambil dan ditimbang sebanyak 500 g - 1000 g tergantung jumlah sampel yang terdapat dalam spesies tanaman tersebut. Sampel yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam kantong plastik untuk mempermudah dalam pengangkutan. Sampel yang sudah didapat dipotong kecil-kecil yang bertujuan untuk mempercepat proses pengeringan. Metode yang digunakan untuk preparasi sampel mangrove kering berdasarkan penelitian *Ncube, et al. (2008)*, yaitu mangrove dibersihkan dari kotoran yang menempel dengan air bersih, kemudian dikeringkan dan diangin-anginkan dibawah sinar matahari hingga kadar air berkurang $\pm 10\% - 20\%$. Menurut *Patra, et al. (2009)*, sampel yang akan diekstraksi harus dikeringkan selama 15 hari dan dihancurkan hingga menjadi bubuk menggunakan mortar dan blender. Tanaman mangrove dicuci dan dikeringkan kemudian dipisahkan masing-masing bagian dari tanaman (batang, akar, kulit, dan daun). Bagian mangrove yang akan di analisis adalah daun, akar, batang, dan kulit. Mangrove dipotong kecil-kecil dan diblender hingga halus. Menurut *Harborne (2006)*, ekstrak kasar dapat diperoleh dengan cara mengeringkan daun bakau, hal ini untuk menjaga agar bahan tetap dalam keadaan baik untuk dianalisis. Setelah dikeringkan, sampel ditimbang

sebanyak 25 g untuk mengetahui berat sampel setelah dikeringkan. Selanjutnya, sampel dihaluskan menggunakan blender.

3.4.1.2 Perhitungan Rendemen Pengeringan

Rendemen adalah berat akhir setelah perlakuan. Perhitungan rendemen dilakukan sebanyak 2 kali yaitu pada proses pengeringan sampel dan hasil ekstraksi. Pada pengeringan sampel, perhitungan rendemen dilakukan untuk mengetahui jumlah kadar air yang keluar (menguap) akibat proses pemanasan. Adanya kadar air yang terlalu banyak pada sampel yang akan diekstraksi akan membuat hasil ekstraksi kurang maksimal. Rumus perhitungan rendemen pengeringan dan rendemen ekstraksi adalah :

$$\text{Rendemen Pengeringan} = \frac{\text{berat akhir (setelah perlakuan)}}{\text{berat awal (sebelum perlakuan)}} \times 100\%$$

3.4.1.3 Uji Fitokimia

Analisis fitokimia identifikasi yang dilakukan adalah uji alkaloid, tanin, polifenol, flavonoid, saponin, steroid, triterpenoid, dan glikosida. Uji alkaloid menurut Culvenor (1963) yaitu sampel yang telah halus dilarutkan dalam kloroform sebanyak 10 mL dan ditambahkan 10 mL amoniak 0,05 N serta ditambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes kemudian ditambahkan pereaksi Mayer, adanya alkaloid ditandai dengan munculnya endapan putih.

Untuk uji tanin, polifenol, flavonoid, dan glikosida dilakukan menurut Harborne (2006) yaitu sampel dididihkan kemudian disaring dan ditambahkan FeCl_3 , adanya warna biru tua atau hitam kehijauan yang terbentuk menunjukkan adanya tanin. Uji polifenol sampel dilakukan dengan menambahkan gelatin dan diamati endapan proteinnya

Untuk uji flavonoid dilakukan menurut Harborne (2006) yaitu sampel direndam dalam metanol selama 5 menit dan ditambahkan H_2SO_4 sebanyak 5 tetes dan diamati adanya warna merah yang menunjukkan kandungan flavonoid.

Pada uji glikosida dilakukan menurut Harborne (2006) yaitu sampel ditambahkan etanol 80 % sebanyak 10 mL dan dicuci dengan heksan hingga larutan heksan tidak berwarna, lalu ditambahkan $FeCl_3$ sebanyak 3 ml dan ditetesi asam sulfat pekat. Adanya kandungan glikosida ditandai dengan terbentuknya warna merah kecokelatan.

Pada analisa uji saponin, triterpenoid, dan steroid dilakukan menurut Simes, *et al.*, (1995) yaitu untuk uji saponin sampel halus dididihkan dengan etanol sebanyak 25 mL dan diuapkan, kemudian ditambahkan kloroform dan terbentuk lapisan air dan kloroform. Lapisan air dikocok kuat-kuat sehingga terbentuk busa yang menunjukkan adanya saponin. Pada lapisan kloroform ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard sehingga terbentuk warna merah yang menandakan adanya terpenoid serta warna biru atau hijau yang menandakan adanya steroid.

3.4.2 Tahap 2

3.4.2.1 Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan ialah maserasi. Sampel *E. agallocha* halus ditimbang sebanyak 25 gr. Kemudian dimasukkan ke dalam 4 jenis pelarut yang berbeda tingkat polaritasnya, yaitu metanol, kloroform, etil asetat, dan heksan. Perbandingan antara sampel dan pelarut adalah 1 : 3 (*b/v*). Selanjutnya larutan didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang ($27^{\circ}C$) untuk melepaskan senyawa bioaktif terbebas dari bagian mangrove (akar, daun, batang, dan kulit). Setiap 2 jam sekali, larutan digoyang-goyang untuk memaksimalkan senyawa yang terekstraksi. Setelah perendaman, larutan disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat (cair) dan residu (padat). Filtrat ditampung dalam

erlenmeyer 250 mL dan ditimbang beratnya untuk mengetahui rendemen hasil ekstraksi. Hasil penyaringan kemudian dituang dalam cawan petri dan diuapkan dengan *waterbath* pada suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ sampai larutan mengental dan tidak bau pelarut sudah tidak tercium, hal ini bertujuan untuk menghilangkan pelarut yang masih terjebak dalam senyawa aktif. Ampas hasil dimaserasi ulang selama 24 jam lagi dan disaring dengan kertas saring, ulangan dilakukan sampai tiga kali. Filtrat pertama, kedua, dan ketiga digabung dan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak *E. agallocha*.

3.4.2.2 Perhitungan Rendemen Ekstraksi

Metode perhitungan rendemen berdasarkan Pambayun, *et al.*, (2009), yaitu rendemen ekstraksi adalah bahan terekstrak dibagi dengan bahan baku dikalikan 100. Pada proses ekstraksi sampel, perhitungan rendemen dilakukan untuk mengetahui jumlah kadar air yang keluar (menguap) akibat proses ekstraksi dari pelarut yang berbeda-beda. Adanya kadar air yang terlalu banyak pada proses ekstraksi akan membuat hasil ekstraksi kurang maksimal. Rumus perhitungan rendemen Ekstraksi:

$$\text{Rendemen Ekstraksi} = \frac{\text{berat hasil ekstraksi}}{\text{berat sampel yang diekstraksi}} \times 100 \%$$

3.4.2.3 Pembuatan Media

Dalam pembuatan media ini semua alat dan bahan yang digunakan di sterilisasi terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang dibuat adalah media MHA (*Mueller Hinton Agar*). *Mueller hinton agar* biasanya digunakan sebagai prosedur kualitatif untuk isolasi dan identifikasi organisme agar tumbuh lebih cepat. Cara membuat media MHA adalah *mueller hinton agar* telah dibuat dipabrik dalam bentuk

bubuk, dengan formula dalam 1 L akuades diperlukan 34 g bubuk MHA. Larutan yang berada dalam erlenmeyer dididihkan sampai bubuk benar-benar larut, kemudian dilakukan sterilisasi kedalam autoklaf selama 15 menit pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C. Komposisi MHA dalam 2 L akuades adalah: *Beef infusion* (300 g), pepton (17,5 g), *starch* (1,5 g), dan agar (17 g).

3.4.2.4 Uji Aktifitas Antibakteri Ekstrak *Excocharia agallocha*

Menurut Winarsih, *et al.* (2003), efektivitas antibakteri terhadap spesies bakteri berbeda antara yang satu dengan yang lain. Sensitivitas setiap bakteri patogen terhadap suatu antibakteri harus diuji dengan berbagai konsentrasi yang menyebabkan pertumbuhan bakteri tersebut terhambat atau mati.

Prosedur pengujian antibakteri penelitian ini menggunakan metode cawan agar difusi Kirby-Bauer. Prinsip uji ini adalah pada lempeng agar yang telah disemai dengan mikroorganisme pengujian ditempelkan cakram kertas yang berisi berbagai antibiotik. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh antibiotik terlihat sebagai wilayah jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme (Lay, 1994).

Untuk mengetahui konsentrasi yang memberikan diameter daerah hambatan terbesar dilakukan uji cakram, yaitu pengujian antibakteri dengan mengukur diameter zona hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antibakteri sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Dengan demikian dapat diketahui efektifitas atau pengaruh perlakuan terhadap diameter zona hambatan *E. coli* dan *S. aureus*. Kepadatan bakteri yang digunakan sesuai dengan standart kepadatan McFarland 0,5 yaitu 10^6 koloni/mL.

Media MHA yang sudah disterilisasi dituang ke dalam cawan petri steril dengan ketinggian 4 mm (60-70 mL media untuk cawan berdiameter 150 mm dan 25-30 mL untuk cawan berdiameter 100 mm). Di dinginkan pada suhu ruang.

Media MHA yang telah beku disemai dengan *S. aureus* dan *E. coli*. Proses penyebaran dilakukan dengan cara *cotton swab* steril dicelupkan kedalam suspensi biakan uji dan disebarakan secara mendatar lalu perputaran 90° untuk olesan kedua dan 45° untuk olesan ketiga. Kepadatan bakteri yang digunakan sesuai dengan standart kepadatan McFarland 0,5 yaitu 10⁸ koloni/mL. Lalu, dibiarkan mengering selama 5 menit.

Kertas cakram dengan diameter 5,25 mm direndam dalam larutan antibiotik, yaitu ekstrak *E. agallocha* dengan 4 konsentrasi berbeda (1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm), selama ± 1 menit. Kemudian, Kertas cakram yang telah direndam dalam larutan antibakteri ditempelkan pada lempeng MHA. Inkubasi pada suhu 27°C, selama 24 jam. Zona hambat dapat diukur dengan mengukur diameter zona bening menggunakan jangka sorong.

3.4.3 Tahap 3

3.4.3.1 Metode Pemisahan / Partisi (Kromatografi Kolom)

Partisi atau pemisahan kandungan senyawa bioaktif mangrove dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom. Kromatografi kolom merupakan metode untuk pemisahan campuran. Menurut Sastrohamidjojo (2007), prinsip kerja kromatografi kolom ialah kolom pemisah diisi dengan penyerap zat padat seperti alumina (fase tetap) dan dialiri dengan pelarut seperti benzena (fase bergerak).

Metode kromatografi kolom dilakukan pengisian kolom dengan fase diam silika gel F₂₅₄. Bagian bawah kolom diisi dengan sedikit kapas dan pasir. Dibuat bubur silika dengan mencampur silika gel. Kemudian dimasukkan bubur silika gel 60 F₂₅₄, sambil diaduk agar tidak terdapat rongga udara dalam kolom. Panjang timbunan bubur silika gel dalam kolom ± 15 cm.

Setelah persiapan dengan pengisian kolom, dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom. Mula-mula ekstrak *E. agallocha* dimasukkan ke dalam kromatografi kolom, kemudian kran kromatografi dibuka. Ekstrak akan meresap ke silika gel dalam kolom sampai batas atas silika gel. Selanjutnya, dimasukkan pereaksi terus-menerus sambil kran kolom dibuka. Pelarut (fase gerak) yang digunakan dalam pemisahan ini adalah eluen campuran polar dan non polar dengan perbandingan 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1. Fraksi yang terpisah ditampung dalam botol vial 3 ml sampai seluruh ekstrak terpisahkan. Setiap fraksi yang terbentuk dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Analisis KLT disini untuk memeriksa ketunggalan dari senyawa ekstrak *E. agallocha*.

3.4.3.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk mengetahui jumlah minimal komponen dalam ekstrak kasar serta sistem pengelusi yang paling tepat untuk kromatografi kolom. Selain itu KLT juga digunakan untuk mengetahui kecepatan pergerakan dari fraksi-fraksi hasil isolasi ekstrak kasar dengan menggunakan kromatografi kolom (Abianti, *et al.*, 2010)

Dalam KLT, mula-mula dilakukan penjenuhan dalam bejana yang berisi pelarut lalu ditutup rapat. Pelarut ini merupakan fase gerak dalam kromatografi dan dicari perbandingan terbaik untuk pemurnian ekstrak. Sementara itu, dilakukan persiapan penotolan sampel ke fase diam KLT berupa *plate* KLT. *Plate* KLT ini adalah lapisan tipis silika gel diatas lempengan alumunium. *Plate* dipotong seukuran panjang 8 cm dan lebar 2 cm, lalu dibuat garis pada jarak 0,5 cm dari dasar *plate* sebagai garis origin, yaitu tempat sampel ditotolkan.

Sampel ditotolkan pada garis origin dengan mikropipet sehingga diameter totolan hanya 1,5 mm. Setelah *plate* dipastikan kering, *plate* dimasukkan dalam

bejana yang berisi pelarut sebanyak 10 mL. Selanjutnya bejana ditutup dan dibiarkan sampai pelarut bergerak mendekati garis atas dan terbentuk senyawa tunggal dengan hanya muncul satu titik di *plate* tersebut. Kemudian diambil dengan pinset tanpa menyentuh garis atas pelat dan dikeringkan. Setelah kering *plate* diidentifikasi di bawah lampu ultraviolet.

Tujuan dilakukan KLT adalah untuk mengetahui senyawa dalam ekstrak *E. agallocha* sudah murni dan terbentuk senyawa tunggal. Ciri dari terbentuknya senyawa tunggal yang sudah murni adalah hanya muncul satu titik dalam *plate*. Setelah terpisah sampel ekstrak yang sudah murni ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat sebanyak 1 g untuk mengikat senyawa H_2O yang masih terikat pada sampel ekstrak, setelah ekstrak berbentuk kristal kemudian dilakukan identifikasi UV-Vis dan FT-IR.

3.4.3.3 Identifikasi Bioaktif *E. agallocha*

a). Pengujian Spektrofotometer *Ultraviolet Visible* (UV-Vis)

Pengukuran pola spektra sampel hasil isolasi dengan menggunakan spektrofotometer ultraviolet. Identifikasi ini dipilih karena prosesnya sederhana dan tidak perlu melakukan preparasi khusus. Larutan blanko berupa pelarut dimasukkan dalam kuvet hingga tanda batas $\pm 10 \text{ ml}$, kemudian dimasukkan dalam spektrofotometer ultraviolet. Sampel hasil isolasi dimasukan pada kuvet spektro hingga tanda batas, kemudian dimasukkan pada alat *Ultraviolet Visible* Shimadu 1601 untuk dilakukan pembacaan pola spektra dan panjang gelombang yang dihasilkan. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang (λ) 200 nm – 800 nm untuk mengetahui absorbansi λ maksimum.

Pengujian ini menggunakan alat spektrofotometer ultraviolet. Menurut Fatimah, *et al.* (2009), cara analisa dengan alat spektrofotometer ultraviolet adalah mula-mula alat di nolkan dengan cara larutan blanko dimasukkan ke

dalam dua buah kuvet lalu ditekan “*back correct*” dan “*run*”. Setelah alat dalam kondisi nol, salah satu blanko dikeluarkan dan diganti dengan ekstrak. Kemudian, diatur panjang gelombang antara 200 nm – 800 nm.

b). Spektrofotometer FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*)

Spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red* digunakan untuk mengetahui gugus fungsi suatu senyawa. Prosedur identifikasi *inframerah* yaitu larutan blanko diteteskan pada plat NaCl yang transparan terhadap radiasi inframerah menggunakan pipet tetes, kemudian dimasukkan dalam alat spektrofotometer inframerah. Hasil pembacaan gugus fungsi dari blanko dengan spektrofotometer inframerah dihilangkan agar pengujian sampel gugus fungsi dari pelarut tidak terdeteksi. Setelah itu, sampel hasil isolasi berupa cairan diteteskan pada plat NaCl dan pelarutnya dibiarkan menguap sehingga membentuk film tipis. Sampel cair tersebut diukur serapannya pada daerah inframerah $\lambda = 15,4 - 2,5 \mu\text{m}$ ($600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$).

Pengujian spektrofotometer FT-IR dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Uji spektrofotometer FT-IR dilakukan untuk mengetahui gugus fungsional dari bioaktif ekstrak mangrove *E. agallocha*. Spektrofotometer FT-IR merupakan merupakan spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi Fourier untuk mendeteksi dan analisis hasil spektrumnya. Spektrum inframerah dihasilkan dari pentransmisi cahaya yang melewati sampel. Spektrum inframerah yang diperoleh, kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}). Analisis gugus fungsi sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum inframerah menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding yang sudah diketahui (Anam, *et. al.*, 2007).

Menurut Sastrohamidjojo (2001), daerah pada spektra inframerah diatas 1500 cm^{-1} menunjukkan pita spektrum atau gugus-gugus fungsi dalam molekul kimia. Sedangkan daerah dibawah 1500 cm^{-1} menunjukkan daerah sidik jari.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Rendemen Pengeringan

Rendemen dihitung berdasarkan *dry basis* (berat kering) yaitu membagi berat (gram) ekstrak yang diperoleh dengan berat (gram) bahan kering yang diekstrak dikalikan 100 %. Perhitungan rendemen dilakukan sebanyak 3 kali yaitu pada proses pengeringan sampel, proses penyaringan hasil ekstraksi dan pemekatan hasil ekstraksi. Data hasil perhitungan rendemen sampel kering dan ekstrak *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rendemen Pengeringan berbagai bagian *E. agallocha*

Bagian	Rendemen (%)
Daun	41,33 ± 1,53
Akar	64,08 ± 1,77
Batang	72,33 ± 1,15
Kulit	52,85 ± 0,84

Tabel 4 menunjukkan rendemen pengeringan paling tinggi terdapat pada batang sebesar 72,33 ± 1,15%. Kadar air yang tersimpan dalam batang lebih besar dikarenakan struktur batang yang keras, tebal, dan dinding sel yang tebal sehingga membuat air yang ada dalam batang sulit menguap. Menurut Amraini, *et al.* (2004), batang mempunyai struktur yang keras karena kadar selulosa yang terdapat pada kayu keras lebih banyak dan juga memiliki lignin yang berfungsi memperlambat serat-serat menjadi satu sehingga air yang ada di dalam sulit untuk keluar dikarenakan batang memiliki kandungan air yang cukup tinggi, sehingga pada proses pengeringan di bawah sinar matahari kadar air dalam batang masih tinggi.

Rendemen terendah pada proses pengeringan terdapat pada bagian daun yaitu sebesar 41,33 ± 1,53 %. Kadar air yang tersimpan dalam daun lebih sedikit dibandingkan dengan bagian yang lain sehingga pada proses pengeringan daun di bawah sinar matahari dapat menguap air secara optimal. Struktur daun yang

kecil, dan tipis sangat berpengaruh dalam mempercepat proses pengeringan. Menurut Supriyono (2003), luas permukaan bahan sangat berpengaruh terhadap proses pengeringan. Air menguap melalui permukaan bahan, sedangkan air yang ada ditengah merembes ke permukaan kemudian menguap. Umumnya untuk mempercepat proses pengeringan bahan pangan yang akan dikeringkan dipotong-potong sehingga permukaannya lebih kecil. Selain itu semakin tipis bahan pangan, bahan yang dikeringkan semakin cepat pula proses pengeringannya.

Hubungan kadar air bahan dan rendemen adalah berbanding lurus. Menurut Hariyati (2006), kadar air dipengaruhi oleh derajat pengeringan. Derajat pengeringan yang tinggi akan menghasilkan kadar air yang rendah. Jika kadar air yang dihasilkan tinggi maka nilai rendemen akan tinggi juga. Hasil proses pengeringan masing-masing bagian *E. agallocha* kemudian dilakukan pengujian fitokimia.

4.2 Analisis Uji Fitokimia

Hasil pengujian kandungan fitokimia yang terdapat pada bagian akar, batang, kulit, daun, dan bunga *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Fitokimia Berbagai Bagian *Excoecaria agallocha*

Jenis Pengujian	Hasil Pengujian/Pemeriksaan				
	Daun	Akar	Batang	Kulit	Bunga
Uji fitokimia :					
- Alkaloid	+++	+++	+++	++	++++
- Tanin	-	+	-	+	+
- Saponin	++++	+	-	++++	+++
- Fenolik	+	-	-	+	-
- Flavonoid	-	-	-	+++	-
- Triterfenoid	-	-	+	+++	++
- Steroid	+	-	-	-	+
- Glikosida	+++	+	+	++	+++

Keterangan :

- : Negatif
- + : Positif lemah
- ++ : Positif
- +++ : Positif kuat
- ++++ : Positif kuat sekali

Tabel 5 menunjukkan hampir seluruh bagian dari *E. agallocha* mengandung alkaloid dan glikosida. Akan tetapi untuk tanin, saponin, fenolik, flavonoid, triterfenoid, dan steroid hanya terdapat pada bagian tertentu saja. Menurut Miles, *et al.* (1999), mangrove mengandung senyawa kimia antara lain garam, asam organik, karbohidrat, benzokuinon, naptofuran, sesquiterpen, triterpenoid, alkaloid, flavonoid, polimers, derivat sulfur, dan tanin. Dari sebagian senyawa aktif yang terdapat pada mangrove, sebagian besar berfungsi sebagai antibakteri.

Alkaloid positif kuat sekali terdapat pada bagian bunga, sedangkan pada bagian kulit jumlah alkaloid sedikit atau positif. Bagian bunga *E. agallocha* mengandung alkaloid yang cukup tinggi karena beberapa alkaloid mungkin bertindak sebagai substansi cadangan untuk persediaan nitrogen, meskipun banyak alkaloid ditimbun dan tidak mengalami metabolisme lebih lanjut walaupun sangat kekurangan nitrogen. Selain itu, alkaloid dapat mengganti basa mineral dalam mempertahankan kesetimbangan ion dalam tumbuhan dengan cara pertukaran dengan kation karena sebagian besar alkaloid bersifat basa. Menurut

Lenny (2006), semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang bersifat basa dan sebagian atom nitrogen ini merupakan bagian cincin heterosiklik. Menurut Robinson (1995), pada bagian bunga alkaloid merupakan substansi beracun untuk melindungi tumbuhan dari serangan serangga, parasit atau pemangsa tumbuhan, dan penghambatan aktivitas enzimatik oleh alkaloid.

Tanin hasil analisis fitokimia *E. agallocha* hanya terdapat pada akar, kulit, dan bunga. Sedangkan pada bagian daun dan batang tidak ditemukan tanin. Tanin umumnya banyak ditemukan pada bagian tumbuhan yang berpembuluh dan berkayu. Dari data hasil uji fitokimia tanin ditemukan pada bagian kulit, akar, dan bunga. Menurut Najib (2010), kulit mengandung tanin cukup tinggi karena tanin digunakan untuk membantu proses metabolisme yang digunakan sebagai energi. Tanin tersebar dalam setiap tanaman yang berbatang. Tanin berada dalam jumlah tertentu, biasanya berada pada bagian spesifik tanaman seperti: bunga, akar, dan kulit. Salah satu fungsi utama tanin yaitu sebagai penolak hewan pemakan tumbuhan karena rasanya yang sepat (Harborne, 2006). Tanin juga mempunyai kemampuan sebagai antibakteri dimana gugus fenol yang ada dalam tanin mempunyai sifat antiseptik yang dapat digunakan sebagai antimikroba.

Menurut Cheeke (1999), saponin pada tanaman mangrove berfungsi sebagai surfaktan, dimana saponin yaitu zat yang berkemampuan untuk mengikat air dan lemak. Menurut Harborne (2006), saponin adalah kemampuan pembentukan busa dari suatu ekstrak tumbuhan. Saponin mampu menghemolisis sel darah. Dari data hasil uji fitokimia didapatkan senyawa saponin paling banyak (positif kuat sekali) terdapat pada daun dan kulit, karena daun dan kulit merupakan bagian tanaman yang berfungsi sebagai metabolisme tanaman sehingga saponin sangat dibutuhkan untuk mengikat air dan lemak. Pada bagian kulit dan daun apabila dirasakan terdapat rasa pahit, sepat, dan

berbusa apabila dikocok dalam air. Menurut Robinson (1995), saponin merupakan senyawa yang berasa pahit, berbusa dalam air, dan larut dalam air dan alkohol dan tidak larut dalam eter. Saponin juga terdapat bagian akar dan bunga. Dalam bunga saponin juga mempunyai rasa yang pahit, dan berbusa apabila dalam air. Metabolit sekunder meskipun sangat berperan untuk kelangsungan hidup dalam pertahanan, penarik seks, dan feromon (Manitto, 1992). Pada bagian batang *E. agallocha* tidak mengandung saponin dikarenakan pada batang apabila dikocok dalam air tidak membentuk busa. Menurut Harborne (2006), saponin adalah kemampuan pembentukan busa dari suatu ekstrak tumbuhan. Kadar saponin yang tinggi dalam tumbuhan membuat ekstrak alkohol-air sukar pekat. Saponin mampu menghemolisis sel darah.

Menurut Lattanzio, *et al.* (2006), tanaman memerlukan fenolik untuk pigmentasi, pertumbuhan, reproduksi, resistensi terhadap bakteri patogen, dan banyak fungsi lainnya. Hasil analisis fitokimia *E. agallocha*, bahwa kandungan fenolik hanya terdapat pada bagian kulit dan daun, dimana kedua bagian ini bertujuan untuk membantu proses pigmentasi dan pertumbuhan dari tanaman tersebut. Menurut Freeman dan Gwyn (2008), lignin terdiri dari ratusan atau ribuan monomer fenolik dan komponen utama dari batang, karena lignin tidak larut, keras, hampir tidak dapat dicerna, dan lignin memberikan pertahanan fisik yang bagus terhadap serangan patogen. Pada bagian akar, batang, dan bunga tidak mengandung senyawa fenolik. Pada bagian akar berfungsi sebagai alat penyerap mineral, sehingga pada akar tidak mengandung fenolik karena dapat menghambat fungsi dari akar mangrove. Pada bagian bunga tidak ditemukan fenolik dikarenakan bunga tidak ditemukan adanya lignin dan umumnya lignin ditemukan pada bagian yang berkayu. Menurut Michalak (2007), salah satu fungsi dari fenolik membentuk lignin untuk mempertebal dinding sel yang berfungsi untuk menghambat masuknya logam berat.

Menurut Sriningsih, *et al.* (2010), flavonoid merupakan salah satu dari sekian banyak senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh suatu tanaman, yang bisa dijumpai pada bagian daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, bunga, dan biji. Berdasarkan hasil analisis fitokimia didapatkan flavonoid hanya terdapat pada bagian kulit. Pada kulit terjadi proses pigmentasi yang memberikan warna mencolok terhadap bagian kulit itu sendiri. Menurut Freeman dan Gwyn (2008), pigmen flavonoid yaitu antosianin bertanggung jawab untuk memberikan warna mencolok dari banyak tanaman.

Triterpenoid terdapat pada bagian batang, kulit, dan bunga. Triterpenoid paling banyak ditemui pada bagian kulit. Komponen triterpenoid terlibat dalam interaksi antar tanaman, antar tanaman dan mikroorganisme, antar tanaman dan serangga dan bertindak sebagai agen antibakteri yang banyak berfungsi di bagian kulit *E. agallocha*. Menurut Kurniawan (2010), kandungan triterpenoid banyak ditemukan pada kulit karena pada umumnya berfungsi sebagai pelindung penolak serangga dan serangan mikroba. Kandungan triterpena banyak terdapat dalam damar, kulit, batang, dan getah. Triterpenoid diketahui memiliki aktivitas fisiologi tertentu, sebagai antijamur, antibakteri, antivirus, kerusakan hati, gangguan menstruasi, dan mengatasi penyakit diabetes (Robinson, 1995). Terpenoid atau sering disebut isoprenoid adalah hasil metabolisme sekunder tanaman yang memiliki turunan paling banyak pada tanaman dan sedikit pada invertebrata. Selain itu, triterpenoid juga terdapat pada bagian daun. Menurut Basyuni (2009), triterpenoid pada daun berfungsi untuk mengatur tekanan kadar garam. Triterpenoid juga terdapat pada bunga. Pada bunga terpenoid juga bertindak sebagai pertahanan, penyembuhan luka, pengatur suhu tanaman pada saat penyerbukan benih tanaman, memberikan aroma pada buah, dan memberikan keharuman pada bunga. Menurut Sastrohamidjojo (2007^a), terpenoid pada bunga memiliki volatilitas sehingga berbau harum.

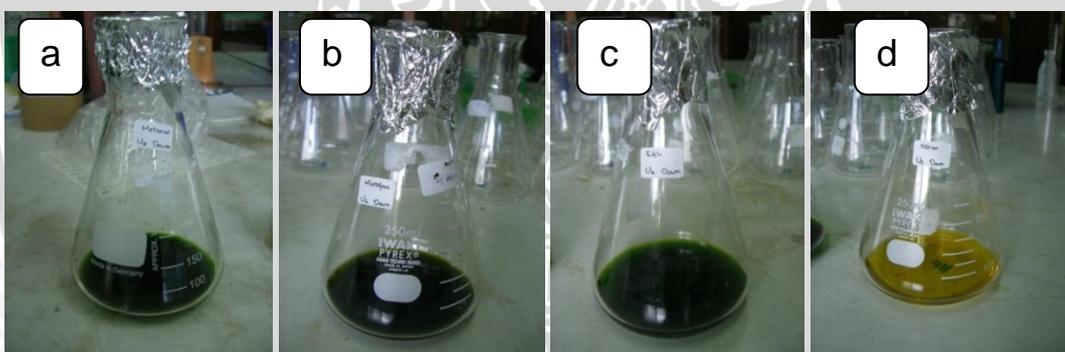
Hasil analisis fitokimia juga menunjukkan adanya steroid pada bagian daun dan bunga. Umumnya steroid tumbuhan berasal dari sikloartenol. Steroid dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan obat. Beberapa steroid mempunyai aktifitas seperti sterol (α -spinasterol) sebagai anti inflamasi (Saleh, 2009).

Hasil analisis fitokimia juga menunjukkan adanya glikosida pada semua bagian *E. agallocha* dan paling banyak terdapat pada bagian daun dan bunga. Kebanyakan pada bagian daun dan bunga digunakan sebagai obat untuk menyembuhkan penyakit, selain itu pada tumbuhan digunakan sebagai perlindungan dari pemangsa. Menurut Mustakim (2008), glikosida berperan dalam tumbuhan terlibat dalam fungsi pengaturan-pengaturan, perlindungan, dan kesehatan.

Berdasarkan hasil pengujian fitokimia maka *E. agallocha* dapat digunakan sebagai antibakteri karena mengandung berbagai senyawa bioaktif yang bisa menghambat dan membunuh bakteri. Senyawa-senyawa bioaktif seperti terpenoid, alkaloid, tanin, steroid, fenolik, glikosida, saponin, dan flavonoid terdapat disemua bagian tanaman *E. agallocha* dengan kadar yang berbeda-beda. Fungsi dari masing-masing bagian tanaman seperti akar, batang, kulit, daun, dan bunga yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa bioaktif tersebut. Menurut Sastrohamidjojo (2007), faktor luar yang mempengaruhi produksi metabolit sekunder ialah, seperti replikasi pertumbuhan, pembungaan, musim, suhu, habitat, panjangnya siang hari, dan sebagainya. Dan juga dipengaruhi oleh fungsi dari masing-masing bagian tanaman seperti daun, akar, batang, kulit, dan bunga yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa bioaktif. .

4.3 Ekstraksi dan Uji Antibakteri dari *Excoecaria agallocha*

Ekstraksi merupakan cara untuk mengisolasi senyawa bioaktif. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi dengan menggunakan 4 pelarut berbeda, yaitu metanol, kloroform, etil asetat, dan heksan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dalam perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam sel dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Perbedaan jenis pelarut dalam ekstraksi ini ialah untuk mengetahui jenis pelarut terbaik dalam mengisolasi senyawa bioaktif *E. agallocha*. Selain itu, perbedaan jenis pelarut juga untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif *E. agallocha*. Secara umum dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Warna Ekstrak Dalam: (a) Metanol, (b) Kloroform, (c) Etil Asetat, dan (d) Heksan

Hasil maserasi dapat diketahui bahwa mangrove yang diekstrak dengan metanol dan kloroform memiliki warna yang lebih gelap atau pekat, karena metanol merupakan pelarut polar yang dapat memiliki kelarutan terhadap senyawa fitokimia polar sangat tinggi. Etil asetat memiliki warna yang cenderung lebih hijau karena etil asetat merupakan pelarut semi polar sehingga memiliki kelarutan terhadap senyawa polar yang agak lebih rendah dari metanol dan

kloroform. Metanol lebih polar terhadap senyawa polar fitokimia dibandingkan dengan pelarut lainnya karena memiliki jumlah atom C yang lebih sedikit, sehingga senyawa yang terikat oleh pelarut tersebut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda (List & Schmidt, 1989). Heksan tampak warna kuning yang agak cerah dikarenakan heksan merupakan pelarut non polar sehingga memiliki kelarutan terhadap senyawa bioaktif polar yang relatif lebih rendah dan hanya dapat melarutkan senyawa non polar yaitu steroid. Hasil ekstraksi bagian *E. agallocha* dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Warna dan rendemen ekstrak *E. agallocha* dalam berbagai pelarut

Bagian Mangrove <i>E. agallocha</i>	Warna ekstrak				Rendemen ekstraksi (%)			
	Metanol	Kloroform	Etil asetat	Hexan	Metanol	Kloroform	Etil asetat	Hexan
Daun	Hijau pekat	Hijau pekat	Hijau	Kuning	5,24 ± 0,17	2,75 ± 0,20	1,13 ± 0,28	0,6 ± 0,28
Akar	Kuning kemerahan	Hijau	Kuning pekat	kuning	1,03 ± 0,07	0,41 ± 0,33	0,21 ± 0,14	1,29 ± 1,24
Batang	Jingga kemerahan	Kuning	Kuning	Kuning	0,60 ± 0,05	0,46 ± 0,30	0,56 ± 0,56	0,11 ± 0,11
Kulit	Cokelat kemerahan	Kuning	Kuning	Kuning	1,69 ± 1,10	0,94 ± 0,15	1,28 ± 0,04	0,29 ± 0,40

Tabel 6 menunjukkan adanya senyawa fitokimia yang terlarut pada masing-masing bagian *E. agallocha*. Pada bagian daun diketahui hampir semua jenis pelarut berwarna hijau, kecuali pada heksan. Berdasarkan hasil rendemen ekstraksi (Tabel 6), dapat diketahui jenis pelarut yang paling baik dalam mengisolasi senyawa bioaktif *E. agallocha* dan bagian *E. agallocha* yang paling banyak menghasilkan senyawa bioaktif.

Data rata-rata rendemen ekstraksi tertinggi diperoleh rendemen ekstrak tertinggi dengan metanol terdapat pada daun yaitu sebesar 5,24 ± 0,17%. Menurut Pratiwi (2010), secara umum metanol paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa bahan alam, karena dapat melarutkan hampir seluruh golongan metabolit sekunder. Hasil rendemen ekstrak terendah dengan heksan terdapat pada bagian batang sebesar 0,11 ± 0,11%. Hal ini dikarenakan, sifat

heksan yang mudah menguap menyebabkan rendemen ekstrak sangat sedikit. Menurut Munawaroh dan Handayani (2010), heksan memiliki sifat stabil dan mudah menguap dan selektif dalam melarutkan zat, mengekstraksi sejumlah kecil lilin. Menurut Fadhilla (2010), menyatakan bahwa dalam proses ekstraksi komposisi, warna, aroma, dan rendemen yang dihasilkan akan dipengaruhi oleh jenis, ukuran, dan tingkat kematangan bahan baku, jenis pelarut, suhu, dan waktu serta metode ekstraksi.

Berdasarkan perbandingan rata-rata rendemen ekstraksi pada setiap bagian *E. agallocha*, diketahui bahwa bagian daun cenderung memiliki rata-rata rendemen yang tinggi, diikuti kulit, akar, dan terendah batang. Perbandingan rata-rata rendemen pada setiap jenis pelarut ekstraksi, kecenderungan hasil rata-rata rendemen ekstraksi tertinggi terdapat pada metanol, diikuti kloroform, etil asetat dan terendah heksan. Kandungan senyawa dalam 4 bagian *E. agallocha* (daun, akar, batang, dan kulit) sebagian besar bersifat polar, sehingga senyawa tersebut banyak terisolasi dalam metanol.

Perbedaan nilai rendemen bisa disebabkan oleh perbedaan jenis pelarut yang digunakan. Pelarut yang berbeda akan melarutkan senyawa-senyawa yang berbeda tergantung tingkat kepolarannya. Menurut Vogel (1987), terdapat kecenderungan bagi senyawa polar akan larut ke dalam pelarut polar, sedangkan senyawa non polar akan larut dalam pelarut non polar. Ditambahkan oleh Watson (2010), bahwa semakin polar suatu pelarut, maka semakin jauh pelarut tersebut dalam menggerakkan senyawa polar. Oleh karena itu, jumlah ekstrak yang dihasilkan juga tergantung jenis pelarutnya.

Kepolaran suatu pelarut dapat diketahui melalui indeks polaritas dari pelarut tersebut. Berdasarkan indeks polaritas, metanol merupakan pelarut terpolare dari pada kloroform, etil asetat dan heksan. Heksan memiliki indeks polaritas terkecil dari pada kloroform, etil asetat, dan metanol.

Berdasarkan perolehan nilai rendemen yang tertinggi, maka metanol dapat digunakan sebagai pelarut dalam mengekstraksi senyawa bioaktif *E. agallocha*. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Pratiwi (2010), bahwa secara umum metanol banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder. Menurut Ayuningrat (2009), metanol sebagai senyawa polar dapat disebut sebagai pelarut universal karena selain mampu mengekstrak komponen polar, dapat juga mengekstrak komponen non polar seperti lilin dan lemak..

Dari data hasil ekstraksi pada bagian daun memiliki kecenderungan berwarna hijau. Hal ini dikarenakan daun banyak mengandung klorofil atau zat hijau daun dimana klorofil merupakan kelompok [pigmen fotosintesis](#) yang terdapat dalam [tumbuhan](#), menyerap cahaya merah, biru dan ungu, serta merefleksikan cahaya hijau yang menyebabkan tumbuhan memperoleh ciri warnanya. Pada bagian batang dengan metanol didapatkan warna cokelat karena pada batang terdapat pigmen karatenoid. Pada bagian kulit dan akar semua jenis pelarut berwarna kuning. Menurut Susanto (2011), sebagian besar klorofil terdapat dalam daun. Namun klorofil juga dapat dijumpai pada bagian-bagian tanaman yang berwarna hijau, seperti akar, batang, buah, biji, dan bunga dalam jumlah yang terbatas. Sedangkan menurut Sastrohamidjojo (1996), warna kuning atau jingga pada tumbuhan disebabkan adanya flavin. Warna merah, ungu, dan biru disebabkan kandungan senyawa antosianin. Ditambahkan oleh Lenny (2006), bahwa zat warna merah, ungu, biru, dan sebagian zat warna kuning pada tumbuhan merupakan senyawa flavonoid.

Senyawa fitokimia yang terlarut adalah golongan polar antara lain alkaloid, tanin, saponin, triterpenoid, fenolik, flavonoid, dan glikosida, sedangkan senyawa tidak terlarut yaitu steroid. Penggunaan pelarut yang berbeda berpengaruh nyata terhadap rendemen. Metanol, kloroform, etil asetat, dan

heksan akan melarutkan senyawa yang berbeda polaritasnya. Senyawa yang terekstrak dalam pelarut berdifusi keluar akibat gaya yang ditimbulkan Karena perbedaan konsentrasi didalam dan diluar sel. Prinsip *like dissolve like* menerangkan, senyawa polar akan terlarut dalam senyawa polar atau sebaliknya (Kristanti, 2008). Hasil ekstraksi menunjukkan kepekatan warna pada metanol dan banyaknya rendemen yang dihasilkan dibandingkan dengan hasil ekstrak pada heksan yang cenderung berwarna cerah atau bening. Pada bagian kulit mengandung semua senyawa fitokimia. Berdasarkan hasil ekstraksi yang dihasilkan yaitu adanya berbagai warna yang berbeda dari masing-masing pelarut dengan rendemen yang hampir sama besar. Menurut Cowan (1999) senyawa bioaktif yang terlarut dalam pelarut polar antara lain antosianin, terpenoid, saponin, tanin, santhosilin, totarol, kuasinoid, lakton, flavon, fenon dan polifenol, sedangkan senyawa yang larut dalam pelarut non polar adalah steroid dan flavonol.

Setelah maserasi didapatkan rendemen ekstrak dimana hasil perhitungan rendemen hasil ekstraksi untuk mengetahui banyaknya jumlah senyawa yang terlarut oleh metanol, kloroform, etil asetat, dan heksan pada masing-masing bagian.

4.4 Aktivitas Anti *S. aureus* dan *E. coli* Ekstrak *E. agallocha*

Uji aktivitas anti *S. aureus* dan *E. coli* pada ekstrak digunakan untuk mengetahui bagian *E. agallocha* dan jenis pelarut terbaik dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli*. Hasil uji aktivitas anti *S. aureus* dan *E. coli* dari ekstrak *E. agallocha* ditunjukkan dalam Tabel 4, yaitu berupa rata-rata zona hambat dari 4 bagian *E. agallocha* (daun, akar, batang, dan kulit) dan 4 pelarut (metanol, kloroform, etil asetat, dan heksan). Data zona hambat ekstrak *E. agallocha* dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Zona Hambat *S. aureus* dari Berbagai Bagian *E. agallocha*, Pelarut, dan Konsentrasi

Sampel	Pelarut	Zona Hambat (mm)			
		1 ppm	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
Daun	Metanol	5,48 ± 0,40	7,37 ± 1,25	6,55 ± 1,25	10,07 ± 3,45
	Klorofom	5,28 ± 0,06	5,50 ± 0,43	8,97 ± 5,27	9,15 ± 5,51
	Etil asetat	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,32 ± 0,12
	Heksane	5,25 ± 0,00	5,68 ± 0,75	5,72 ± 0,81	5,25 ± 0,00
Akar	Metanol	7,03 ± 0,98	7,20 ± 1,70	7,28 ± 1,77	7,38 ± 1,98
	Klorofom	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00
	Etil asetat	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	6,58 ± 2,31	7,65 ± 4,16
	Heksane	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00
Batang	Metanol	6,28 ± 0,96	5,68 ± 0,75	6,80 ± 1,41	8,82 ± 1,80
	Klorofom	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00
	Etil asetat	5,25 ± 0,00	7,33 ± 1,91	8,08 ± 2,40	8,33 ± 3,26
	Heksane	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00
Kulit	Metanol	6,17 ± 1,59	8,08 ± 2,50	9,42 ± 3,73	14,63 ± 5,10
	Klorofom	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00
	Etil asetat	5,25 ± 0,00	6,17 ± 1,59	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00
	Heksane	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00

Keterangan : Perhitungan diameter zona hambat termasuk dengan diameter kertas cakram (5,25 mm)

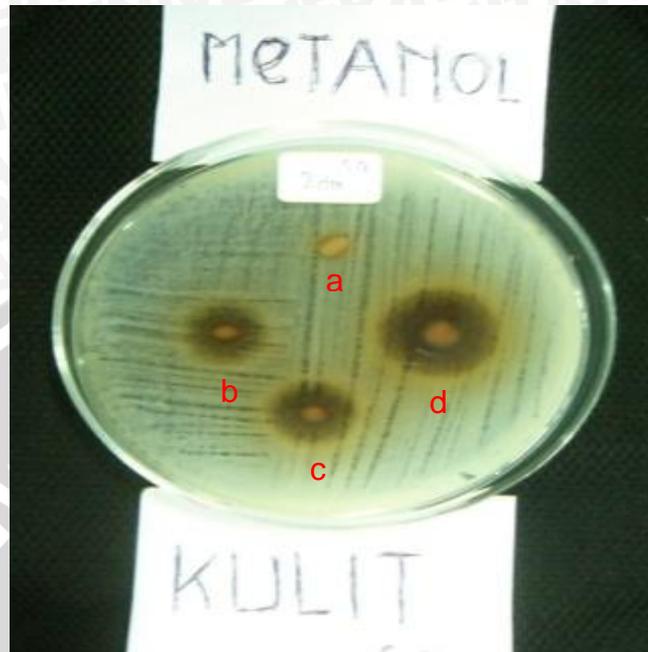
Tabel 7 menunjukkan rerata zona hambat ekstrak *E. agallocha* dengan bakteri indikator gram positif *S. aureus* dengan 3 kali pengulangan didapatkan hasil di atas. Dari hasil penelitian diketahui bahwa ekstrak *E. agallocha* memiliki aktivitas anti *S. aureus*. Hal ini dapat diamati dari timbulnya zona bening disekitar kertas cakram. Zona bening disekitar kertas cakram menandakan bahwa tidak adanya bakteri yang mampu tumbuh setelah diinkubasi dikarenakan adanya senyawa antibakteri pada daerah tersebut. Penggunaan pelarut yang berbeda untuk mengekstrak senyawa antibakteri pada *E. agallocha* memberikan pengaruh yang berbeda pula terhadap diameter zona hambat atau zona bening yang timbul di sekitar kertas cakram. Selain itu didukung hasil dari uji fitokimia

menunjukkan bahwa di semua bagian *E. agallocha* mengandung senyawa fitokimia yang beberapa diantaranya mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Rerata kisaran diameter zona hambat pada konsentrasi 1 sampai 1000 ppm didapatkan diameter zona hambat terkecil didapati pada bagian kulit dan batang dengan heksan serta akar dengan kloroform. Didukung hasil uji fitokimia pada bagian kulit menunjukkan adanya alkaloid, tanin, saponin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, dan glikosida. Sedangkan pada bagian batang hanya menunjukkan adanya alkaloid, triterpenoid, dan glikosida. Heksan hanya mampu melarutkan senyawa non polar seperti steroid. Namun, jumlah steroid pada bagian kulit dan batang tidak ada, sehingga aktivitas anti *S. aureus* kecil. Untuk bagian akar dengan kloroform didapatkan pada hasil uji fitokimia menunjukkan adanya alkaloid, tanin, saponin, dan glikosida dalam jumlah yang sedikit sehingga aktivitas anti *S. aureus* juga kecil.

Dari data hasil rerata diameter zona hambat *S. aureus* dari 1 sampai 1000 ppm terbesar terdapat pada bagian kulit dengan metanol dari ppm terkecil sampai terbesar berturut-turut $6,17 \pm 1,59$ mm; $8,08 \pm 2,50$ mm; $9,42 \pm 3,73$ mm; dan $14,63 \pm 5,10$ mm. Dari hasil uji fitokimia didapatkan pada bagian kulit mengandung alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, triterpenoid, fenolik, dan glikosida. Semua senyawa tersebut larut dalam metanol. Menurut Agoramoothy, *et al.* (2008), berdasarkan hasil penelitian pada tanaman mangrove disebutkan bahwa selain mengandung tanin sebagai metabolit sekunder utama, juga mengandung steroid, triterpen, steroid, saponin, flavonoid, dan alkaloid yang larut dalam metanol. Menurut Sari (2008), ekstrak mangrove dengan metanol memberikan zona hambat terhadap *S. aureus*. Banyaknya senyawa fitokimia polar yang terlarut dalam metanol juga adanya sinergi antara senyawa bioaktif tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri menyebabkan diameter zona

hambat pada bagian kulit sangat besar. Zona hambat *S. aureus* ekstrak metanol kulit *E. agallocha* dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Zona Hambat *S. aureus* Ekstrak Metanol Kulit *E. agallocha* (a = 1 ppm, b = 10 ppm, c = 100 ppm, dan d = 1000 ppm)

Data hasil zona hambat ekstrak *E. agallocha* pada bakteri *E. coli* dapat dilihat pada Tabel 8.

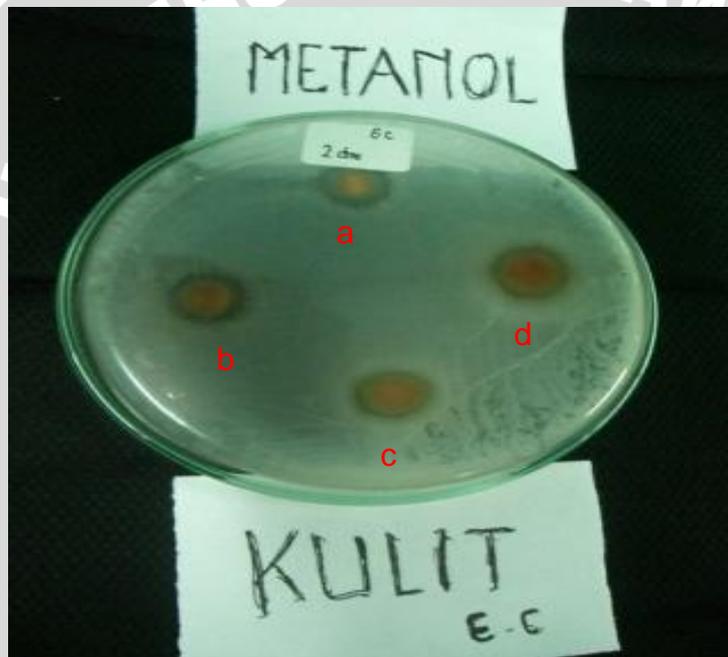
Tabel 8. Zona Hambat *E. coli* dari Berbagai Bagian *E. agallocha*, Pelarut, dan Konsentrasi

Sampel	Pelarut	Zona Hambat (mm)			
		1 ppm	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
Daun	Metanol	6,93 ± 1,05	7,15 ± 1,81	7,42 ± 2,24	8,23 ± 3,44
	Kloroform	5,25 ± 0,00	5,72 ± 0,81	5,25 ± 0,00	8,92 ± 5,03
	Etil asetat	5,25 ± 0,00	5,42 ± 0,29	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00
	Heksan	5,25 ± 0,00	5,35 ± 0,17	5,42 ± 0,29	6,12 ± 1,03
Akar	Metanol	9,68 ± 4,31	9,98 ± 4,52	10,62 ± 5,91	13,03 ± 7,35
	Kloroform	7,83 ± 4,47	5,25 ± 0,00	8,38 ± 5,43	10,15 ± 8,49
	Etil asetat	9,92 ± 4,55	5,25 ± 0,00	10,38 ± 5,05	11,68 ± 5,94
	Heksan	7,32 ± 3,58	8,38 ± 5,43	10,17 ± 5,59	9,82 ± 7,91
Batang	Metanol	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	7,23 ± 2,81	7,18 ± 2,61
	Kloroform	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00
	Etil asetat	5,25 ± 0,00	7,38 ± 2,26	8,15 ± 3,31	9,87 ± 5,53
	Heksan	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00
Kulit	Metanol	8,75 ± 2,63	10,95 ± 1,06	13,72 ± 1,54	14,45 ± 2,75
	Kloroform	5,88 ± 1,10	5,25 ± 0,00	7,50 ± 3,90	10,23 ± 4,65
	Etil asetat	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	9,48 ± 7,33	9,05 ± 6,58
	Heksan	5,25 ± 0,00	5,25 ± 0,00	7,45 ± 3,81	7,83 ± 4,47

Keterangan : Perhitungan diameter zona hambat termasuk dengan diameter kertas cakram (5,25 mm)

Tabel 8 menunjukkan diameter zona hambat *E. coli* pada konsentrasi 1 sampai 1000 ppm adalah yang terkecil pada batang dengan kloroform dan heksan. Dalam uji fitokimia pada batang didapatkan adanya alkaloid, triterpenoid, dan glikosida dimana ketiga senyawa tersebut larut dalam pelarut polar serta kloroform sebagian besar melarutkan triterpenoid dan flavonoid dimana dalam uji fitokimia flavonoid positif lemah sehingga kemampuan untuk menghambat bakteri juga lemah. Diameter rerata zona hambat *E. coli* terbesar pada konsentrasi antara 1 sampai 1000 ppm yaitu pada kulit dengan metanol. Dari hasil uji fitokimia diketahui bahwa pada kulit mengandung senyawa fitokimia : alkaloid, tanin, saponin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, dan glikosida. Metanol dapat melarutkan alkaloid, tanin, saponin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, dan glikosida,

sehingga zona hambat terhadap *E. coli* juga besar. Menurut Cowan (1999), senyawa bioaktif yang terlarut dalam pelarut polar antara lain antosianin, terpenoid, saponin, tanin, santosilin, totarol, kuasinoid, lakton, flavon, fenon dan polifenol, sedangkan senyawa yang larut dalam pelarut non polar adalah steroid dan flavonol. Menurut Naufalin (2005), ekstrak kloroform sebelum di fraksinasi bersifat sinergis, sehingga meningkatkan daya antibakteri keseluruhan didalam ekstrak asal. Zona hambat *E. coli* ekstrak metanol kulit *E. agallocha* dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Zona Hambat *E. coli* Ekstrak Metanol Kulit *E. agallocha* (a = 1 ppm, b = 10 ppm, c = 100 ppm, dan d = 1000 ppm)

4.5 Fraksinasi dan Uji Aktivitas Anti *S. aureus* dan *E. coli* Fraksi *E. agallocha*

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain. Pemisahan jumlah dan jenisnya senyawa menjadi fraksi yang berbeda yang tergantung pada jenis tumbuhan. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar (Harborne, 1987). Berdasarkan hasil antibakteri dengan zona hambat terbaik maka dilakukan partisi untuk memisahkan senyawa polar dan non polar dari masing-masing pelarut. Dari hasil uji antibakteri diketahui bagian kulit *E. agallocha* merupakan bagian yang mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli* paling besar.

Ekstrak metanol kulit diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* lalu dipisahkan senyawa polar dan non polar kemudian diujikan antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Ekstrak metanol kulit dipartisi dengan menggunakan metanol : klorofom dengan perbandingan 5 : 5. Hal ini bertujuan untuk memisahkan senyawa polar dan non polar yang masih terkandung dalam ekstrak kulit. Senyawa polar hanya larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa non polar hanya larut dalam pelarut non polar.

4.5.1 Fraksi Polar Terhadap *S. aureus* dan *E. coli*

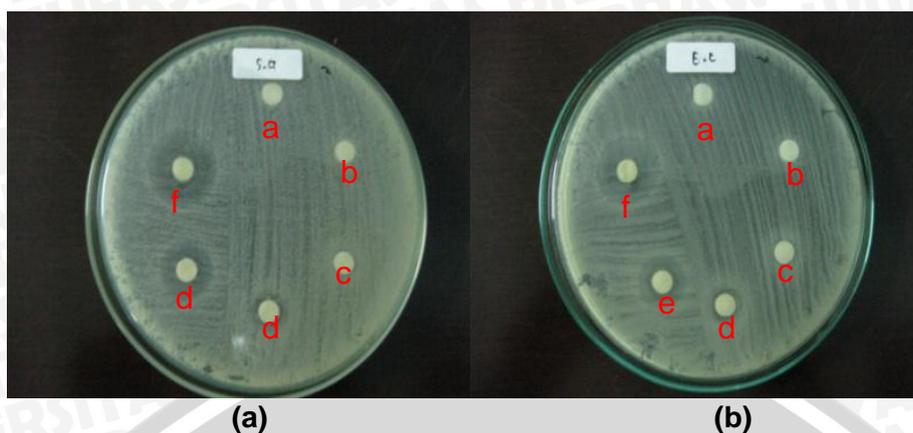
Hasil pengujian antibakteri untuk ekstrak metanol kulit fraksi polar dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Zona Hambat Fraksi Polar Ekstrak Kulit *E. agallocha* terhadap *S. aureus* dan *E. coli*

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Zona Hambat (mm)			
		<i>S.a.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>E.c.</i>
Ekstrak Kulit <i>E. agallocha</i> Fraksi Polar	12000	7.35	9.55	9	8
	10800	7	7	6.15	7
	9600	6.65	6.55	7.55	6.55
	8400	7.25	6.35	7.65	6.25
	7200	8.35	6.25	7.45	6.25
	6000	6.45	6.15	6.15	6.25
	3000	7.15	7.25	8.15	8.65
	1500	6	6.15	8.25	8.25
	1200	8.95	7.25	7	8
	750	6.25	7.55	8	7.45
	120	8.85	6.15	8	8.45
	12	9	6.15	6.65	8.95

Keterangan : Perhitungan diameter zona hambat termasuk dengan diameter kertas cakram (5,25 mm)

Tabel 9 menunjukkan zona hambat terbesar pada ekstrak metanol kulit *E. agallocha* fraksi polar yaitu sebesar 9,55 mm untuk *S. aureus* dan 9 mm untuk zona hambat pada *E. coli*. Pada kulit mengandung senyawa fitokimia alkaloid, tanin, saponin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, dan glikosida. Hampir semua senyawa yang terdapat pada kulit merupakan senyawa metabolit sekunder polar sehingga larut dalam metanol dan aktivitas antibakteri kulit mempunyai zona hambat yang besar. Menurut Harborne (1987), senyawa kimia alam yang terkandung dalam tumbuhan berupa senyawa metabolit sekunder yaitu triterpen/steroid, flavonoid, tanin, saponin, kumarin, alkaloid, glikosida, dan lain sebagainya. Triterpenoid / steroid merupakan senyawa yang larut dalam pelarut non polar seperti heksan. Tanin dan flavonoid dapat larut dalam senyawa polar yaitu metanol, etanol, etil asetat, dan pelarut polar lainnya. Zona hambat ekstrak metanol kulit *E. agallocha* fraksi polar dapat dilihat pada Gambar 18.



Gambar 18. Zona Hambat Ekstrak Metanol Fraksi Polar Kulit (a). *S aureus* (a= 12000 ppm, b= 10800 ppm, c= 9600 ppm, d= 8400 ppm, e= 7200 ppm, f= 6000 ppm), dan (b). *E. coli* (a= 12000 ppm, b= 10800 ppm, c= 9600 ppm, d= 8400 ppm, e= 7200 ppm, f= 6000 ppm)

Menurut Kanazawa *et al.* (1995), suatu senyawa yang mempunyai polaritas optimum akan mempunyai aktivitas antibakteri maksimum, karena untuk interaksi suatu senyawa antibakteri dengan bakteri diperlukan keseimbangan hidrofilik-lipofilik (HLB: *hydrophilic lipophilic balance*). Polaritas senyawa merupakan sifat fisik senyawa antibakteri yang penting. Sifat hidrofilik diperlukan untuk menjamin senyawa antibakteri larut dalam fase air yang merupakan tempat hidup bakteri, tetapi senyawa yang bekerja pada membran sel hidrofobik memerlukan pula sifat lipofilik sehingga senyawa antibakteri memerlukan keseimbangan hidrofilik-lipofilik untuk mencapai aktifitas yang optimal (Branen dan Davidson, 1993).

4.5.2 Fraksi Non Polar Terhadap *S. aureus* dan *E. coli*

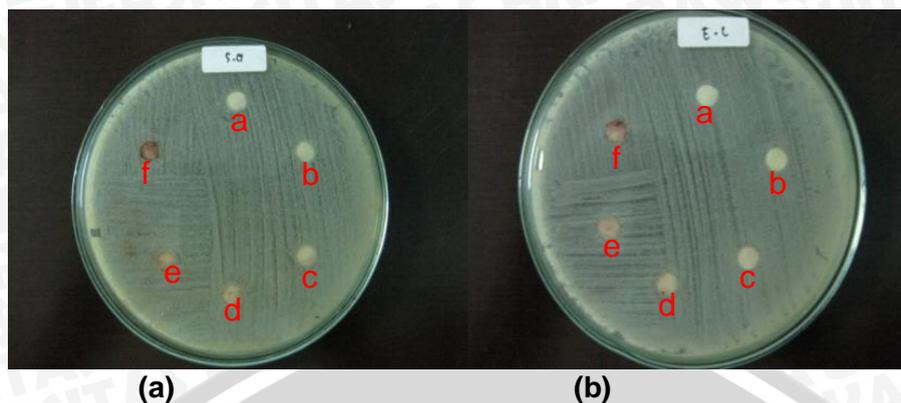
Hasil pengujian antibakteri untuk ekstrak metanol kulit *E. agallocha* fraksi non polar dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Zona Hambat Fraksi Non Polar Ekstrak Kulit *E. agallocha* Terhadap *S. aureus* dan *E. coli*

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Bakteri (mm)			
		<i>S.a.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>E.c.</i>
Ekstrak Kulit <i>E. agallocha</i> Fraksi Non Polar	3000	6.15	7.75	6.55	6.25
	2700	6.55	7	6.15	6.55
	2400	6.25	7.15	6	6
	2100	7.15	6.15	5.55	5.85
	1600	6	7.15	5.65	5.85
	1500	7.25	6.65	6.15	7.65
	750	6.65	5.85	7.25	6
	375	5.95	5.85	6.45	6.95
	300	6.65	6.45	6.45	6.25
	187.5	6.55	6	6.85	6.45
	30	5.65	6.95	5.95	6
	3	6.35	6.15	7.65	5.75

Keterangan : Perhitungan diameter zona hambat termasuk dengan diameter kertas cakram (5,25 mm)

Ekstrak metanol kulit *E. agallocha* fraksi non polar diperoleh zona hambat tertinggi pada *S. aureus* sebesar 7,75 mm dan untuk *E. coli* sebesar 7,65 mm. Pada kulit mengandung alkaloid, tanin, saponin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, dan glikosida. Steroid yang bersifat non polar tidak ada dalam fitokimia *E. agallocha* sehingga senyawa bioaktif yang bersifat non polar terlarut sangat sedikit. Kemampuan antibakteri dari ekstrak metanol kulit *E. agallocha* dari fraksi non polar memiliki daya hambat yang kecil. Zona hambat ekstrak metanol kulit *E. agallocha* fraksi non polar dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Zona Hambat Ekstrak Metanol Fraksi Non Polar Kulit (a). *S. aureus* (a= 3000 ppm, b= 2700 ppm, c= 2400 ppm, d= 2100 ppm, e= 1600 ppm, f= 1500 ppm), dan (b). *E. coli* (a= 3000 ppm, b= 2700 ppm, c= 2400 ppm, d= 2100 ppm, e= 1600 ppm, f= 1500 ppm).

4.6 Fraksinasi Kolom Kromatografi

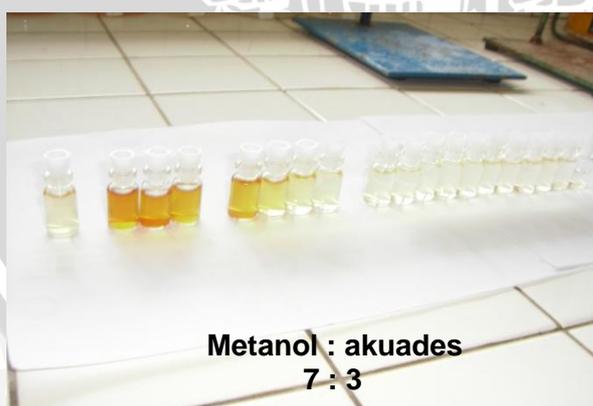
Ekstrak kulit yang memiliki daya hambat antibakteri terbesar difraksinasi kembali untuk memisahkan suatu campuran yang dibagi dalam beberapa jumlah kecil atau fraksi-fraksi, sehingga diperoleh isolat murni yang kemudian diidentifikasi jenis senyawanya. Proses pemisahan senyawa yang terdapat pada ekstrak kulit mangrove fraksi polar adalah dengan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄. Pada penelitian ini sistem kromatografi kolom yang digunakan adalah “*normal phase*”, yaitu fase diam yang digunakan bersifat polar dan fase gerak bersifat lebih non polar, sehingga pigmen yang bersifat non polar akan keluar terlebih dahulu (Jeffrey *et al.*, 1997).

Isolasi senyawa bioaktif dari ekstrak kulit pelarut metanol fraksi polar ini menggunakan berbagai macam perbandingan metanol, kloroform, etil asetat, heksan dan akuades sehingga diperoleh perbandingan terbaik yang mampu menurunkan senyawa bioaktif adalah perbandingan metanol : akuades (7:3). Kromatografi kolom ekstrak metanol kulit *E. agallocha* fraksi polar dilihat pada Gambar 20.



Gambar 20. Kromatografi Kolom Ekstrak Metanol Kulit *E. agallocha* Fraksi Polar

Gambar 20 diatas memperlihatkan pita-pita pigmen berdasarkan warna dan tingkat kepolarannya masing-masing. Warna yang terbentuk adalah warna orange pekat dan orange. Dari hasil isolasi senyawa bioaktif diatas, kemudian ditampung dalam botol vial. Perbandingan metanol : akuades (7 : 3) diperoleh 2 subfraksi dimana didapatkan botol vial 1-5 merupakan fraksi 1 dan botol vial 6-20 merupakan fraksi 2. Hasil isolasi kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 21. Sub Fraksi Metanol : Akuades (7:3) Ekstrak kulit *E. agallocha*

4.7 Pemurnian Senyawa Bioaktif Ekstrak Kulit *E. agallocha* dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada pemurnian dengan KLT digunakan silika gel 60 F₂₅₄ yang sudah diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100°C selama 10 menit. Pemurnian dilakukan pada ekstrak metanol kulit *E. agallocha* dari fraksi polar yang sudah di isolasi dengan kromatografi kolom dengan metanol:akuades (7:3). Ekstrak ditotolkan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan mikropipet kemudian dikeringkan dan dielusi dengan fase gerak metanol:akuades (7:3), kemudian ditunggu hingga garis batas. Noda yang terbentuk diperiksa dengan lampu ultraviolet. Dengan menggunakan pelarut yang tepat maka noda yang terbentuk tunggal sehingga senyawa tersebut sudah murni dan siap untuk diidentifikasi dengan inframerah dan ultraviolet. Kromatografi lapis tipis ekstrak kulit *E. agallocha* dapat dilihat pada Gambar 22.



Gambar 22. Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Kulit *E. agallocha*

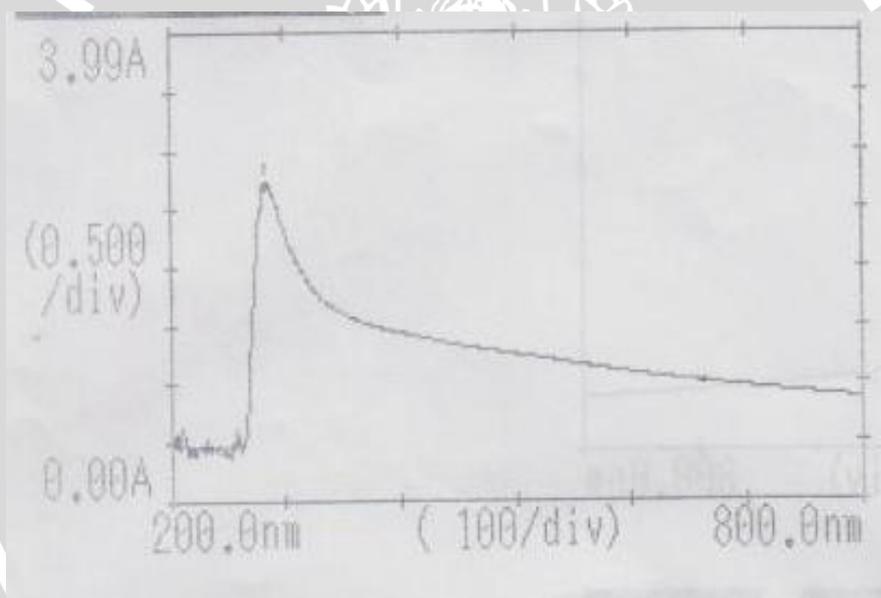
Setelah diperoleh 2 fraksi kemudian kedua fraksi tersebut diuapkan sampai terbentuk kristal yang dianggap senyawa tersebut murni. Fraksi bercampur dengan air tersebut sulit menguap atau berbentuk kristal sehingga diberi Na₂CO₄ anhidrat sehingga diperoleh fraksi yang berbentuk kristal.

4.8 Identifikasi senyawa Anti *S. aureus* dan *E. coli* dari Ekstrak Kulit *E. agallocha*

Bioaktif *E. agallocha* diidentifikasi menggunakan uji spektrofotometri ultraviolet dan FTIR. Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi ekstrak kulit *E. agallocha* dengan metanol, maka fraksi polar yang diidentifikasi kandungan senyawanya

4.8.1 Uji Spektrofotometer *Ultraviolet Visible* (UV-Vis)

Hasil analisis isolat subfraksi dengan perbandingan metanol:akuades (7:3) menggunakan spektrofotometer ultraviolet dalam metanol dengan panjang gelombang 200 nm - 800 nm. Hasil identifikasi spektrofotometri ultraviolet senyawa bioaktif dari ekstrak kulit *E. agallocha* dapat dilihat pada Gambar 23.



Gambar 23. Spektra UV-Vis Senyawa Bioaktif Ekstrak Kulit *E. agallocha*

Pengukuran pola spektra senyawa bioaktif hasil isolasi ekstrak kulit *E. agallocha* dengan menggunakan spektrofotometer diperlukan untuk identifikasi jenis senyawa yang potensial sebagai antibakteri. Identifikasi ini dipilih karena prosesnya sederhana karena tidak perlu melakukan preparasi khusus. Sampel dimasukan pada kuvet spektro kemudian diletakkan pada tempat khusus pada alat kemudian alat akan melakukan pembacaan pola spektra dan panjang

gelombang yang dihasilkan. Selain itu sampel yang digunakan untuk proses identifikasi ini sangat sedikit $\pm 20 \mu\text{m}$. Keuntungan dari identifikasi menggunakan spektrofotometer ultraviolet adalah cara yang sederhana dan konsentrasi larutan yang sangat kecil (Adriana, 2009).

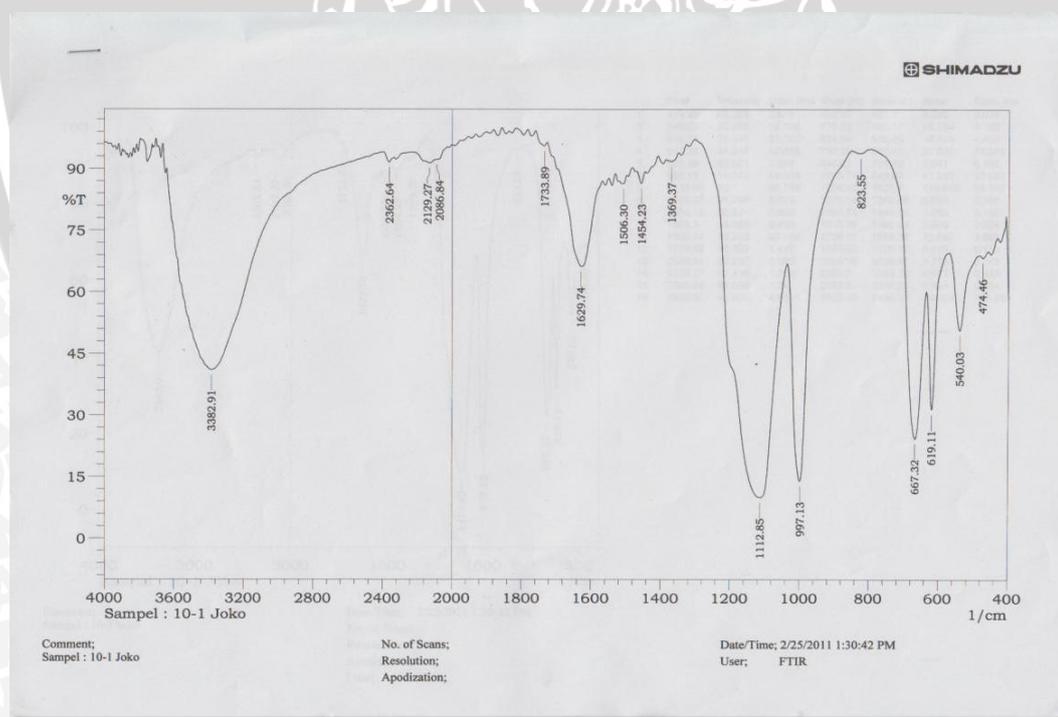
Berdasarkan hasil spektrofotometer ultraviolet diperoleh satu puncak dimana pola serapan maksimum pada puncak dengan menggunakan metanol memiliki bilangan gelombang 283 nm dengan absorbansi 2,7412 A. Dari hasil ultraviolet tersebut sampel ekstrak metanol kulit fraksi polar dengan hasil subfraksi metanol:akuades (7:3) adalah triterpenoid. Menurut Yusuf (2010), pada serapan bilangan gelombang 283 nm menunjukkan bilangan gelombang dari triterpenoid. Ditambahkan pula oleh Santi (2009), Spektrofotometer ultraviolet menunjukkan isolat memberikan serapan pada bilangan gelombang 254 nm, 283 nm, dan 342,7 nm yang merupakan triterpenoid.

Serapan yang dihasilkan oleh triterpenoid terdapat pada rentang panjang gelombang ultraviolet yaitu 180 nm - 380 nm karena triterpenoid merupakan senyawa yang tidak berwarna. Triterpena terdapat dalam dammar kulit, batang, dan getah (Harborne, 1987). Ditambahkan Yusuf (2010), pengujian kristal dengan pereaksi Liebermann-Burchard terbentuknya warna triterpenoid dengan warna merah jingga. Menurut Sastrohamidjoyo (2007), kebanyakan terpenoid terdapat bebas dalam jaringan tanaman, tidak terikat dengan senyawa-senyawa lain, tetapi banyak diantara mereka terdapat sebagai glikosida, ester dari asam organik, dan dalam beberapa hal terikat dengan protein. Anggota yang rendah (senyawa C_{10} dan C_{15}) sering dapat diperoleh dengan cara distilasi uap dari tanaman yang segar atau kering, sedangkan anggota yang lebih tinggi (C_{20} atau lebih) biasanya diisolasi dengan cara ekstraksi dengan pelarut kemudian dipisahkan dan dimurnikan dengan cara kristalisasi, distilasi dan kromatografi.

Menurut Fessenden (1999), dalam molekul yang memiliki ikatan rangkap tak terkonjugasi, mengakibatkan penyerapan sinar ultraviolet terjadi pada panjang gelombang yang lebih pendek dari pada yang dialami sistem terkonjugasi. Makin banyak ikatan rangkap tak terkonjugasi, maka makin besar energi yang diperlukan untuk mengalami transisi, sehingga absorpsi akan semakin bergeser kepanjangan gelombang yang lebih kecil.

4.8.2 Uji Spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (FT-IR)

Hasil uji spektra inframerah pada penelitian ini digunakan untuk mendukung data spektra ultraviolet dalam menentukan struktur kimia yang terkandung dalam senyawa bioaktif ekstrak kulit *E. agallocha*. Pola spektra inframerah senyawa bioaktif ekstrak kulit *E. agallocha* dapat dilihat pada Gambar 24.



Gambar 24. Spektra Inframerah Senyawa Bioaktif Ekstrak Kulit *E. agallocha*

Spektroskopi inframerah pada penelitian ini digunakan untuk mendukung data spektra UV-Vis dalam menentukan struktur kimia yang terkandung dalam ekstrak kulit *E. agallocha*. Identifikasi menggunakan inframerah ini dipilih karena dapat digunakan pada semua frekuensi dari sumber cahaya secara simultan sehingga analisis dapat dilakukan lebih cepat, sensitifitas dari metode spektrofotometer inframerah lebih besar daripada cara dispersi, sebab radiasi yang masuk ke sistem detektor lebih banyak karena tanpa harus melalui celah (Sastrohamidjojo, 2001).

Pita serapan pada daerah bilangan gelombang $3382,91\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi ulur gugus O-H yang menunjukkan pita serapan yang kuat dan lebar untuk gugus alkohol. Pita serapan tersebut diperkuat oleh serapan pada daerah bilangan gelombang $1112,85\text{ cm}^{-1}$ yang kuat dan lebar yang menunjukkan serapan -C-O- . Hal ini sesuai dengan Yusuf (2010), puncak serapan pada daerah bilangan gelombang $3448,1\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus fungsi alkohol (OH) dan diperkuat dengan puncak serapan $1105,0\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan analisa dari triterpenoid yang memiliki kerangka keton dengan gugus pengikat alkohol. Ditambahkan Harborne (1987), triterpenoid berstruktur siklik yang rumit kebanyakan berupa alkohol, aldehid, dan asam karboksilat.

Menurut Prihatiningtyas, *et al.* (2010), hasil spektra inframerah menunjukkan bahwa isolat bioaktif tumbuhan akar kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers) menunjukkan adanya puncak serapan karakteristik pada $3348, 2970, 2916, 1743, 1685, 1373$ dan 1230 cm^{-1} . Puncak serapan pada 3348 cm^{-1} adalah serapan gugus OH, puncak serapan 2916 cm^{-1} dan 2970 cm^{-1} merupakan puncak serapan gugus C-H. Adanya gugus C=O , CH_3 dan gugus C-O-C menunjukkan adanya golongan terpenoid. Ditambahkan Asih, *et al.*, (2010), berdasarkan hasil uji isolat dengan inframerah golongan terpenoid sejati bersifat antiradikal bebas, dengan gugus fungsi OH, CH alifatik, C=O dan C-O alkohol.

Menurut Muharni (2010), ciri khas triterpenoid menunjukkan pita serapan alkohol (3354), C-H alifatik (2943, 2856), C=C terisolasi (1639), gem dimetil (1380,1334), dan C-O (1188). Gugus-gugus tersebut hampir sama dengan gugus fungsi yang dimiliki senyawa fraksi kulit *E. agallocha* yaitu gugus fungsi O-H, C-O, C=C, dan C-H alifatik. Maka isolat antibakteri fraksi kulit *E. agallocha* mengandung gugus fungsi triterpenoid.

4.9 Mekanisme Anti *S. aureus* dan *E. coli* Terpenoid dari Ekstrak Kulit *E. agallocha*

Berdasarkan hasil-hasil pengujian yang telah dipaparkan sebelumnya, maka dapat diketahui karakteristik senyawa bioaktif yang berperan sebagai penghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli* dalam ekstrak metanol kulit *E. agallocha*. Dari hasil uji antibakteri diketahui ekstrak metanol bagian kulit *E. agallocha* merupakan bagian yang mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli* paling besar. Hasil analisis fitokimia diketahui bahwa pada bagian kulit memiliki kandungan senyawa bioaktif yang lebih kompleks dibandingkan kandungan bioaktif bagian lainnya.

Hasil identifikasi ultraviolet dan inframerah diperoleh bahwa senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli* paling besar yang terdapat pada bagian kulit *E. agallocha* adalah triterpenoid. Hasil tersebut diperkuat dengan hasil uji fitokimia yang menunjukkan bahwa senyawa triterpenoid positif kuat dalam kulit *E. agallocha*. Ditambahkan Varahalarao *et al.* (2009), *E. agallocha* telah digunakan secara tradisional untuk mengobati luka, sengatan dari hewan laut, dan borok. Getah susu pohon ini dapat menyebabkan kebutaan sementara jika memasuki mata. Getah juga dapat menyebabkan lecet kulit dan iritasi. Uji klinis dilakukan pada tanaman ini telah menunjukkan potensi anti-HIV, antikanker, antibakteri dan antivirus. Penyelidikan fitokimia sebelumnya

pada spesies ini mengungkapkan adanya diterpenoid, triterpenoid, flavonoid, dan forbol ester.

Pada penelitian ini hasil ekstraksi terbaik adalah kulit dengan metanol, hal ini dikarenakan metanol merupakan pelarut polar yang memiliki tingkat kelarutan terhadap senyawa bioaktif yang tinggi. Menurut Cowan (1999), senyawa-senyawa yang larut dalam metanol antara lain antosianin, terpenoid, saponin, tanin, santosilin, totarol, kuasinoid, lakton, flavon, fenon, dan polifenol. Pada penelitian ini pelarut yang digunakan untuk mengekstrak kulit adalah metanol, sehingga senyawa yang diidentifikasi adalah terpenonoid. Selain itu adanya pigmen warna orange pada hasil kromatografi kolom menunjukkan senyawa tersebut adalah triterpenoid. Menurut Simes (1995), pada analisis terpenoid, sampel halus yang di didihkan dengan metanol dan diuapkan, kemudian ditambahkan kloroform dan pereaksi Liebermann-Burchard sehingga terbentuk warna merah yang menandakan adanya triterpenoid.

Beberapa hasil penelitian menunjukkan senyawa triterpenoid memiliki aktifitas sebagai antibakteri yaitu monoterpenoid, linalool, diterpenoid, *harwicklic acid*, fitol, triterpenoid, saponin, dan triterpenoid glikosida (Gunawan *et al.*, 2008). Mekanisme antibakteri karena sifat triterpenoid cenderung lipofilik (Cowan, 1999). Kerusakan membran sel dapat terjadi ketika senyawa aktif antibakteri bereaksi dengan sisi aktif dari membran atau dengan melarutkan konsituen lipid dan meningkatkan permeabilitasnya. Membran sel bakteri terdiri dari fosfolipid dan molekul protein. Akibat peningkatan permeabilitas, senyawa antibakteri dapat masuk ke dalam sel. Ketika di dalam sel, senyawa tersebut dapat melisis membran sel atau mengkoagulasi sitoplasma dari sel bakteri tersebut (Banwart, 1999).

Perbedaan bakteri positif dan bakteri gram negative yaitu pada bakteri gram positif 90% dinding selnya terdiri lapisan peptidoglikan, sedangkan bakteri

gram negatif lapisan peptidoglikan hanya sekitar 5 % - 20%. Senyawa antibakteri dapat mencegah sintesis peptidoglikan pada sel yang sedang tumbuh, maka bakteri gram positif umumnya lebih peka dibandingkan bakteri gram negatif. Fenol dapat bereaksi dengan komponen fosfolipid dari membran luar sel, sehingga menyebabkan terjadinya perubahan permeabilitas membran dan akan mengakibatkan sel mengalami kebocoran. Perubahan permeabilitas membran akan menyebabkan keluarnya metabolit seluler selain protein, asam nukleat, ion-ion logam (Ca^{2+} , M^+ , dan Mg^{2+}), dan perubahan morfologi (Fadhilla, 2010).

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri terdapat kecenderungan untuk zona hambat *S. aureus* lebih besar jika dibandingkan zona hambat *E. coli*. Hal ini disebabkan bakteri gram positif, yaitu *S. aureus*, cenderung lebih sensitif terhadap komponen antibakteri.



5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Berdasarkan hasil analisa uji fitokimia didapatkan bahwa *E. agallocha* mengandung senyawa metabolit sekunder antara lain alkaloid, tanin, saponin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, dan glikosida.
2. *E. agallocha* dapat digunakan sebagai antibakteri *S. aureus* dan *E. coli*, terutama pada bagian kulit yang diekstraksi dengan metanol. Pada ekstrak metanol kulit *E. agallocha* ditunjukkan dengan adanya zona hambat paling kuat terhadap *S. aureus* sebesar $14,63 \pm 5,10$ mm dan $14,45 \pm 2,75$ mm terhadap *E. coli*.
3. Hasil identifikasi karakteristik ultraviolet dan inframerah dari bioaktif *E. agallocha* sebagai anti *S. aureus* dan *E. coli* menunjukkan senyawa yang paling kuat menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli* merupakan triterpenoid. Hasil ini diperkuat dengan uji fitokimia, yang menunjukkan triterpenoid terdeteksi dalam senyawa yang terkandung pada kulit *E. agallocha*. Triterpenoid bersifat polar, karena sebagian besar senyawa bioaktif *E. agallocha* terlarut dalam pelarut metanol yang merupakan pelarut polar.

5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai senyawa antibakteri ekstrak kulit *E. agallocha* menggunakan metode identifikasi GC-MS dan NMR.

DAFTAR PUSTAKA

- Abianti R., Utami S.T., dan Sumentry M. 2010. Ekstraksi Senyawaan Bioaktif Daging Buah *Dillenia indica* dalam Pelarut Polar Sebagai Antibakteri *Escherichia coli*. Jurusan teknik Gas dan Petrokimia. Universitas Indonesia. Jakarta. Halaman 1 – 8.
- Adnan, M. 1997. Teknik Kromatografi untuk Analisis Bahan Makanan. Andi, Yogyakarta. hal. 27-58
- Agoramoorthy , G., Fu-An Chen, V. Venkatesalu, Daih-Huang Kuo and Po-Chuen Shea. 2008. *Evaluation of Antioxidant Polyphenols from selected Mangrove Plants of India*. Asian Journal of Chemistry (20) 2 : 1311-1322
- Agoramoorthy. G, Chandrasekaran. M, Venkatesalu. V, Hsu. M.J. 2007. *Antibacterial and antifungal Activities of Fatty Acid Nethyl esters of The Blind-Your-Eye mangrove from India*. Braziliant jurnal of microbiology 38:739-742 ISSN 1517-8382
- Amraini, S. Z., Zulfansyah, Evelyn, Rhovi S., dan Maizul H. 2004. Kajian Awal Pembuatan Pulp Akasia dengan Metode Pulp Biologik. Teknik Kimia Universitas Riau. Teknik Kimia Universitas Riau. Riau
- Anam, C., Sirojudin, dan K. Sofjan Firdausi. 2007. Analisis Gugus Fungsi pada Sampel Uji, Bensin dan Spiritus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR. Jurusan Fisika Fakultas MIPA Universitas Diponegoro. Semarang.
- Andriana, Rissa. 2009. Identifikasi Kandungan Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Terung Pucuk (*Solanum macrocarpon L*). Program Studi Teknologi Hasil Pertanian. Jurusan Teknologi Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Sriwijaya. Indralaya.
- Anwar, C. 1994. Pengantar Praktikum Kimia Organik. FMIPA, UGM. Yogyakarta.
- Asih Astiti I. A. R., Gunawan. I. W. G., dan Ariani desi N. M., 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Golongan Triterpenoid dari Ekstrak *n*-Heksana Daun Kepuh (*Sterculia foetida L.*) Serta Uji Aktivitas Antiradikal bebas. Jurnal Kimia 4 (2) : 135 – 140
- Asyhari. 2011. Foodborne Disease.<http://www.deptan.go.id>. Diakses tanggal 20 April 2011
- Augustin Jm., Vera K., sven B.A and saren B. 2011. *Molecular Activities, Biosynthesis and Evolution of Triterpenoid Saponins*. J.M. Augustin et al/Phytochemistry (2011). Article in Press. Journal Homepage: [www.Elsevier. Com/located/phytochem](http://www.Elsevier.Com/located/phytochem). Diakses Tanggal 20 April 2011
- Ayuningrat E. 2009. Penapisan Awal Komponen Bioaktif dari Kijing Taiwan (*Anodonta woodiana* Lea.) Sebagai Senyawa Antioksidan. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Institut Pertanian Bogor. Halaman 23.

- Banwart, G.J. (1999). *Plants Products as Antimicrobial Agents*. Clinical Microbiology review, 12 (4), 564-582.
- Basri, S. 1996. Kamus Kimia. Penerbit Rineka Cipta. Jakarta
- Basyuni, M. 2008. *Studies on terpenoids biosynthesis mangrove of tree species*. Dissertation United Graduste School of Agriculture Sciences, Koghasima University. Japan
- Bandaranayake, W. M. 2002. *Bioactivities, Bioactive Compounds and Chemical Constituents of Mangrove Plants*. *Wetlands Ecology and Management* 10: 421–452, 2002. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands
- Belqis. R. 2008. *Fundamentals of Microbiology*. Boston: Jones and Bartlett. ISB
- Black, J.G. 2005. *Microbial principles and Exporations*. John wiley and Sons. Inc. Airlington
- Branen A.L. and Davidson P.M. 1993. *Antimicrobial in Food*. Marcel Dekker. New York. Page 1 – 528
- Brantner A., Z. Malaes, S. Pepeljnjak, and A. antolic. 1996. *Antimicrobial Activity of Paliurus spina-christi mill* . J. Ethopharmacol.52 Hal. 119-122
- Buck KM. 2001. *Cleaning and Disinfecting: The Effects of Germicides on Microorganism*. <http://www.infectioncontrolday.com>. Diakses Tanggal 20 April 2011
- Buckle, K.A., R.A. Edwards., G.H. Fleet and M. Wooton. 2007. Ilmu Pangan. Universitas Indonesia-Press. Jakarta.
- Channell, Richard J. P. 1998. *Natural Products Isolation*. Huwana Press, New Jersey.
- Cheeke P.R.. 1999. *Actual and Potential Applications of Yucca schidigera and Quillaja saponaria Saponins in Human and Nutrition*. Proceedings of the American Society of Animal Science. Page 1 – 10
- Chemical. 2010. Saponin. <http://www.Chemicalbook.com/ChemicalProductPropertyENCB9393639.htm>. Diakses Tanggal 10 Juni 2011
- Coffey J.F. 2011. *Medicinal Plants : What Makes Them Different From Other Plants*. <http://factoidz.com/medicinal-plant-s-what-makes-them-different-from-other-plants/>. Diakses Tanggal 10 Juni 2011
- Colegate, S.M. and R.J. Molyneux. 2008. *Bioactive Natural Products : Detection, Isolation, and Structural Determination* Sec. Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group 6000, Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742
- Cruz S. 2007. *Pristimerin: sc-281138*. <http://www.scbt.com/datasheet-281138-pristimerin.html>. Diakses Tanggal 10 Juni 2011

- Culvenor, C.C.J and J.S. Fitzgerald. 1963. *A Field method for Alkaloid Screening of Plants*. J. Pharm. Sci., 52, 1963, 303-304.
- Dewi F.K. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*, Linnaeus) Terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. Halaman 1 - 38
- Dinda. 2008. Alkaloid. <http://medicafarma.blogspot.com/2008/08/alkaloid.html>. Diakses Tanggal 10 Juni 2011
- Druglead. 2009. *Serpentine (Alkaloid)*. <http://www.druglead.com/cds/serpentine-alkaloid.html>. Diakses Tanggal 10 Juni 2011
- Edberg, S. C. 1986. Tes Kerentanan Anti-Mikroba In Vitro. Dalam Edberg, S. C. And S.A. Berger. Antibiotika dan Infeksi. Alih Bahasa : Sanusi, C. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta
- Efendi I. 1998. Mangrove di Daerah Riau. Pekanbaru. Lembaga Penelitian Universitas Riau. 45 hal
- Eryanti. 1999. Identifikasi dan Isolasi Senyawa Kimia dari Mangrove (hutan Bakau). Laporan Hasil Penelitian Pusat Penelitian Kawasan Pantai dan Perairan Universitas Riau.
- Fadhilla, R. 2010. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Tumbuhan Lumut Hati (*Marchantia paleacea*) Terhadap Bakteri Patogen dan Pembusuk Makanan. Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Halaman 1 - 104
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan 1. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Fatimah, S., S. Indaryati, dan Iis H. 2009. Pengaruh *Thorium* Terhadap Analisis Uranium Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Prosiding Seminar Pengelolaan Perangkat Nuklir Tahun 2009. PTBN-BATAN, Serpong 19 Agustus 2009.
- Fessenden, R.J and J.S Fessenden. 1999. *Organic Chemistry*, 3rd Ed. California : Wadsworth. Page 1 – 56
- Freeman and Gwyn A. B. 2008. *An Overview of Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores*. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/OverviewOfPlantDiseases.aspx>. Diakses Tanggal 21 April 2011
- Gritter, Roy J., 1991. Pengantar Kromatografi. Penerbit ITB. Bandung
- Guenther, E., 1949. *The Essential Oils*. Vol. I D. Van Nostrand Co., Inc. New York. 354-356 p.
- Hagerman, A.E. 2002. Tannin Chemistry. <http://www.sers.mauohio.edu>. tanggal diakses 18 november 2009

- Harborne J.B. 1987. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Diterjemahkan oleh : Padmawinata, K dan I, Soediro. Penerbit ITB. Bandung. Halaman 1 - 354
- Harborne JB. 2006. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Diterjemahkan oleh : Padmawinata, K dan I, Soediro. Penerbit ITB. Bandung.
- Hariyati, M.N. 2006. Ekstraksi dan Karakterisasi Pektin dari Limbah Proses Pengolahan Jeruk Pontianak. Fakultas Teknologi Pertanian Bogor. Bogor. Halaman 39
- Hartono T. 2009. Bahan Alam Fitokimia Saponin. Farmasi. Dikti. Net. <http://farmasi.dikti.net/saponin/>. Diakses tanggal 17 Maret 2011.
- Hayani E. 2007. Pemisahan Komponen Rimpang Temu Kunci Secara Kromatografi Kolom. Buletin Teknik Pertanian Vol. 12 No.1, 2007, Halaman 35 – 37
- Hayati AP. 1999. Sintesis dan Uji Aktivitas Biologi Antibiotik 3- Hidroksipikolinil Serin Oktil Ester dan Turunannya. (Tesis). Magister Sains Ilmu Kimia. Program Pascasarjana. Program Studi Ilmu Kimia. Universitas Indonesia.
- Hayati, K.H., A. Ghanaim F., dan Lailis S. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Tanin Pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*). Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang
- Hill, R.A. 1993. *The chemistry of Natural Product*. Blackie Academy and Profesional. London
- Horvart. 1981. *Tannins : Definition*. 2001. <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/definition.html>. animal science webmaster. Cornert Univercity. Diakses pada Tanggal 21 April 2011
- Jawetz, E., Melnick, J.L dan Adelberg, E.A. 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi I. Diterjemahkan Oleh Penerjemah Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Salemba Medika. Surabaya.
- Kanazawa AT, Ikeda T, endo. 1995. *A Novel Approach to Mode of Action of Cationic Biocides Morphological Effect on Antibacterial Activity*. J Appl. Bacterial 55-60
- Kristanti, N.A., Aminah, N.S., Tanjung, M., dan Kurniadi, B. 2008. Buku Ajar Fitokimia. FMIPA. Universitas Airlangga Surabaya
- Kubitschek, H. E. 1990. *Cell Volume Increase in Escherichia coli after Shifts to Richer Media*. J. Bacteriol. 172 (1) : 94-101.
- Kurnia. R. 2010. Antibakteri Tanaman Rempah. <http://lordbroken.wordpress.com/2010/05/24/antibakteri-tanaman-rempah/>. Diakses tanggal 23 Maret 2011

- Kurniawan, D. 2010. Pemanfaatan Ekstrak kulit laban (*Vitex pubescens vah*) sebagai bahan anti jamur. IPB. Bogor
- Kusmiati dan Agustini N.W.S. 2006. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri Dari Mikroalga *Porphyridiumcruentum*. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong 16911. Biodiversitas. Volume 8, Nomor 1 Halaman: 48-53.
- Lattanzio V., Veronica M.T.L., Angela C. 2006. *Role Of Phenolics in The Resistance Mechanisms Of Plants Against Fungal Pathogens and Insect*. Phytochemistry: Advances in Research, 2006 : 23 – 67 ISBN : 81-308-0034-9
- ..
- Lay,B. W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta
- Lemmens, R.H and N. Wulijarni Soetjipto. 1991. *Plant Resousces of South-East Asia (PROSEA) No.4, Flavonoid and Tannin Producing Plant*. Pudoc wegeningen. Netherlands.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoid, Fenilpropiona, dan Alkaloid. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sumatera Utara. Medan
- List, P.H., and Schmidt, P.C. 1989. Teknologi Fitokimia. CRC Press. Boston
- Litbang Deptan, 2009. Adanya Pencegahan Pemanasan Global Dua Per Tiga Spesies di Bumi Hilang, www.biogen.litbang.deptan.go.id/berita_artikel. diakses tanggal 19 Juni 2011
- Lu-E Shi, Zhi-Liang Zhang, Liang-Ying Shing, Dan-Dan Yang, Yu-Peng Guo, Xia-Feng Guo, Li-Ming Zhao and Zhen-Xing Tang. 2011. *Antioxidants Extraction By Supercritical CO₂*. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(3). Pp. 300-308
- Mangatas, A. 2010. Kromatografi. Teknik Industri Universitas Mercubuana. Jakarta
- Manitto, P. 1992. Biosintesis Produk Alami (diterjemahkan oleh Koensoemardiyah). Penerbit IKIP Semarang. Semarang.
- Mayo, D. W., R. M. Pike, P. K. Trumper. 2000. *Microscale Organic Laboratory, with Multi Scale Syntheses*, 4th Ed. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Metacyc. 2011. *Compound : 2-phenylchromen-4-one*. http://biocyc.org/META/NEW_MAGE?type=COMPOUND&object=CPD-8485. Diakses Tanggal 10 Juni 2011
- Michalak A. 2007. *Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing Under Heavy Metal Stress*. Polish J. Of Environ. Stud. Vol. 15, No 4 92006), 523-530

- Miles H. D., Kokpol U., Chittawong V., Tip-Pyang S., Tunsuwan and nguyen C. 1999. *Mangrove Forest-The Importance of Concervation as a Bioresource for Ecosystem Diversity and Utilization as a Source of Chemical Consituents With Potential Medicinal and Agricultural Value*. URL:<http://www.iupac.org/symposial/proceedings/phuket97/miles.html>. IUPAC. Diakses Tanggal 21 April 2011
- Muharni. 2010. Triterpenoid Lupeol Pada Manggis Hutan (*Garcinia bancana* Miq) Jurnal Penelitian sains Volume 13 No 3(C)13308. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya. Palembang
- Munawaroh S. dan Handayni P.A. 2010. Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan Pelarut Etanol dan N-Heksana. Jurnal Kompetisi teknik Vol.2, No.1. 73-78.
- Mustakim H. 2008. Tugas Terstruktur Kimia Bahan Alam Glikosida Antrakinin. Jurusan Farmasi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan. Universitas Jenderal Sudirman. Purwokerto. Halaman 1 – 18
- Najib A. 2010. Tanin. www.nadjeeb.wordpress.com. Diakses pada tanggal 20 Mei 2011
- Nangude T.D. 2007. *Salt Formation Is An Acid – Base Reaction Involving Either A Proton- Transfer Or Neutralization Reaction And Is Therefore Controlled By Factors Influencing Such Reactions*. <http://www.lookchem.com/cas-140/1401-55-4.html>. Diakses Tanggal 10 Juni 2011
- Naufalin, R. 2005. Kajian Sifat Antimikroba Ekstrak Bunga Kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) Terhadap Berbagai Mikroba Patogen Dan Perusak Pangan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Halaman 97
- Ncube N.S., Afolayan. A.J. and Okoh A.I. 2008. *Assessment Techniques of Antimicrobial Properties of Natural Compound of Plant Origin : Current Methods and Future Trends*. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (12), pp. 1797-1806, 17 june, 2008
- Padli. 2010. Uji Aktifitas Antibakteri Ekstrak Metanol Benalu The (*Scurullaatropurpurea* (Bl) Dans.) Terhadap *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus* Serta Uji Toksisitas terhadap *Artemiasalina* Leach. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Halaman 11 – 12
- Patra K.U., Mohapatra A.D., Rath S.K., Dhal N.K., Thatoi H. 2009. *Screening of Antioxidant and Antifilarial Activity of Leaf Extracts of Excoecaria agallocha L*. International Journal of Integrative Biology. ISSN 0973-8363, Vol 7 No. 1 , 1 – 7
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 2005. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Pract C.J. 2006. *Flavonoid-Rich Grapeseed Extracts: for Cardiovascular Patients: Flavonoids*. Blackwell Publishing; 60(11):1484-1492

- Pratiwi T.R. 2010. Pra Rancangan Pabrik Dimetil Eter dari Metanol Kapasitas 31.000 Ton Per Tahun. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta. Halaman 1 – 10
- Prihaningtias W., Widyastuti S.M, Wahyuono S. 2010. Aktivitas Antibakteri Fungi Endofit *Thievalia polygonoperda*, Isolat Dari Tumbuhan Akar Kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers). Fakultas Farmasi. UGM. Yogyakarta. Halaman 1 - 7
- Purnobasuki, H. 2004. Potensi Mangrove Sebagai Tanaman Obat. Fakultas MIPA, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Purwanti, E. 2010. Profil Komponen Bioaktif Tanaman Kava-kava (*Piper methysticum, Forst*) dari berbagai Lokasi. Universitas Muhammadiyah Malang. Malang
- Rachdie, P.M. 2005. Pengaruh Ekstrak Serbuk Kayu Siwak (*Salvadora Persica*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Lempeng Agar. Skripsi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya
- Rao, N.M. 2006. *Medical Biochemistry*. New Age International Publisher. Mumbai
- Robinson T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi, diterjemahkan Oleh Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung. Halaman 191 – 213
- Roy J. Gritter, James M. Bobbit, and Arthur E. S., 1991. Pengantar Kromatografi. Penerbit ITB. Bandung
- Sa'ad M. 2009. Uji Aktivitas Penangkap Radikal Isolat A dan B Fraksi IV Ekstrak Etanol Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora L.*) dengan Metode DPPH. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta. Halaman 1 – 17
- Salamah, E., E. Ayuningrat, dan S. Purwaningsih. 2008. Penapisan Awal Komponen Bioaktif dari Kijing Taiwan (*Anodonta woodiana* Lea.) sebagai Senyawa Antioksidan. Buletin Teknologi Hasil Perikanan, Vol XI, No. 2: 119-133 pp.
- Saleh, C. 2009. Senyawa steroid dari tumbuhan sidawayah (*Woodfordia Floribunda Salisb.*). *Jurnal Kimia Mulawarman*. 6 (2) : 1 – 6.
- Santi, S.R. 2009. Penelusuran Senyawa Sitotoksik Pada Kulit biji Nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*) *Jurnal Kimia* 3 (2), Juli 2009: 101-108. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana. Bali
- Sastrohamidjojo, H. 2001. Kromatografi. Liberty. Yogyakarta. Halaman 1 – 108
- _____, H. 2007. Sintesis Bahan Alam. Gajah mada University Press. Yogyakarta. Halaman 1 – 243
- Setiawati. 2007. Spektroskopi (Modul Kuliah). Fakultas Farmasi Universitas sanata Dharma Yogyakarta

- Setyawan, W. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Batang Pepaya (*carica papaya* l) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Multiresisten Antibiotik. Skripsi thesis, Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Setyawan, A. D., Ari Susilowati, dan Sutarno. 2002. Biodiversitas Genetik, spesies, dan Ekosistem Mangrove di Jawa. Kelompok Kerja Biodiversitas Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret. Surakarta
- Sherley. 1998. Sintesis dan Uji Aktivitas Biologi Senyawa Analog Antibiotik UK-3 (2-Hidroksinikotinil-Heksil-Serin-Ester dan Turunannya). [Tesis] Magister Sains Ilmu Kimia. Program Pascasarjana. Program studi Ilmu Kimia. Universitas Indonesia. Jakarta
- Siagian, A. 2002. Mikroba Patogen Pada Makanan dan Sumber Pencemarannya. Penerbit ITB. Bandung
- Simes, J.J.H., J.G. Tracey, L.J. Webb, and W.J. Dunstan. 1995. *An Australian Phytochemical Survey*. Commonwealth Scientific and Industrial research Organization. Australia. Page 26-28
- Sriningsih., Adji W. H., Sumaryono W., Wibowo A. E., Caidir., Firdayani., Kusumaningrum S., kartakusuma P. 2010. Analisa Senyawa Golongan Flavonoid Herba Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). Fakultas Farmasi. Universitas Pancasila. Halaman 1 – 4
- Supriyono. 2003. Mengukur Faktor-faktor dalam Proses Pengeringan. Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta
- Surakhmad, W. 1989. Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar : Metode Teknik. Penerbit Tarsito. Bandung.
- Susanto, A. 2011. Laporan Praktikum Fisiologi Tumbuhan, Kadar Klorofil pada Berbagai Tanaman yang Berbeda Umur. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya. Surabaya
- Thoennissen N.H., Gabriela B.I., Ngan B.D., Ryoko O., Patricia L., Abbassi., Jee H.S., Dong Y., Melvin T., Wei D.X., Jhonatan W.S and Phillip K. 2009. *Cucurbitacin Apoptosis by Inhibitor of The JAK/STAT Pathway and Potentiates Antiproliferative Effects of Gemcitabine on Pancreatic Cancer Cells*. Cancer Res 2009;69:(14)
- Ummah M. K. 2010. Ekstraksi dan Pengujian Aktivitas Antibakteri Senyawa Tanin pada Daun Blimbing Wuluh (*Averhoa bilimbi* L.). Skripsi. UIN Malang. Halaman 1 – 8

- Varahalarao, V., Varaprasad Bobbalara, Somasekhar Penumajji, and K. Chandrasekhar Naidu. 2009. *Excoecaria Agallocha L. Antimikrobal Propertis Againts Important Pathogenic Microorganism*. International Journal of ChemTech Research CODEN(USA): IJCRGG ISSN : 0974-4290 Vol.1, No.4, pp 865-867. Department of Botany, Andhra University, Visakhapatnam-3, A.P.,India
- Vogel, A.I. 1987. *Texbook of Pactical Organic Chemistry*. Resived by Furnies B.S 4nd Edition. New York
- Voight, R. 1995. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi. Gajah Mada University Press.Yogyakarta
- Watson D.G. 2010. Analisis Farmasi Buku Ajar Untuk Mahasiswa Farmasi Dan Praktisi Kimia Farmasi Edisi 2. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. Halaman 372 – 375.
- Wanto, dan M. Ramli. Alat – Alat Industri Kimia 1. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Jakarta
- Wikipedia. 2009. Metanol. <http://wikipedia.mobi/id/metanol?t=1>. Diakses tanggal 9 Juni 2009.
- _____. 2010. *Octyl Glucoside*. http://en.wikipedia.org/wiki/Octyl_glucoside. Diakses tanggal 10 Juni 2011
- _____. 2011. Saponin. <http://en.wikipedia.org/wiki/Saponin>. Diakses tanggal 10 Juni 2011
- Wilson and Gislovd. 1982. Kimia Farmasi dan Medisinal Organik. Edisi ketujuh. Penerjemah Fatah, A.M. Gajah Mada University press. Yogyakarta.
- Winarsih, S., Dzen S. M dan Santoso S. 2003. Bakteriologi Medik. Tim Mikrobiologi FK Universitas Brawijaya. Malang
- Yuliasih, I., Tun Tedja I., Illah S., Hardaning P., Krisnani S., dan Titi C.S. 2010. Pengaruh Proses Fraksinasi Sagu Terhadap Karakteristik Fraksi Amilosa. J. Tek.Ind.Pen.Vol. 17(1)29-36. Departemen Industri Pertanian Fakultas Pertanian IPB. Bogor
- Yunita, e., Tedo H., Anindyajat, dan Fikri A., 2009. Pemanfaatan Kitosan dari Limbah Rajungan (*Portunus pelagicus*) sebagai Antimikroba pada Obat Kumur. Pekan Ilmiah Mahasiswa Farmasi Indonesia (PIMFI). Universitas Gajah Mada. Yogyakarta
- Yusuf, S. 2010. Isolasi dan Penentuan Struktur Molekul Senyawa Triterpenoid dari Kulit Batang Kayu Api-api Betina(*Avicennia marina* Neesh). Jurnal Penelitian Sains Volume 13 No 2(C) 13205. Jurusan FMIPA Universitas Sriwijaya. Palembang

Lampiran 1. Data Pengeringan Berbagai Bagian *E.agallocha*

Bagian E.agallocha	Pengeringan 1		Pengeringan 2		Pengeringan 3	
	Basah (g)	Kering (g)	Basah (g)	Kering (g)	Basah (g)	Kering (g)
Daun	1000	410	1000	430	1000	400
Akar	1000	660	400	250	800	510
Batang	1000	730	1000	710	1000	730
Kulit	950	510	500	260	700	370

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Akhir}}{\text{Berat Awal}} \times 100\%$$

$$= \frac{\text{Berat kering}}{\text{Berat basah}} \times 100\%$$

● Rendemen 1

1. Daun

$$\text{Rendemen} = \frac{410}{1000} \times 100\%$$

$$= 41\%$$

2. Akar

$$\text{Rendemen} = \frac{660}{1000} \times 100\%$$

$$= 66\%$$

3. Batang

$$\text{Rendemen} = \frac{730}{1000} \times 100\%$$

$$= 73\%$$

4. Kulit

$$\text{Rendemen} = \frac{510}{950} \times 100\%$$

$$= 53,68\%$$

● Rendemen 2

1. Daun

$$\text{Rendemen} = \frac{430}{1000} \times 100\%$$

$$= 43\%$$

2. Akar

$$\text{Rendemen} = \frac{250}{400} \times 100\%$$

$$= 62,5\%$$

3. Batang

$$\text{Rendemen} = \frac{710}{1000} \times 100\%$$

$$= 71\%$$

4. Kulit

$$\text{Rendemen} = \frac{260}{500} \times 100\%$$

$$= 52\%$$

● Rendemen 3

1. Daun

$$\text{Rendemen} = \frac{400}{1000} \times 100\%$$

$$= 40\%$$

2. Akar

$$\text{Rendemen} = \frac{510}{800} \times 100\%$$

$$= 63,75\%$$

3. Batang

$$\text{Rendemen} = \frac{730}{1000} \times 100\%$$

$$= 73\%$$

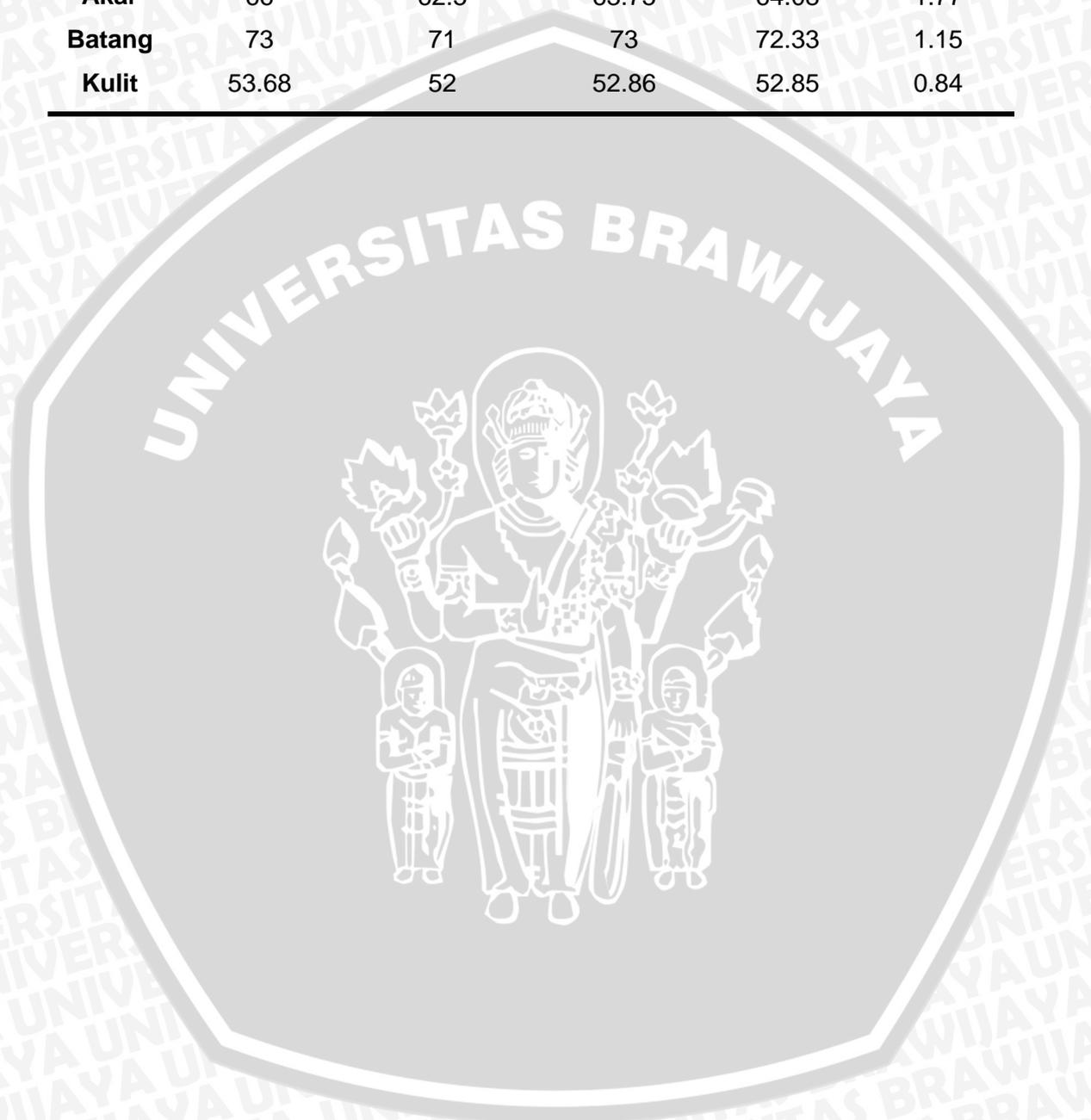
4. Kulit

$$\text{Rendemen} = \frac{370}{700} \times 100\%$$

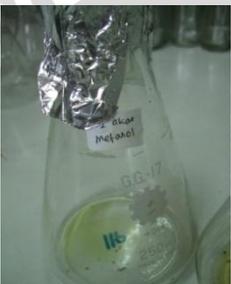
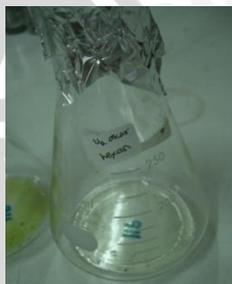
$$= 52,86\%$$

Lampiran 2. Rendemen Pengeringan Berbagai Bagian *E.agallocha*

Bagian	Rendemen (%)			Rata-Rata (%)	Standar Deviasi
	Rendemen 1	Rendemen 2	Rendemen 3		
Daun	41	43	40	41.33	1.53
Akar	66	62.5	63.75	64.08	1.77
Batang	73	71	73	72.33	1.15
Kulit	53.68	52	52.86	52.85	0.84



Lampiran 3. Warna Ekstrak *E. agallocha* dalam Berbagai Pelarut

Bagian <i>E. agallocha</i>	Pelarut			
	Metanol	Kloroform	Etil Asetat	Heksan
Daun				
Akar				
Batang				
Kulit				



Lampiran 4. Berat Ekstrak Berbagai Bagian *E. agallocha* (Rendemen Ekstrak 1)

Bagian <i>E. agallocha</i>	W_p (g)	W_{c0} (g)				W_{c1} (g)			
		Met.	Klor.	Etil asetat	Heksan	Met.	Klor.	Etil asetat	Heksan
Daun	25	46,18	38,09	47,35	53,21	47,44	38,83	47,57	53,31
Akar	10	44,91	48,81	44,13	45,96	45,02	48,42	44,15	45,99
Batang	25	42,25	38,9	39,03	40,23	42,41	38,96	39,1	40,29
Kulit	20	63,27	38,82	41,94	43,64	63,5	39,04	42,19	43,79

Keterangan : W_p = berat sampel yang di ekstrak

W_{c0} = berat cawan kosong

W_{c1} = berat cawan isi

$$\frac{(W_{c1} - W_{c0})}{W_p} \times 100 \%$$

Rendemen Ekstrak = $\frac{(W_{c1} - W_{c0})}{W_p} \times 100 \%$

1. Ekstrak Daun

● Metanol

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(47,44 - 46,18)}{25} \times 100 \%$$

$$= 5,04 \%$$

● Kloroform

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(38,83 - 38,09)}{25} \times 100 \%$$

$$= 2,96 \%$$

● Etil asetat

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(47,57 - 47,35)}{25} \times 100 \%$$

$$= 0,88 \%$$

● Heksan

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(53,31 - 53,21)}{25} \times 100 \%$$

$$= 0,4 \%$$

2. Ekstrak Akar

● Metanol

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(45,02 - 44,91)}{10} \times 100 \%$$

$$= 1,1 \%$$

● Kloroform

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(48,82 - 48,01)}{10} \times 100 \%$$

$$= 0,1 \%$$

● Etil asetat

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(44,15 - 44,13)}{10} \times 100 \%$$

$$= 0,2 \%$$

● Heksan

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(45,99 - 45,96)}{10} \times 100 \%$$

$$= 0,3 \%$$

3. Ekstrak Batang

● Metanol

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(42,41 - 42,25)}{25} \times 100 \%$$

$$= 0,64 \%$$

● Kloroform

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(38,96 - 38,9)}{25} \times 100 \%$$

$$= 0,24 \%$$

● Etil asetat

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(39,1 - 39,03)}{25} \times 100 \%$$

$$= 0,28 \%$$

● Heksan

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(40,29 - 40,23)}{25} \times 100 \%$$

$$= 0,24 \%$$

4. Ekstrak Kulit

● Metanol

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(63,5 - 63,27)}{20} \times 100 \%$$

$$= 1,15 \%$$

● Kloroform

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(39,04 - 38,82)}{20} \times 100 \%$$

$$= 1,1 \%$$

● Etil asetat

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(42,19 - 41,94)}{20} \times 100 \%$$

$$= 1,25 \%$$

● Heksan

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(43,79 - 43,64)}{20} \times 100 \%$$

$$= 0,75 \%$$

Lampiran 5. Berat Ekstrak Berbagai Bagian *E. agallocha* (Rendemen Ekstrak 2)

Bagian <i>E. agallocha</i>	W _p (g)	W _{c0} (g)				W _{c1} (g)			
		Met.	Klor.	Etil asetat	Heksan	Met.	Klor.	Etil asetat	Heksan
Daun	25	47,67	48,98	46,83	46,43	49	49,62	47,19	46,66
Akar	25	58,17	56,37	48,78	38,78	58,91	56,46	48,87	39,55
Batang	20	42,45	50,52	44,09	42,22	42,56	50,59	44,13	42,23
Kulit	25	45,01	45,69	42,7	31,68	45,75	45,89	43,02	31,7

Keterangan : W_p = berat sampel yang di ekstrak

W_{c0} = berat cawan kosong

W_{c1} = berat cawan isi

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(W_{c1} - W_{c0})}{W_p} \times 100 \%$$

1. Ekstrak Daun

● Metanol

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(49-47,67)}{25} \times 100 \% \\ &= 5,32 \% \end{aligned}$$

● Kloroform

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(49,62-48,98)}{25} \times 100 \% \\ &= 2,56 \% \end{aligned}$$

● Etil asetat

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(47,19-46,83)}{25} \times 100 \% \\ &= 1,44 \% \end{aligned}$$

● Heksan

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(46,66-46,43)}{25} \times 100 \% \\ &= 0,92 \% \end{aligned}$$

2. Ekstrak Akar

● Metanol

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(58,91-58,17)}{25} \times 100 \% \\ &= 0,96 \% \end{aligned}$$

● Kloroform

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(56,46-56,37)}{25} \times 100 \% \\ &= 0,36 \% \end{aligned}$$

● Etil asetat

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(48,87-48,78)}{25} \times 100 \% \\ &= 0,36 \% \end{aligned}$$

● Heksan

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(39,55-38,78)}{25} \times 100 \% \\ &= 2,68 \% \end{aligned}$$

3. Ekstrak Batang

● Metanol

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(42,56-42,45)}{20} \times 100 \% \\ &= 0,55 \% \end{aligned}$$

● Kloroform

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(50,59-50,52)}{20} \times 100 \% \\ &= 0,35 \% \end{aligned}$$

● Etil asetat

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(44,13-44,09)}{20} \times 100 \% \\ &= 0,2 \% \end{aligned}$$

● Heksan

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(42,23-42,22)}{20} \times 100 \% \\ &= 0,05 \% \end{aligned}$$

4. Ekstrak Kulit

● Metanol

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(45,75-45,01)}{25} \times 100 \% \\ &= 2,96 \% \end{aligned}$$

● Kloroform

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(45,89-45,69)}{25} \times 100 \% \\ &= 0,8 \% \end{aligned}$$

● Etil asetat

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(43,02-42,7)}{25} \times 100 \% \\ &= 1,28 \% \end{aligned}$$

● Heksan

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{(31,7-31,68)}{25} \times 100 \% \\ &= 0,08 \% \end{aligned}$$

Lampiran 6. Berat Ekstrak Berbagai Bagian *E. agallocha* (Rendemen Ekstrak 3)

Bagian <i>E. agallocha</i>	W_p (g)	W_{c0} (g)				W_{c1} (g)			
		Met.	Klor.	Etil asetat	Heksan	Met.	Klor.	Etil asetat	Heksan
Daun	25	38,83	38,76	41,07	38,82	40,17	39,44	41,34	38,94
Akar	25	37,85	41,48	47,7	42,87	38,11	41,67	47,72	43,09
Batang	25	39,96	39,09	44,49	53,21	40,11	39,29	44,79	53,22
Kulit	25	56,37	47,7	42,87	37,85	56,61	47,93	43,2	37,86

Keterangan : W_p = berat sampel yang di ekstrak
 W_{c0} = berat cawan kosong
 W_{c1} = berat cawan isi

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(W_{c1} - W_{c0})}{W_p} \times 100 \%$$

1. Ekstrak Daun

● Metanol

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(40,17 - 38,83)}{25} \times 100 \%$$

= 5,36 %

● Kloroform

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(39,44 - 38,76)}{25} \times 100 \%$$

= 2,72 %

● Etil asetat

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(41,34 - 41,07)}{25} \times 100 \%$$

= 1,08 %

● Heksan

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(38,94 - 38,82)}{25} \times 100 \%$$

= 0,48 %

2. Ekstrak Akar

● Metanol

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(38,11 - 37,85)}{25} \times 100 \%$$

= 1,04 %

● Kloroform

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(41,67 - 41,48)}{25} \times 100 \%$$

= 0,76 %

● Etil asetat

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(47,72 - 47,7)}{25} \times 100 \%$$

= 0,08 %

● Heksan

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(43,09 - 42,87)}{25} \times 100 \%$$

= 0,88 %

3. Ekstrak Batang

● Metanol

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(40,11 - 39,96)}{25} \times 100 \%$$

= 1,04 %

● Kloroform

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(39,29 - 39,09)}{25} \times 100 \%$$

= 0,076 %

● Etil asetat

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(44,79 - 44,49)}{25} \times 100 \%$$

= 1,12 %

● Heksan

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(53,22 - 53,21)}{25} \times 100 \%$$

= 0,04 %

4. Ekstrak Kulit

● Metanol

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(56,61 - 56,37)}{25} \times 100 \%$$

= 0,96 %

● Kloroform

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(47,93 - 47,7)}{25} \times 100 \%$$

= 0,92 %

● Etil asetat

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(43,2 - 42,87)}{25} \times 100 \%$$

= 1,32 %

● Heksan

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{(37,86 - 37,85)}{25} \times 100 \%$$

= 0,52 %

Lampiran 7. Rendemen Ekstrak *E. agallocha* dalam Berbagai Pelarut

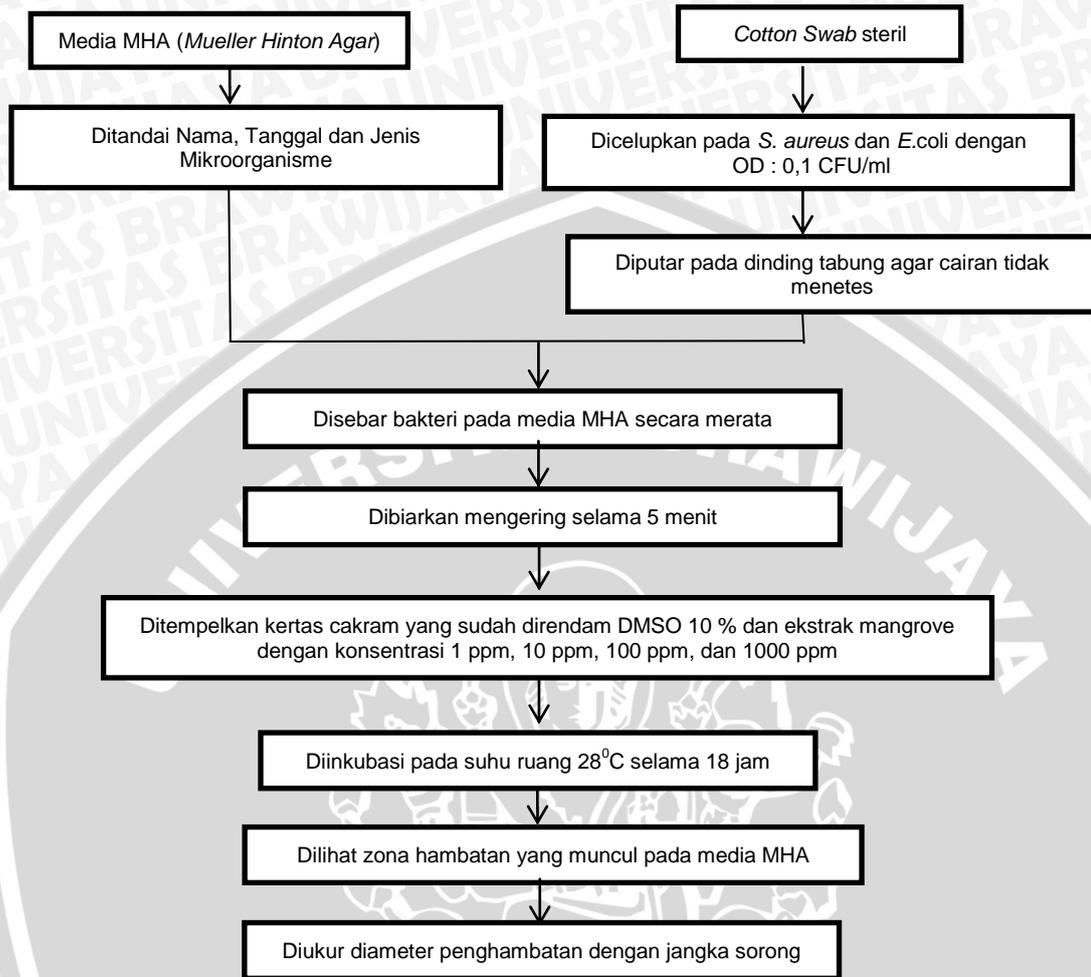
Bagian	Rendemen 1 (%)				Rendemen 2 (%)				Rendemen 3 (%)			
	Met.	Klor.	Etil asetat	Heksan	Met.	Klor.	Etil asetat	Heksan	Met.	Klor.	Etil asetat	Heksan
Daun	5.04	2.96	0.88	0.4	5.32	2.56	1.44	0.92	5.36	2.72	1.08	0.48
Akar	1.1	0.1	0.2	0.3	0.96	0.36	0.36	2.68	1.04	0.76	0.08	0.88
Batang	0.64	0.24	0.28	0.24	0.55	0.35	0.2	0.05	0.6	0.8	1.2	0.04
Kulit	1.15	1.1	1.25	0.75	2.96	0.8	1.28	0.08	0.96	0.92	1.32	0.052

Lampiran 8. Rata- Rata Rendemen Ekstrak *E. agallocha* dalam Berbagai Pelarut

Bagian	Rerata Rendemen Ekstraksi (%)				Standart Deviasi			
	Met.	Klor.	Etil asetat	Heksan	Met.	Klor.	Etil asetat	Heksan
Daun	5.24	2.75	1.13	0.6	0.17	0.20	0.28	0.28
Akar	1.03	0.41	0.21	1.29	0.07	0.33	0.14	1.24
Batang	0.60	0.46	0.56	0.11	0.05	0.30	0.56	0.11
Kulit	1.69	0.94	1.28	0.29	1.10	0.15	0.04	0.40

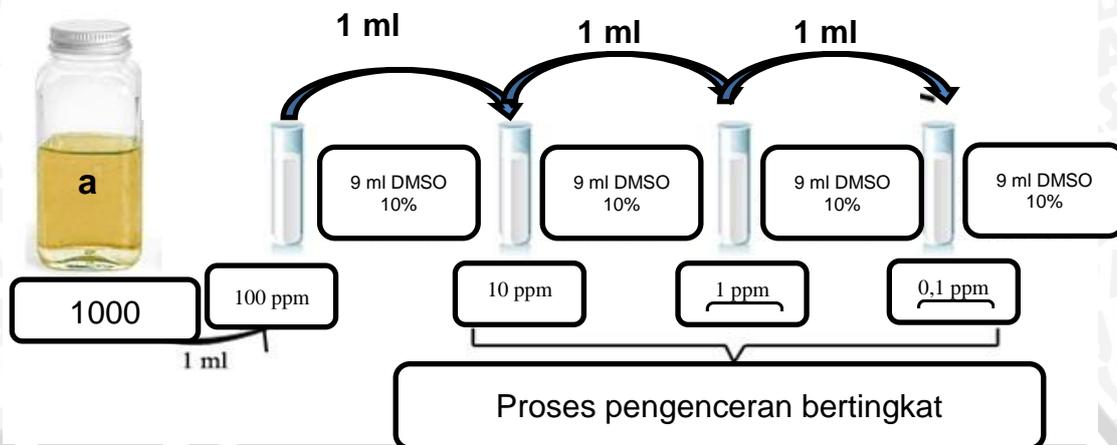


Lampiran 9. Skema Uji Cakram Metode Kirby-Bauer



Lampiran 10. Pengenceran Bahan Uji

$$\text{Konsentrasi ppm} = \frac{\mu\text{l}}{\text{ml}}$$



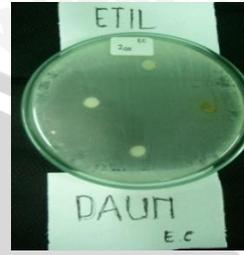
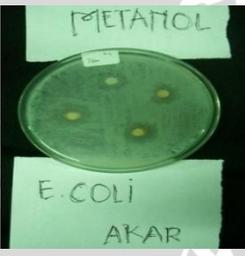
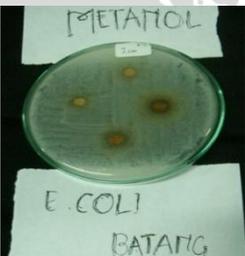
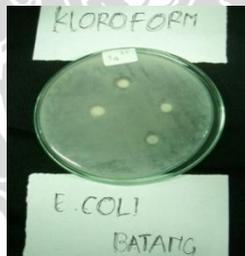
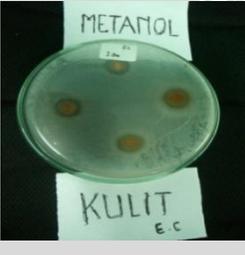
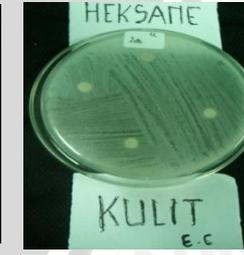
Keterangan :

a = stok 1000 ppm yang telah diencerkan oleh DMSO 10 %

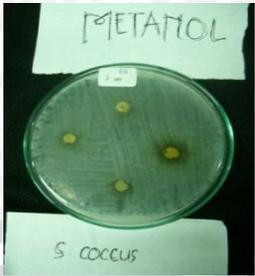
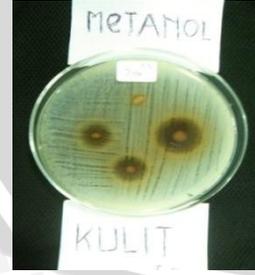
Lampiran 12. Zona Hambat *E. coli* dari Berbagai Bagian *E. agallocha* , Konsentrasi Ekstrak, dan Pelarut

Sampel	Pelarut	Konsentrasi Ekstrak 1 ppm				Rata-Rata	Konsentrasi Ekstrak 10 ppm				Rata-rata	Konsentrasi Ekstrak 100 ppm				Rata-rata	Konsentrasi Ekstrak 1000 ppm				Rata-rata
		Ulangan			Ulangan			ulangan				Ulangan									
		1	2	3	1		2	3	1	2		3	1	2	3						
Daun	Metanol	7.95	7	5.85	6.93	8.85	5.25	7.35	7.15	10	6.25	6	7.42	12	5.25	7.45	8.23				
	Kloroform	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	6.65	5.25	5.72	5.25	5.25	5.25	5.25	14.65	6.85	5.25	8.92				
	etil	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.75	5.25	5.42	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25				
	Heksane	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.55	5.35	5.25	5.25	5.75	5.42	5.25	7.25	5.85	6.12				
Akar	Metanol	13.85	9.95	5.25	9.68	14.25	5.25	10.45	9.98	16.95	5.25	9.65	10.62	19.85	5.25	14	13.03				
	Kloroform	13	5.25	5.25	7.83	5.25	5.25	5.25	5.25	14.65	5.25	5.25	8.38	19.95	5.25	5.25	10.15				
	etil	14.35	10.15	5.25	9.92	5.25	5.25	5.25	5.25	15.35	5.25	10.55	10.38	16.95	5.25	12.85	11.68				
	Heksane	11.45	5.25	5.25	7.32	14.65	5.25	5.25	8.38	16.25	5.25	9	10.17	18.95	5.25	5.25	9.82				
Batang	Metanol	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	10.45	5.25	6	7.23	10.15	5.25	6.15	7.18				
	Kloroform	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25				
	etil	5.25	5.25	5.25	5.25	9.75	7.15	5.25	7.38	11.75	7.45	5.25	8.15	16	5.25	8.35	9.87				
	Heksane	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25				
Kulit	Metanol	9	6	11.25	8.75	11.75	11.35	9.75	10.95	14.75	14.45	11.95	13.72	17.15	11.65	14.55	14.45				
	Kloroform	5.25	5.25	7.15	5.88	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	12	7.50	11	5.25	14.45	10.23				
	etil	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	17.95	5.25	5.25	9.48	16.65	5.25	5.25	9.05				
	Heksane	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	11.85	5.25	5.25	7.45	13	5.25	5.25	7.83				

Lampiran 13. Zona Hambat *E. coli* Ekstrak Metanol, Kloroform, Etil asetat, dan Heksan *E. agallocha*

Bagian Tanaman	Zona Hambat (mm)			
	Metanol	Kloroform	Etil Asetat	Heksan
Daun				
Akar				
Batang				
Kulit				

Lampiran 14. Zona Hambat *S. aureus* Ekstrak Metanol, Kloroform, Etil aasetat, dan Heksan *E. agallocha*

Bagian Tanaman	Zona Penghambatan (mm)			
	Metanol	Kloroform	Etil aasetat	Heksan
Daun				
Akar				
Batang				
Kulit				

Lampiran 15. Data Zona Hambat Ekstrak Kulit *E. agallocha* Fraksi Non Polar

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Zona Hambat (mm)			
		s.a.	s.a.	e.c.	e.c.
	3000	6.15	7.75	6.55	6.25
	2700	6.55	7	6.15	6.55
	2400	6.25	7.15	6	6
	2100	7.15	6.15	5.55	5.85
Ekstrak Metanol	1600	6	7.15	5.65	5.85
Kulit Fraksi Non Polar	1500	7.25	6.65	6.15	7.65
	750	6.65	5.85	7.25	6
	375	5.95	5.85	6.45	6.95
	300	6.65	6.45	6.45	6.25
	187.5	6.55	6	6.85	6.45
	30	5.65	6.95	5.95	6
	3	6.35	6.15	7.65	5.75

Keterangan : Perhitungan diameter zona hambat termasuk dengan diameter kertas cakram (5,25 mm)

Lampiran 16. Data Zona Hambat Ekstrak Kulit *E. agallocha* Fraksi Polar

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Zona Hambat (mm)			
		s.a.	s.a.	e.c.	e.c.
	12000	7.35	9.55	9	8
	10800	7	7	6.15	7
	9600	6.65	6.55	7.55	6.55
	8400	7.25	6.35	7.65	6.25
Ekstrak Metanol	7200	8.35	6.25	7.45	6.25
Kulit Fraksi Polar	6000	6.45	6.15	6.15	6.25
	3000	7.15	7.25	8.15	8.65
	1500	6	6.15	8.25	8.25
	1200	8.95	7.25	7	8
	750	6.25	7.55	8	7.45
	120	8.85	6.15	8	8.45
	12	9	6.15	6.65	8.95

Keterangan : Perhitungan diameter zona hambat termasuk dengan diameter kertas cakram (5,25 mm)

Lampiran 17. Zona Hambat Sub Fraksi Metanol : akuades (7 : 3) Ekstrak Kulit *E. agallocha*

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Zona Hambat (mm)				Sampel	Konsentrasi (ppm)	Zona Hambat (mm)				
		S.a.	S.a.	E.c.	E.c.			S.a.	S.a.	E.c.	E.c.	
SUB FRAKSI 1 Metanol : Akuades (7 :3)	10.800	6,5	5,6	5,1	5,1	SUB FRAKSI 2 Metanol : Akuades (7 :3)	9000	5,3	5,2	5,3	5,1	
	8000	5,1	5,1	5,1	5,1		7500	5,1	5,2	5,1	5,1	
	5000	5,2	5,1	5,1	5,1		6750	5,1	5,1	5,1	5,1	
	4000	7	5,1	5,1	5,1		5625	5,1	5,1	5,1	5,1	
	2500	5,2	5,2	5,1	5,1		4500	5,1	5,1	5,1	5,1	
	1250	5,6	6,9	5,1	5,1		2250	5,2	5,1	5,1	5,1	
	1000	5,6	5,3	5,2	5,1		1125	5,1	5,1	5,1	5,1	
	725	5,5	5,1	5,2	5,1		900	5,1	5,1	5,1	5,1	
	428	5,3	5,1	5,2	5,1		562,5	5,1	5,2	5,1	5,1	
	250	5,2	7,4	5,2	5,1		90	5,1	5,1	5,1	5,1	
100	6	5,6	5,1	5,1	9	5,1	5,1	5,1	5,1			
10	6	6	5,1	5,1	0,9	5,1	5,1	5,1	5,1			
DMSO 10%												
Pelarut	Konsentrasi	S.a.	E.c.	Pelarut	Konsentrasi	S.a.	E.c.					
SUB FRAKSI 1	10-1000	5,2	5,1	SUB FRAKSI 2	0,9-1125	5,1	5,1					
		5,2	5,1				5,1	5,1				
	1250-10.800	5,1	5,1			2250-9000	5,1	5,1				
		5,1	5,1				5,1	5,1				

Lampiran 13. Data Korelasi Spektra IR Beberapa Gugus Fungsi

	Tipe Vibrasi		Frekuensi (cm^{-1})	Panjang Gelombang (μ)	Intensitas
C - H	Alkana	(Rentangan)	3000-2850	3,33-3,51	s
	-CH ₃	(Bengkokan)	1450 dan 1375	6,90 dan 7,27	m
	-CH ₂	(Bengkokan)	1465	683	m
	Alkena	(Rentangan)	3100-3000	3,23-3,33	m
		(Serapan keluar bidang)	1000-650	10,0-15,3	s
	Aromatik	(Rentangan)	3159-3050	3,17-3,28	s
		(Serapan keluar bidang)	900-690	11,1-14,5	s
	Alkuna	(Rentangan)	± 330	$\pm 3,03$	s
C = C	Alken		1680-1600	5,95-6,25	m - w
	Aromatik		1600-1475	6,25 dan 6,78	m - w
C \equiv C	Alkuna		2250-2100	4,44-4,75	m - w
C = O	Aldehid		1740-1720	5,75-5,81	s
	Keton		1725-1705	5,80-5,87	s
	Asam Karboksilat		1725-1700	5,80-5,88	s
	Ester		1750-1730	5,71-5,78	s
	Amida		1670-1640	6,00-6,10	s
	Anhidrida		1810 dan 1760	5,52 dan 5,68	s
	Asam Klorida		1800	5,56	s
	Alkohol, Ester, Eter, Asam Karboksilat, Anhidrida		1300-1000	7,69-10,0	s
O - H	Alkohol, Fenol				
	Bebas		3650-3600	2,74-2,78	m
	Ikatan -H		3500-3200	2,86-3,13	m
	Asam Karboksilat		3400-2400	2,94-4,17	m
N - H	Amin primer dan Sekunder dan Amida	(Rentangan)	3500-3100		m - s
		(Bengkokan)	1640-1550	6,10-6,45	m - s
C - N	Amin		1350-1000	7,4-10,0	m - s
C = N	Imin dan Oksin		1690-1640	5,92-6,10	w - s
C \equiv N	Nitril		2260-2240	4,42-4,46	m
X = C = Y	Allen, Keten, Isosianat, Isotisianat		2270-1950	4,40-5,13	m - s
N = O	Nitro (R-NO ₂)		1550 dan 1350	6,45 dan 7,40	s
S - H	Merkaptan		2550	3,92	w
S = O	Sulfoksida		1050	9,52	s
	Sulfon, SulfonilKlorid, Sulfat, Sulfonamid		1375-1300 dan 1200-1140	7,27-7,69 dan 8,33-8,77	s
	Florida		1400-1000	7,14-10,0	s
	Klorida		800-600	12,5-16,7	s
	Bromid, Iodida		667	15,0	s

Keterangan : s (strong) = intensitas kuat; m (medium) = intensitas sedang; w (weak) = intensitas lemah
 Sumber: Sastrohamidjo (1992) dan Pavia et al. (2001).

Lampiran 19. Spektra Inframerah Sub Fraksi 1 Ekstrak *E. agallocha*

Bilangan Gelombang	Pada Pustaka (Sastrohamidjojo , 1992; Pavia et al., 2001)	Bentuk Pita	Kemungkinan Gugus Fungsi
3382,91	3650-3200	melebar	alkohol (O-H)
2362,64	-	tajam	-
2129,27	2270-1950	melebar	allen, keten, isosianat, dan isotisianat (X=C=Y)
	2250-2100	melebar	alkuna (C≡C)
2086,84	2270-1950	melebar	allen, keten, isosianat, dan isotisianat (X=C=Y)
	1750-1730	tajam	Ester (C=O)
1733,89	1740-1720	tajam	aldehid (C=O)
	1640-1550	melebar	bengkokan amin primer dan sekunder dan amida (N-H)
1629,74	1680-1600	melebar	alken (C=C)
	1506,30	-	tajam
1454,23	-	tajam	-CH ₂ (melingkar)
1369,37	1400-1000	tajam	florid (C-X)
	1375-1300	tajam	sulfon, sulfonil, klorid, sulfat, dan sulfanid (S=O)
1112,85	1400-1000	melebar	florid (C-X)
	1350-1000	melebar	amine (C-N)
	1300-1000	melebar	alkohol, eter, ester, asam karboksilat, dan anhidrat (C-O)
997,13	1000-650	tajam	alken (serapan keluar bidang) (C-H)
823,55	1000-650	melebar	alken (serapan keluar bidang) (C-H)
677,32	785-540	tajam	klorid (C-X)
	1000-650	tajam	alken (serapan keluar bidang) (C-H)
619,11	<667	tajam	Bromida, dan iodida (C-X)
	785-540	tajam	klorid (C-X)
540,03	<667	tajam	Bromida, dan iodida (C-X)
	785-540	tajam	klorid (C-X)
474,46	<667	tajam	Bromida, dan iodida (C-X)