

**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK KASAR DAUN MANGROVE HITAM  
(*Rhizophora mucronata* Lamk) TERHADAP BAKTERI *Vibrio*  
*parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae***

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

Oleh :  
**BERLIAN SEPTYARA. B**  
**NIM. 105080306111001**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**



**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK KASAR DAUN MANGROVE HITAM  
(*Rhizophora mucronata* Lamk) TERHADAP BAKTERI *Vibrio*  
*parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae***

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

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan  
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**

Oleh :  
**BERLIAN SEPTYARA. B**  
**NIM. 105080306111001**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

**SKRIPSI**  
**UJI DAYA Hambat EKSTRAK DAUN MANGROVE HITAM**  
**(*Rhizophora mucronata* Lamk) TERHADAP BAKTERI *Vibrio***  
***parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae***

Oleh :  
**BERLIAN SEPTYARA. B**  
NIM. 10508030611001

Telah dipertahankan di depan penguji  
pada tanggal 16 Februari 2016  
dan telah dinyatakan memenuhi syarat  
SK Dekan no. : .....  
Tanggal : .....

Dosen Penguji I

**Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP**  
NIP. 19581231 198601 2 002  
Tanggal : 21 MAR 2016

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I

**Ir. Darius M. Biotech**  
NIP. 19500531 198103 1 003  
Tanggal : 1 MAR 2016

Dosen Pembimbing II

**Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS**  
NIP. 19640726 198903 2 004  
Tanggal : 1 MAR 2016



Mengetahui,  
Ketua Jurusan MSP

**Dr. Ir. Arping Wilang Ekawati, MS**  
NIP. 19620805 198603 2 001  
Tanggal: 21 MAR 2016



## 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 penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 16 Februari 2016

Berlian Septyara. B

NIM. 105080306111001



## UCAPAN TERIMAKASIH

Dengan penuh rasa syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, Yesus Kristus, penulis akhirnya dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini dengan segala keterbatasan dan kelebihannya. Penulis menyadari dalam penyusunan laporan Skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengungkapkan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

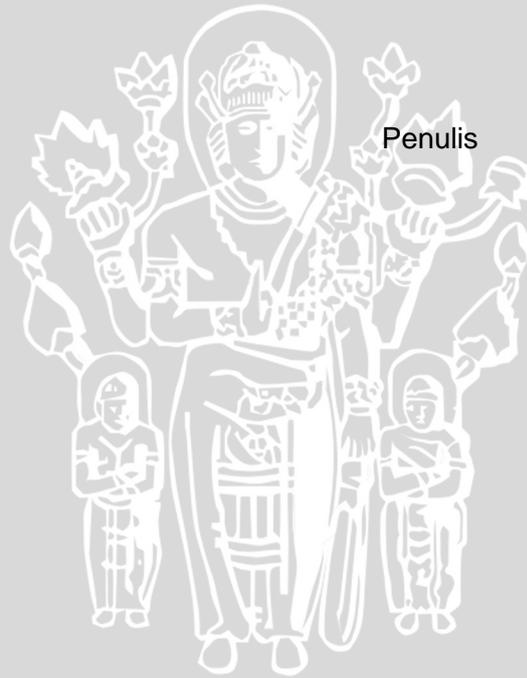
1. Keluarga terkasih penulis, kedua orang tua Bapak Matiar Butar-butar dan ibu Lilis Setyawatie Br. Sitorus, serta abang Nofanda Prayudha Butar-Butar, SH yang tidak pernah berhenti memberi dukungan, semangat, motivasi dan kasih sayang yang luar biasa untuk penulis. Semoga pengorbanan yang telah kalian berikan bisa menjadikan penulis menjadi seorang Sarjana yang sukses kelak.
2. Bapak Ir. Darius M. Biotech selaku dosen pembimbing 1 yang telah banyak memberikan pengarahan dan bimbingan sejak pembuatan usulan skripsi sampai terselesaikannya laporan skripsi ini.
3. Ibu Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS selaku dosen pembimbing 2 yang telah banyak memberikan pengarahan dan bimbingan dengan penuh kesabaran serta dukungan moril dan materil sejak pembuatan usulan skripsi sampai terselesaikannya laporan skripsi ini.
4. Ibu Dr. Ir. Titik Dwi S, MP selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan saran dalam penyelesaian laporan skripsi ini.
5. Keluarga Besar PMK Immanuel dan KMKK yang selalu memberi dukungan dalam doa, serta semangat yang tidak pernah henti. Semoga kekeluargaan ini akan selalu terjaga.
6. Sahabat-sahabat tercinta THP angkatan 2010, yang selalu setia memberi motivasi, semangat, doa serta keceriaan. Rasa berhutang budi penulis begitu besar dan tidak akan terlupakan, semoga kelak kita lebih bisa menjadi orang berguna bagi keluarga, masyarakat dan negara.
7. Anak-anak Kost Kertosentono 23 (Mbak Meta, Mbok Rara, Bundo Cicut, Kaka Luth, Mace Cherly), meskipun jarak memisahkan berharap kita selalu bisa bersahabat baik, dan bisa menjadi orang yang berhasil dimasa depan.
8. Ibu Iwin dan Mbak Mega selaku Laboran Laboratorium Mikrobiologi, yang selalu membantu dan memudahkan dalam proses penelitian.

9. Yohanes Kristopher Bangun yang selalu memberikan semangat dan motivasi kepada penulis. Terimakasih untuk selalu ada buat penulis.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan, baik secara langsung maupun tidak langsung.

Akhirnya, kesempurnaan hanya milik TUHAN dan kekurangan hanya milik kita sebagai manusia, sehingga penulis menyadari laporan Skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat dalam memberikan informasi bagi pihak yang membutuhkan.

Malang, 16 Februari 2016

Penulis



## RINGKASAN

**Berlian Septyara. B (NIM 105080306111001).** Skripsi tentang Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Mangrove Hitam (*Rhizophora mucronata* Lamk) Terhadap Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae* (di bawah bimbingan **Ir. Darius, M. Biotech** dan **Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS**)

Antibiotik dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme patogen. Seperti halnya bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae* yang menyebabkan timbulnya penyakit pada ikan. Namun, pemberian antibiotik secara berkala akan memberikan efek samping. Salah satu sumber bahan alami yang memiliki aktivitas antimikroba adalah daun *Rhizophora mucronata* Lamk. Kandungan senyawa yang terdapat dalam daun *Rhizophora mucronata* Lamk dapat menghambat pertumbuhan bakteri, karena mengandung senyawa tanin, terpenoid/steroid, flavonoid, alkaloid, dan saponin.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak *R. mucronata* Lamk terbaik untuk menghambat *V. parahaemolyticus* dan *S. agalactiae* serta mendapatkan senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung dalam *R. mucronata* Lamk. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Biologi Universitas Negeri Islam Malang, serta Laboratorium Kimia PUSPITEK LIPI Serpong pada Agustus 2014 sampai Juni 2015.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Dalam penelitian ini terdapat 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan meliputi ekstraksi daun *R. mucronata* Lamk dengan menggunakan pelarut metanol dengan cara maserasi, uji Fitokimia, dan uji daya hambat ekstrak kasar. Penelitian utama meliputi Kromatografi kolom, KLT, uji daya hambat fraksi-fraksi, uji spektrofotometer UV-Vis dan uji LC-MS. Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan 2 faktorial dengan 2 ulangan secara duplo.

Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi dan fraksi *R. mucronata* Lamk yang memberikan daya hambat terbaik terhadap *V. parahaemolyticus* dan *S. agalactiae* adalah Fraksi A dengan konsentrasi 20.000 ppm, dengan zona hambat rata-rata yang dihasilkan yaitu  $0,67 \pm 0,02$  mm dan  $1,73 \pm 0,17$ . Hasil identifikasi senyawa dugaan dengan spektrofotometri UV-Vis menunjukkan tiga puncak serapan yaitu  $\lambda$  209 nm yang diduga merupakan golongan saponin steroid,  $\lambda$  415 nm yang merupakan flavonoid, dan  $\lambda$  465 nm yang merupakan golongan terpenoid. Hasil Identifikasi senyawa dengan menggunakan LC-MS pada Rt. 1.3 diduga terdapat senyawa cevine dengan berat molekul 509 m/z merupakan golongan saponin steroid, santonin sebesar 246 m/z yang merupakan golongan terpenoid, dan quercetin sebesar 302 m/z yang merupakan golongan flavonoid. Pada Rt. 1.6 ditemukan senyawa dugaan dengan berat massa sebesar 578 m/z diduga senyawa Procyanidin B1 dan Rhofolin yang merupakan senyawa golongan flavonoid. Pada Rt. 2.8 diduga senyawa yang ditemukan adalah chrysin dengan berat massa 254 m/z yang merupakan senyawa flavonoid, dan pada Rt 3.5 dengan berat massa 740m/z ditemukan senyawa dugaan yaitu Robinin yang juga merupakan golongan

flavonoid. Dengan demikian senyawa yang ditemukan pada fraksi A daun *R. mucronata* Lamk adalah golongan saponin, flavonoid dan terpenoid.

Disarankan untuk menggunakan senyawa isolat murni dari daun *Rhizophora mucronata* Lamk sehingga dapat benar-benar teridentifikasi senyawa bioaktif apa saja yang terkandung dalam daun *Rhizophora mucronata* Lamk yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba. Disarankan pula untuk dilakukan penelitian dengan menggunakan uji FTIR dan uji NMR sehingga senyawa bioaktif yang ditemukan bisa mendapatkan hasil yang lebih valid.



## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kita panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya lah sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan Skripsi dengan judul “Uji Daya Hambat ekstrak Daun Mangrove Hitam *Rhizophora mucronata* Lamk Terhadap Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae*”. Dalam penyusunannya, penulis banyak mengambil literatur-literatur yang bersumber dari *text book*, artikel, jurnal, skripsi maupun prosiding seminar untuk dijadikan tinjauan pustaka yang dapat mendukung pembuatan laporan Skripsi tersebut. Selain itu, penulis juga memperoleh banyak bantuan dari berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung, sehingga segala informasi, ilmu dan materi terkait bahasan laporan Skripsi dapat dengan mudah diperoleh.

Penulis menyadari dalam laporan Skripsi ini tentunya masih banyak terdapat kekurangan dan kesalahan, baik dari materi maupun teknik penyajian mengingat kurangnya pengetahuan dan pengalaman penulis. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca pada umumnya, terutama para Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Malang, 16  
Februari 2016

Penyusun

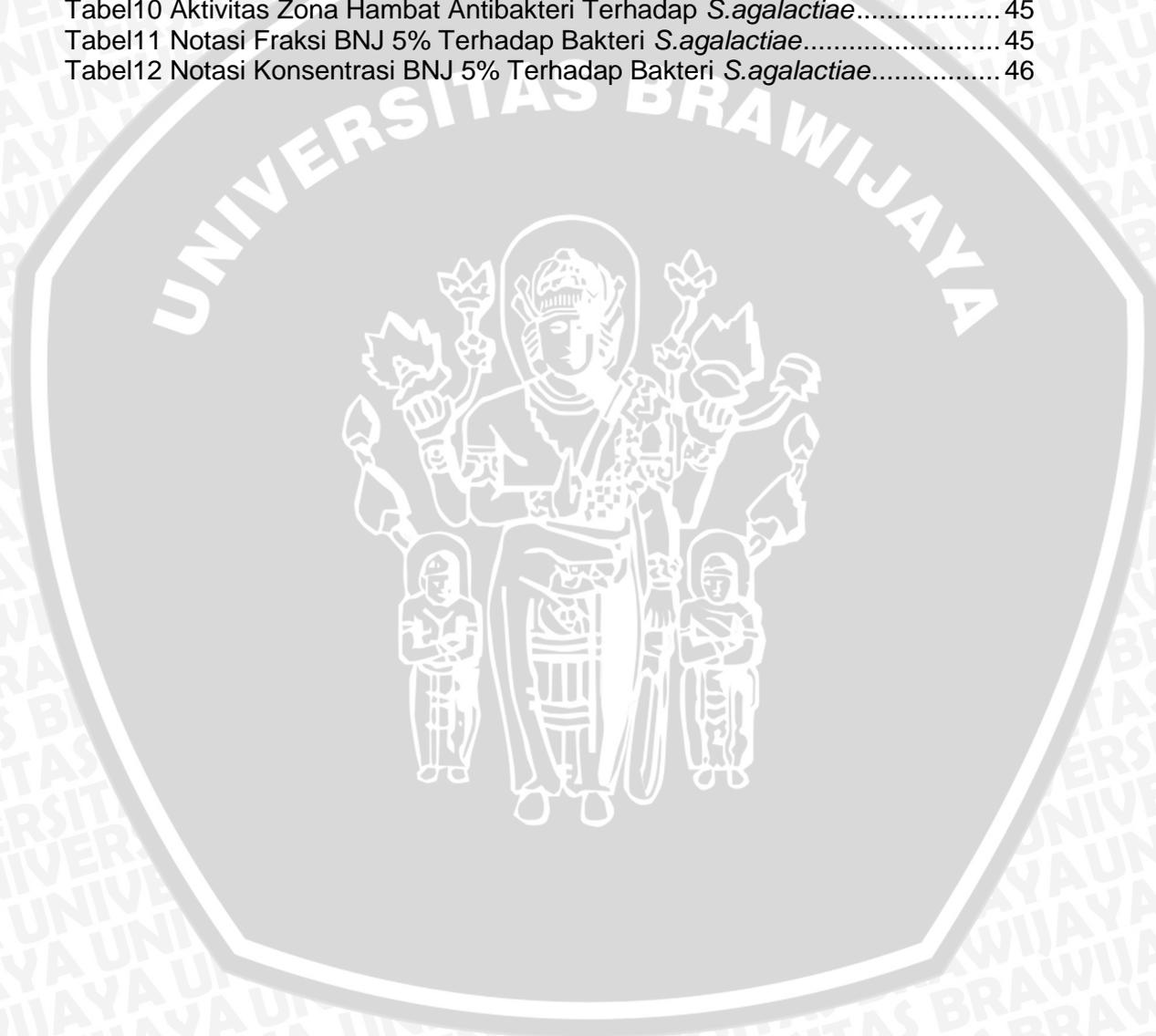
## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	iii
<b>UCAPAN TERIMAKASIH</b> .....	iv
<b>RINGKASAN</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>1. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Hipotesis .....	4
1.5 Kegunaan Penelitian .....	4
1.6 Tempat dan Waktu .....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Mangrove <i>Rhizophora mucronata</i> Lamk.....	5
2.2 Ekstraksi.....	6
2.3 Pelarut.....	8
2.3.1 Metanol .....	8
2.3.2 DMSO .....	9
2.3.3 Amoksisilin .....	9
2.4 Senyawa Bioaktif Daun Mangrove <i>R.mucronata</i> Lamk.....	10
2.4.1 Tanin .....	11
2.4.2 Alkaloid.....	12
2.3.3 Flavonoid.....	12
2.3.4 Triterpenoid / Steroid.....	13
2.3.5 Saponin.....	14
2.5 Bakteri Uji.....	15
2.5.1 <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	15
2.5.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	17
2.6 Antibakteri .....	18
2.6.1 Mekanisme Daya Hambat Antibakteri.....	19
2.6.2 Uji Seseitivitas Antibakteri (Uji Cakram).....	19
2.7 Identifikasi Senyawa Bioaktif .....	20
2.7.1 Kromatografi Kolom.....	20
2.7.2 Spektrofotometri UV-Vis .....	21
2.7.3 LC-MS .....	22
<b>3. METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Materi Penelitian.....	24
3.1.1 Bahan Penelitian .....	24
3.1.2 Alat Penelitian .....	24
3.2 Metode Penelitian.....	25

3.3	Prosedur Penelitian .....	26
3.3.1	Maserasi .....	27
3.3.2	Sterilisasi Alat .....	28
3.3.3	Pembuatan Media NA dan TSA .....	28
3.3.4	Regenerasi Bakteri .....	29
3.3.5	Uji Fitokimia .....	29
3.3.6	Uji Cakram .....	31
3.4	Penelitian Inti .....	31
3.5	Prosedur Penelitian Inti .....	33
3.5.1	Kromatografi Kolom .....	33
3.5.2	Uji Daya Hambat Fraksi Daun <i>R.mucronata</i> Lamk .....	35
3.5.3	Identifikasi Senyawa Antibakteri .....	35
3.6	Parameter Uji .....	36
3.7	Analisis Data .....	36
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1	Penelitian Pendahuluan .....	37
4.1.1	Uji Fitokimia .....	37
4.1.2	Uji daya Hambat dengan Berbagai Pelarut .....	39
4.2	Penelitian Utama .....	41
4.2.1	Isolasi Ekstrak Daun <i>R.mucronata</i> Lamk dengan Kromatografi Kolom .....	41
4.2.2	Uji Aktivitas Antibakteri .....	43
4.2.2.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	43
4.2.2.2	<i>Streptococcus agalactiae</i> .....	45
4.2.3	Identifikasi Senyawa Antibakteri Fraksi A .....	49
4.2.4	Mekanisme Hambat Bakteri <i>Vibrio parahaemolyticus</i> dan <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	55
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1	Kesimpulan .....	58
5.2	Saran .....	58
	<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	59
	<b>LAMPIRAN</b> .....	67

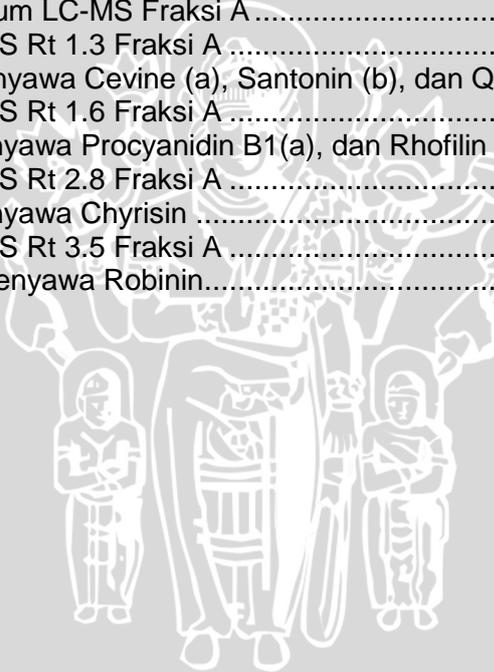
DAFTAR TABEL

Tabel 1 Kandungan Kimia Dan Mineral *Rhizophora sp*..... 10  
 Tabel 2 Interval Perkiraan Warna-arna Cahaya Tamapak ..... 22  
 Tabel 3 Aktivitas Antibakteri Berdasarkan Metode David Stout..... 36  
 Tabel 4 Hasil Uji Fitokimia *R.mucronata* Lamk..... 38  
 Tabel 5 Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar *R.mucronata* Lamk ..... 40  
 Tabel 6 Fraksi-Fraksi Hasil Pemisahan Senyawa Daun *R.mucronata* Lamk ..... 42  
 Tabel 7 Aktivitas Zona Hambat Antibakteri Terhadap *V.parahaemolyticus* ..... 43  
 Tabel 8 Notasi Fraksi BNJ 5% Terhadap Bakteri *V.parahaemolyticus* ..... 44  
 Tabel 9 Notasi Konsentrasi BNJ 5% Terhadap Bakteri *V.parahaemolyticus* ..... 44  
 Tabel10 Aktivitas Zona Hambat Antibakteri Terhadap *S.agalactiae*..... 45  
 Tabel11 Notasi Fraksi BNJ 5% Terhadap Bakteri *S.agalactiae*..... 45  
 Tabel12 Notasi Konsentrasi BNJ 5% Terhadap Bakteri *S.agalactiae*..... 46



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	<i>Rhizopora mucronata</i> Lamk .....	6
Gambar 2	Struktur Bangun DMSO .....	9
Gambar 3	Struktur Tanin .....	11
Gambar 4	Struktur Alkaloid .....	12
Gambar 5	Struktur Flavonoid .....	13
Gambar 6	Struktur Terpenoid .....	14
Gambar 7	Struktur Saponin .....	15
Gambar 8	<i>Streptococcus agalactiae</i> .....	16
Gambar 9	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	18
Gambar10	Diagram Alir Penelitian Pendahuluan .....	27
Gambar11	Skema Kerja Penelitian Inti .....	32
Gambar12	Prinsip Kerja Kromatografi Kolom .....	34
Gambar13	Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun <i>R.mucronata</i> Lamk .....	41
Gambar14	Kromatografi Kolom Ekstrak Daun Mangrove <i>R.mucronata</i> Lamk .....	42
Gambar15	Hasil Zona Hambat Fraksi A Terhadap Bakteri Uji .....	48
Gambar16	Pola UV-Vis Fraksi A .....	49
Gambar17	Pola Spektrum LC-MS Fraksi A .....	50
Gambar18	Spektrum MS Rt 1.3 Fraksi A .....	51
Gambar 19	Struktur Senyawa Cevine (a), Santonin (b), dan Quercetin (c) .....	52
Gambar20	Spektrum MS Rt 1.6 Fraksi A .....	52
Gambar21	Struktur Senyawa Procyanidin B1(a), dan Rhofilin (b) .....	53
Gambar22	Spektrum MS Rt 2.8 Fraksi A .....	53
Gambar23	Struktur Senyawa Chyrisin .....	54
Gambar24	Spektrum MS Rt 3.5 Fraksi A .....	54
Gambar25	Spektrum Senyawa Robinin .....	55



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Prosedur Pembuatan DMSO10% dan Konsentrasi .....	67
Lampiran 2	Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	68
Lampiran 3	Hasil Uji Fitokimia Daun <i>R. mucronata</i> Lamk .....	69
Lampiran 4	Hasil Zona Hambat .....	71
Lampiran 5	Analisa Keragaman Anova .....	72
Lampiran 6	Hasil Analisa Spektrofotometer UV-Vis .....	76
Lampiran 7	Hasil Analisa LC-MS .....	77
Lampiran 8	Dokumentasi Penelitian .....	87
Lampiran 9	Identifikasi Senyawa Bioaktif daun <i>R.mucronata</i> Lamk Fraksi A ....	90

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Berbagai masalah yang seringkali ditemui oleh pembudidaya ikan adalah timbulnya penyakit. Banyak faktor yang menyebabkan timbulnya penyakit antara lain: lingkungan yang buruk, virus dan bakteri. Penularan penyakit yang disebabkan oleh bakteri mengakibatkan kerugian yang cukup besar dan terkadang menyebabkan proses budidaya berhenti (Feliatra, 1999). Beberapa jenis bakteri yang seringkali menyebabkan penularan penyakit adalah *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae*. Menurut Faikoh *et al.*,(2013), spesies bakteri *Vibrio* spp merupakan bakteri yang biasanya menyerang ikan atau udang, salah satu jenisnya adalah *V.parahaemolitycus*. Sedangkan *S.agalactiae* adalah salah satu jenis bakteri yang menyerang ikan, seperti ikan nila (Hardi *et al.*,2011). Oleh karena itu diperlukan zat antibiotik untuk mengatasi masalah tersebut.

Antibiotik dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme patogen. Akan tetapi, penggunaan antibiotik ini memberikan efek samping baik bagi bakteri patogen itu sendiri ataupun ikan budidaya, karena sifatnya yang tidak ramah lingkungan. Pemberian antibiotik secara terus menerus dapat mengakibatkan bakteri patogen menjadi resisten dan menjadi lebih berbahaya (Trianto *et al.*, 2004). Selain itu, residu dari antibiotik dapat mencemari lingkungan perairan yang dapat menyebabkan kualitas air menjadi turun (Rinawati, 2011). Salah satu alternatif yang digunakan untuk mengatasi permasalahan serangan penyakit adalah dengan mengganti zat antibiotik dengan bahan alami yang dapat dijadikan sebagai senyawa antibakteri.

Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri adalah mangrove. Selain itu jumlahnya juga sangat melimpah (Hery, 2004).

*Rhizophora mucronata* Lamk termasuk kedalam famili *Rhizophoraceae*, sering disebut bakau hitam (Saparinto,2007). Menurut penelitian Ningsih *et al.*, (2006), terdapat aktivitas antimikroba pada tanaman *Rhizophora mucronata* Lamk. Hal ini disebabkan adanya senyawa bioaktif yang terkandung dalam setiap bagian tanaman tersebut, salah satunya bagian daun. Dalam penelitian Yasmon (2000), disebutkan bahwa ekstrak daun lebih efektif dibandingkan buah dan kulit batangnya. Hal ini didukung oleh pernyataan Priyanto (2012) dalam penelitiannya yang menyatakan bahwa daun *Rhizophora mucronata* Lamk memiliki kandungan senyawa tanin, terpenoid/steroid, flavonoid dan alkaloid. Ditambahkan oleh penelitian Correl *et al.*,(1955), daun mangrove juga mengandung senyawa fenolik dan saponin.

Kandungan senyawa bioaktif dalam daun mangrove yang telah diketahui dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Trianto *et al.*, (2004), menunjukkan bahwa hasil pengujian senyawa antibakteri daun mangrove jenis *Aegiceras corniculatum* dengan konsentrasi 5000, 10.000, dan 20.000 ppm mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus*, dengan zona hambat 0,275-0,55mm. Dari hasil zona hambat yang terbentuk, respon hambat nya masih tergolong sangat lemah. Sehingga, dalam penelitian ini menggunakan daun *Rhizophora mucronata* Lamk sebagai sampel yang akan diuji daya hambat bakterinya.

Meskipun penelitian tentang antibakteri dari bahan alami daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk telah dilakukan, namun ekstrak daun *R.mucronata* Lamk sebagai senyawa antibakteri terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae* masih sedikit data. Oleh sebab itu, masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan daun *R.mucronata* Lamk sebagai antibakteri alami pada ikan budidaya. Penelitian ini bertujuan untuk meneliti pemanfaatan daun *R.mucronata* Lamk sebagai antibakteri alami terhadap *Vibrio*

*parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae* dengan konsentrasi ekstrak terbaik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae* adalah beberapa jenis dari bakteri yang berbahaya bagi jenis ikan maupun udang. Bakteri *Vibrio parahamolyticus* adalah bakteri yang menyerang udang. Menurut Felix *et al.*, (2011), bakteri ini dapat menyebabkan kematian udang dalam waktu yang cepat dan dalam jumlah yang besar. Umumnya udang yang terserang ditandai dengan gejala klinis seperti terlihat lemah, berwarna merah gelap atau pucat, antena dan kaki renang berwarna merah. Sedangkan, bakteri *Streptococcus agalctiae* menyebabkan penyakit pada ikan yang menyerang otak, mata dan ginjal ikan (Hardi *et al.*, (2011)).

Ekstrak bakau dari spesies tertentu telah terbukti memiliki aktifitas terhadap manusia, hewan dan patogen (Bandaryake, 2002). Salah satu jenis nya yaitu *Rhizophora mucronata*, sehingga dapat digunakan sebagai antibakteri alami terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae*. Bagian yang digunakan untuk di ekstrak adalah daun *Rhizophora mucronata*. Menurut Alfaro (2010)), bahwa daun dari *Rhizophora sp* telah digunakan sebagai antiseptik.

Permasalahan yang timbul dari uraian diatas adalah:

- Pada konsentrasi berapa ekstrak daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk dapat menghasilkan antibakteri terbaik terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini dilakukan adalah:

- Mendapatkan konsentrasi ekstrak daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk yang dapat menghasilkan daya hambat terbaik terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae*.

### 1.4 Hipotesis

Hipotesis yang menjadi dasar pada penelitian ini adalah:

- Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae* semakin baik.

### 1.5 Kegunaan penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan tentang kandungan senyawa bioaktif dan aktivitas antibakteri pada ekstrak daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk.

### 1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Biologi UIN Malang, Laboratorium Kimia UM Malang dan pengujian LC-MS di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong pada Agustus 2014 –Juni 2015.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk

*Rhizophora mucronata* sering disebut bakau hitam, yang dapat tumbuh mencapai 25 meter. Tanaman bakau hitam ini tumbuh baik pada suhu berkisar 26 – 28°C, dengan intensitas cahaya 75% dapat mempercepat pertumbuhan (tinggi) tanaman ini (Saparinto, 2007). *Rhizophora mucronata* Lamk memiliki kualitas batang kasar, berwarna abu – abu kehitaman. Bentuk daun yang elip sampai bulat panjang, ujung daun meruncing dengan duri, permukaan bawah tulang daun berwarna kehijauan berbintik – bintik hitam tidak merata, dengan ukuran daun sekitar 10 -16cm. Bunga *Rhizophora mucronata* Lamk tersusun atas 4 – 8 bunga tunggal, 4 kelopak yang berwarna kuning gading, 4 mahkota bunga yang berambut pada bagian pinggir dan belakang, memiliki 8 benang sari, dengan panjang tangkai putik 1 – 2 mm yang ujungnya terbelah dua. Memiliki buah yang berbentuk seperti jambu air yang berwarna hijau kekuningan (Sudarmadji, 2004). Ditambahkan oleh Keeley (2007)., buah *Rhizophora mucronata* Lamk berbentuk propagule yaitu bentuk panjang dengan tangkai. Memiliki bentuk akar tongkat yang menggantung dari batang dan dahan. Tanaman ini banyak ditemui di sepanjang sungai ke muara yang banyak tergenang air pasang surut. Tanah berlumpur dalam dan sedikit berpasir (Sudarmadji, 2004).

Mangrove secara umum digolongkan menjadi 3 golongan family flora mayor, minor dan asosiasi mangrove. *Rhizophora mucronata* Lamk termasuk kedalam flora mayor. Flora mayor (merupakan vegetasi dominan) memperlihatkan morfologi, seperti perakaran udara dan fisiologi khusus untuk mengeluarkan garam agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan. Tanaman ini mengontrol garam dengan menggugurkan daun tua yang

mengandung garam terakumulasi dengan cara melakukan tekanan osmotik akar dan memiliki struktur stomata khusus untuk mengurangi penguapan. *Rhizophora mucronata* juga memiliki akar tongkat atau peyangga yang mempunyai lentisel yang berfungsi sebagai pertukaran gas dan menyimpan udara untuk pernafasan selama terjadi penggenangan. Tanaman ini memiliki tipe buah vivipar yang masih tumbuh pada tanaman induknya (Kustanti, 2011). Klasifikasi *Rhizophora mucronata* Lamk menurut Plantamor (2012), adalah:

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)  
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan Biji)  
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan Berbunga)  
 Kelas : Magnoliopsida (berkeping Dua / Dikotil)  
 Sub Kelas : Rosidae  
 Ordo : Myrtales  
 Famili : *Rhizophoraceae*  
 Genus : *Rhizophora*  
 Spesies : *Rhizophora mucronata* Lamk



**Gambar 1. *Rhizophora mucronata* Lamk**  
 (Sumber: Welly et al.,(2010))

## 2.2 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses selektif yang dilakukan untuk mengambil zat – zat yang terkandung dalam suatu campuran dengan

menggunakan pelarut. Metode ekstraksi sederhana untuk memperoleh kandungan senyawa organik dari jaringan tumbuhan adalah dengan cara maserasi (Rahayu, 2012). Maserasi adalah penarikan senyawa bioaktif pada sampel dengan cara merendam dengan pelarut.

Tujuan ekstraksi adalah untuk memisahkan bahan padat dan bahan cair suatu zat dengan bantuan pelarut. Ekstraksi dapat memisahkan campuran senyawa dengan berbagai sifat kimia yang berbeda. Ekstraksi bahan alam umumnya dilakukan untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat kedalam pelarut, perpindahan akan dimulai pada lapisan antar muka kemudian berdifusi kedalam pelarut. Faktor – faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi ialah tipe persiapan sampel, waktu ekstraksi, kuantitas pelarut, suhu pelarut dan tipe pelarut (Tohir, 2010). Menurut Markham (1988), menyatakan bahwa komponen yang terbawa pada saat proses ekstraksi ialah komponen yang berpolaritas sesuai dengan pelarutnya, sehingga jenis pelarut yang digunakan dapat mempengaruhi jumlah rendemen yang dihasilkan.

Proses ekstraksi terdiri dari beberapa tahapan, yaitu penghancuran bahan, penimbangan, perendaman dengan pelarut, penyaringan, dan tahap pemisahan (Oktavianus, 2013). Menurut Khopkar (2003), tahapan pemisahan terdiri dari tahap penyaringan dan evaporasi. Penyaringan dilakukan untuk memisahkan sampel dengan pelarut yang telah mengandung senyawa bioaktif. Untuk memisahkan pelarut dengan senyawa bioaktif yang terikat dengan pelarutnya maka dilakukan proses evaporasi, sehingga pelarutnya akan menguap dan diperoleh senyawa hasil ekstraksi yang dihasilkan. Evaporasi berarti pemekatan sampel dengan cara menguapkan pelarut menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu dan kecepatan tertentu.

### 2.3 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan berhasilnya proses ekstraksi. Dalam pemilihan pelarut, pelarut harus melarutkan ekstrak yang diinginkan saja tanpa melarutkan material lainnya, mempunyai kelarutan yang besar, dan titik didih antar zat yang diekstrak (Guenther, 1987). Jumlah pelarut berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi, tetapi jumlah yang berlebihan juga tidak akan mengekstrak lebih banyak. Tetapi, dalam jumlah tertentu pelarut dapat bekerja optimal (Susanto, 1999).

Proses yang paling menentukan dalam proses ekstraksi adalah pemilihan pelarut. Hal – hal yang harus diperhatikan dalam memilih pelarut ialah selektivitas (faktor pemisah), sifat pelarut, kemampuan mengesktraksi, tidak bersifat racun, mudah diuapkan, dan harganya relatif murah (Gamse, 2002). Ekstraksi bekerja berdasarkan prinsip *"like dissolve like"*, artinya pelarut polar akan melarutkan senyawa yang bersifat polar, dan pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa nonpolar. Jumlah senyawa yang terekstraksi dalam pelarut dapat dilihat dari rendemen hasil ekstraksi yang diperoleh (Rahayu, 2012). Oleh karena itu, penting untuk memilih pelarut yang selektif, yaitu pelarut yang dapat melarutkan komponen yang akan diambil atau dipisahkan (Alfarobi, 2010).

#### 2.3.1 Metanol

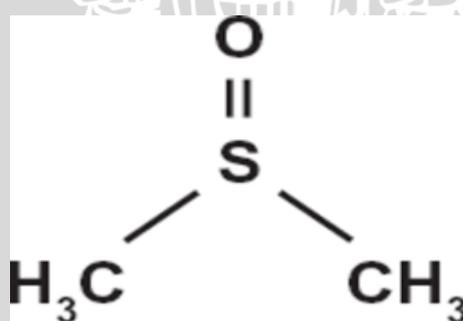
Metanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam (Susanti *et al.*, (2012)). Menurut Thompson, (1985), pelarut metanol dapat menarik senyawa bioaktif seperti alkaloid, steroid, saponin, dan flavonoid dari tanaman. Ditambahkan oleh penelitian Astarina *et al.*, (2013), bahwa pelarut metanol dapat menarik senyawa falvonoid, saponin, tanin, triterpenoid, minyak atsiri, serta glikosida. Hal ini dikarenakan, metanol

merupakan pelarut yang bersifat universal yang memiliki gugus polar (-OH) dan gugus nonpolar (-CH<sub>3</sub>) sehingga dapat melarutkan analit yang bersifat polar maupun nonpolar. Menurut Marnoto *et al.*, (2012), metanol merupakan pelarut polar – protik yaitu yang dapat memberikan ion OH<sup>-</sup> sehingga lebih mudah berinteraksi dengan gugus fungsional yang polar pada tanin.

### 2.3.2 DMSO (Dimetil sulfoksida)

Dimetil sulfoksida (DMSO) pertama kali berhasil disintesis oleh seorang berkebangsaan Rusia dan juga ahli kimia, Alexander Saytzeff pada tahun 1867. DMSO memiliki berat molekul sebesar 78,13 g/mol, titik beku antara suhu 18°C – 18,55°C, serta titik didih pada suhu 189°C. Dimetil sulfoksida berbentuk larutan yang tidak berwarna yang memiliki sifat aprotik dipolar, artinya dapat melarutkan senyawa polar dan non-polar (Gaylord Chemical Company, 2007).

DMSO merupakan senyawa kimia yang memiliki rumus bangun (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO (Oktaviani, 2011). Dimetil sulfoksida berifat ampifilik yang dapat mendukung kemampuan DMSO untuk menembus membran sel, sehingga dapat melakukan penetrasi ke dalam sel (Sum dan Pablo, 2003). Struktur kimia dari pelarut dimetil sulfoksida (DMSO) terdapat pada Gambar 2.



(Gambar 2. Struktur Kimia Dimetil sulfoksida (DMSO))  
(Sumber: : Gurtovenko dan Anwar (2007))

### 2.3.3 Amoksisilin

Amoksisilin adalah salah satu jenis antibiotik turunan penisilin yang paling banyak digunakan untuk kemoterapi infeksi bakteri, yaitu golongan β-laktam

(Connors *et al.*, (1992)). Amoksisilin adalah antibiotik spektrum luas, mempunyai spektrum antibiotik serupa dengan ampisilin. Beberapa keuntungan amoksisilin dibanding ampisilin adalah absorpsi obat dalam saluran cerna lebih sempurna, sehingga kadar darah dalam plasma dan saluran urine lebih tinggi (Siswandono,2000).

Amoksisilin aktif melawan bakteri gram negatif, karena antibiotik ini dapat menembus pori-pori dalam membran fosfolipid luar bakteri gram negatif dan aktif melawan bakteri gram positif yang tidak menghasilkan  $\beta$ -laktamase (Neal, 2007).

#### 2.4 Senyawa Bioaktif Daun Mangrove *Rhizophora mucronata*

Senyawa kimia aktif yang dihasilkan oleh organisme melalui jalur biosintetik metabolit sekunder merupakan senyawa bioaktif (Hardiningtyas, 2009). Komponen bioaktif merupakan senyawa fungsional yang terkandung dalam bahan dan memberikan pengaruh biologis. Komponen bioaktif atau senyawa bioaktif yang terkandung didalam daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk yaitu tanin, triterpenoid / steroid, flavonoid dan alkaloid (Priyanto, 2012).

Hampir semua tanaman *Rhizophora sp* mengandung senyawa bioaktif seperti alkaloid, saponin, flavonoid dan tanin (Rohaeti *et al.*, 2010). Pada kulit batang *Rhizophora mucronata* terdapat tanin sebesar 8-40% (Hou, 1992 dalam Gunarto *et al.*, (2010)). Menurut Agoramoorthy dan Hsu (2005), kandungan kimia dan mineral daun *Rhizophora sp* terdapat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Kandungan Kimia Dan Mineral Daun *Rhizophora sp***

Spesies	Jenis Daun	Kadar Dalam %			Kadar Dalam mg/kg							
		Abu	Protein	Serat Kasar	Ca	Fe	Mg	Mn	P	Zn	Na	K
<i>Rhizophora</i>	Daun	0,9	2,7 -	6,9 -	2510	3,6	161	634	337	6,8	1616	1159
		-		8,9		-	-		-		-	-
	Pucuk	2,8	4,1	8,9	10,7	176	432	3486	2270			
<i>sp</i>	Daun Tua	2,4	3	1,7	1480	8,4	897	213	424	2,8	3002	1827

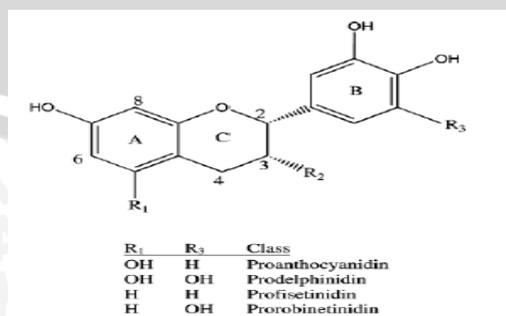
Sumber : Agoramoorthy dan Hsu, (2005).

### 2.4.1 Tanin

Tanin adalah senyawa yang terdapat dalam tumbuhan yang memiliki kemampuan menyambung silang proteinnya. Senyawa tanin merupakan turunan polifenol yang dapat membentuk senyawa kompleks dengan makromolekul lainnya. Umumnya tanin larut dalam senyawa polar. Secara kimia terdapat dua jenis utama tanin yaitu, tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi terdapat hampir pada semua tumbuhan paku - pakuan, gimnospermae, angiospermae, terutama pada jenis tumbuhan berkayu. Sedangkan tanin terhidrolisis penyebarannya hanya terbatas pada tumbuhan berkeping dua (Harborne, 1987).

Tanin juga merupakan senyawa fenolik kompleks yang dapat menghambat aktivitas bakteri patogen sehingga tumbuhan yang mengandung tanin sering digunakan sebagai antiseptik dalam bidang farmasi karena mengandung asam tanik (Trianto *et al.*, (2004)). Tumbuhan yang menjadi sumber tanin di Indonesia antara lain tumbuhan akasia (*Acacia sp*), eukaliptus (*Eucalyptus sp*), pinus (*Pinus sp.*) dan beberapa jenis tumbuhan bakau (Priyanto, 2012).

Struktur tanin merupakan struktur yang sangat kompleks karena memiliki keragaman struktur sekelompok senyawa. Tanin memiliki bobot molekul sekitar 500 sampai lebih dari 20.000 (Marnoto *et al.*, 2012). Struktur tanin secara umum terdapat pada Gambar 3.

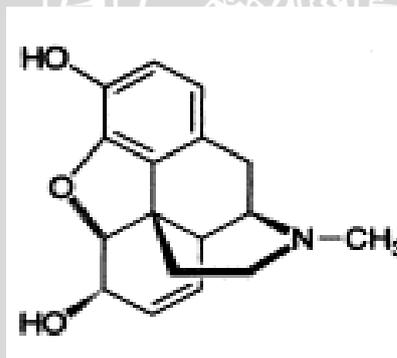


**Gambar 3. Struktur Standar Tanin**  
(Schofield *et al.*, 2001)

### 2.4.2 Alkaloid

Senyawa kimia pada tanaman hasil metabolit sekunder yang merupakan zat tumbuhan sekunder terbesar adalah alkaloid. Secara umum, alkaloid merupakan senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom hidrogen dalam gabungan, sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berwujud cairan seperti nikotina pada suhu kamar, dan tidak berwarna (Harborner, 1984).

Alkaloid sering ditemukan dalam berbagai bagian tanaman, tetapi kadar alkaloid dalam jaringan tumbuhan seringkali kurang dari 1% (Kristanti *et al.*, 2008). Walaupun kandungan alkaloid sangat sedikit tetapi senyawa ini dapat bekerja sebagai antimikroba. Hal ini didukung oleh pernyataan Sari (2008), bahwa senyawa alkaloid pada tumbuhan bersifat toksik terhadap mikroba, sehingga efektif membunuh bakteri dan virus. Timbulnya endapan putih sampai kekuningan menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Harborne, 1987). Struktur alkaloid dapat dilihat pada Gambar 4.



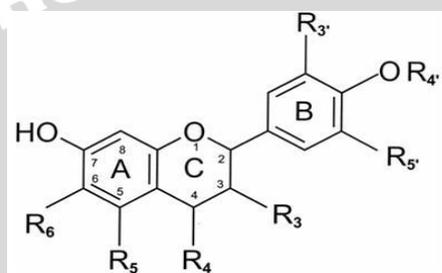
**Gambar 4. Struktur Alkaloid**  
(Liaw *et al.*, (1998))

### 2.4.3 Flavonoid

Senyawa antioksidan alami umumnya adalah senyawa fenolik dan polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid (Partt dan Hudson, 1990).

Flavonoid hampir terdapat dalam seluruh bagian tanaman, termasuk pada buah. Kelompok flavonoid dihidrokuersetin dan kuersetin dapat diekstraksi dari kayu dan berfungsi sebagai antioksidan, cat warna, antijamur dan produk farmasi lainnya (Mannito, 1981).

Senyawa flavonoid larut dalam dalam air dan dapat diekstraksi dengan etanol 70%. Terdapat sistem aromatik dan pita serapan kuat pada daerah *Ultra Violet* (UV) dan spektrum tampak disenyawa flavonoid (Harborne, 1984). Terbentuknya hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Harborne, 1987). Struktur flavonoid dapat dilihat di Gambar 5.

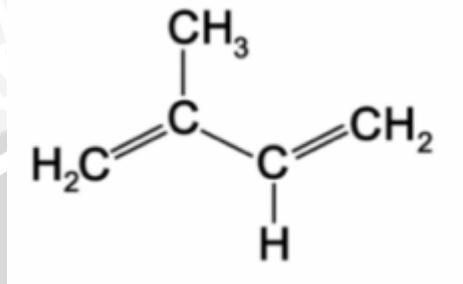


**Gambar 5. Struktur Flavonoid**  
(Markham, 1982)

#### 2.4.4 Triterpenoid / Steroid

Triterpenoid adalah senyawa yang tersusun atas unsur karbon yang berasal dari enam satuan isoprena dan diturunkan secara biosintesis dari hidrokarbon  $C_{30}$  asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat (struktur siklik nisbi rumit). Triterpenoid berbentuk kristal, tidak berwarna, bertitik leleh tinggi. Triterpenoid terbagi menjadi empat golongan senyawa yaitu: senyawa triterpena sebenarnya, steroid, saponin dan glikosida jantung. Senyawa turunan terpenoid ini sangat banyak ditemukan pada daun dan buah dari suatu tanaman yang berfungsi sebagai pelindung terhadap serangan serangga dan serangan mikroba (Harborne, 1987).

Steroid diuji dengan menggunakan reaksi *Lieberman – Burchard* ( asam aasetat anhidrat –  $H_2SO_4$  pekat), akan menghasilkan warna biru hijau pada triterpena dan sterol (Sirait 2007). Struktur terpenoid dapat dilihat pada Gambar 6.



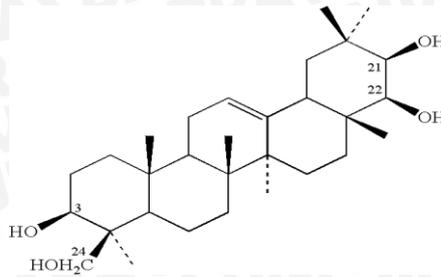
**Gambar 6. Struktur Terpenoid**  
(Sinulingga, 2011)

#### 2.4.5 Saponin

Saponin adalah glikosida triterpena dan sterol dan telah dideteksi terdapat dalam 90 suku tumbuhan (Tschesche dan Wulff., (1973) dalam Harborne, (1987)). Saponin memiliki sifat seperti sabun, merupakan senyawa aktif permukaan, dan dapat dideteksi berdasarkan kemampuan membentuk busa dan menghemolisis sel darah (Harborne, 1987). Senyawa saponin dapat merusak membran sitoplasma dan membunuh sel, sehingga dapat digunakan sebagai antimikroba (Rahayu, 2007).

Saponin adalah glikosida yang apabila dihidrolisis sempurna akan menghasilkan gula dan satu fraksi non – gula yaitu, sapogenin atau genin. Sapogenin dibagi menjadi dua jenis: sapogenin triterpenik dan steroid. Jumlah saponin dalam gula dan jenisnya bervariasi, antara lain: glukosa, galaktosa, arabinosa, ramnosa, asam galakturonat, dan glukoronat (Muchtadi, 1989).

Struktur senyawa saponin dapat dilihat di Gambar 7.



**Gambar 7. Struktur Saponin**  
(Markham, 1982)

## 2.5 Bakteri Uji

Bakteri dapat dibedakan menjadi bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Ditinjau dari komponen penyusun dinding selnya, bakteri gram positif memiliki dua sampai tiga lapis membran sitoplasma yang tersusun atas asam teikhik dan asam teikhouronik berupa polimer yang larut air. Sedangkan, bakteri gram negatif memiliki komponen penyusun terdiri atas 3 dinding sel yang lebih kompleks dan lebih tebal yang tersusun dari peptidoglikan, lipoprotein, dan lipopolisakarida (Jawetz *et al.*, (2001).

### 2.5.1 *Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus* merupakan bakteri gram positif, berbentuk bulat, tersusun berpasangan atau dalam bentuk rantai, termasuk kedalam golongan bakteri heterogen, dan semua spesiesnya adalah bakteri non motil, non sporing, serta tidak dapat mereduksi nitrat. Salah satu spesiesnya adalah *Streptococcus agalactiae* (Wijayani, 2008).

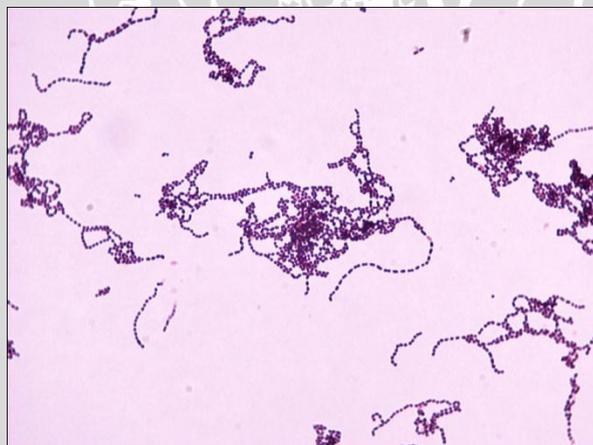
*Streptococcus agalactiae* dikelompokkan menjadi dua tipe, yaitu tipe 1 ( $\beta$ -hemolitik) dan tipe 2 (non-hemolitik). Bakteri tipe 1 akan tumbuh secara optimal pada suhu 37°C dan memiliki kemampuan untuk menghidrolisis gula lebih banyak. Untuk bakteri tipe 2 memiliki sifat yang lebih ganas dari bakteri tipe 1, karena bisa menyebabkan kematian pada ikan (Sheehan *et al.*, (2009).

*S. Agalactiae* adalah salah satu jenis bakteri yang menyerang ikan, seperti ikan nila. Bakteri ini menyerang otak, mata, dan ginjal pada ikan. Bakteri yang

menyerang bagian hipotalamus (otak) yang berfungsi sebagai pusat yang mengatur rasa lapar dan pencernaan ikan. Keberadaan bakteri pada otak menyebabkan ikan berenang abnormal (*gaspang*, berenang miring, *whirling*). Bagian mata ikan yang terserang bakteri ini mata mengerut kemudian pupil mata mengecil, mata seperti berkabut, pembengkakan mata atau eksoptalmia yang disertai pendarahan. Bagian ginjal ikan yang terserang *S.agalactiae* menyebabkan perubahan warna tubuh menjadi lebih hitam, mempengaruhi metabolisme dan proses enzimatik dalam sel yang mengakibatkan degenerasi dan nekrosis pada tubulus ginjal. Kondisi ini merusak struktur dan fungsi ginjal, dan dapat menyebabkan ikan mati (Hardi *et al.*, (2011)). Klasifikasi bakteri

*Streptococcus agalactiae* menurut Ubio (2014), yaitu:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Lactobacillales
Family	: <i>Streptococcaceae</i>
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Spesies	: <i>Streptococcus agalactiae</i>



**Gambar 8. *Streptococcus agalactiae***  
(Joyce *et al.*, (2009))

### 2.5.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Pada umumnya bakteri *Vibrio.sp* merupakan bakteri patogen yang hidupnya tidak sepenuhnya bergantung pada inangnya (*host*). Sifat yang demikian mengakibatkan bakteri ini bisa hidup dimana – mana. Penyakit akan timbul apabila kondisi lingkungan memburuk akibat limbah organik dan bahan cemaran lainnya. Bakteri ini kebanyakan menyerang udang (Prajitno, 2008).

*Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, motil, dan anaerob fakultatif. Habitatnya diperairan laut, ataupun payau karena tahan terhadap kandungan salinitas yang tinggi di air. *Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri musiman, biasanya pada musim panas. Banyak ditemukan dipesisir laut, karena itu secara alami mencemari produk makanan laut. Makanan laut yang dimakan mentah akan berpotensi besar mengandung *Vibrio parahaemolyticus* dan bisa berdampak pada keracunan makanan. Gejala keracunan makanan akibat bakteri ini terjadi sekitar 12- 30 jam setelah mengkonsumsi makanan atau *seafood*. Orang yang terkena gejala keracunan *V.parahaemolyticus* akan mengalami diare, muntah – muntah dan demam. Gejala berlangsung selama 2 – 5 hari (Buckle *et al.*, 1987). Klasifikasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* menurut Ubio (2014) yaitu:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Vibrionales
Family	: <i>Vibrionaceae</i>
Genus	: <i>Vibrio</i>
Species	: <i>Vibrio parahaemolyticus</i>



**Gambar 9. *Vibrio parahaemolyticus***  
(Turner, (2013))

## 2.6 Antibakteri

Senyawa antibakteri adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sebagai pengobatan infeksi pada manusia dan hewan. Antibiotika yang baik adalah yang memiliki sifat toksisitas selektif tinggi. Sifat toksisitas selektif artinya, zat antibakteri harus toksik terhadap bakteri bukan pada inang (*host*). Zat antibakteri yang toksik terhadap bakteri dan membahayakan inang bukan merupakan jenis antibakteri yang baik, bahkan dianggap beracun. Oleh karena, dasar dari pengobatan adalah untuk menyembuhkan suatu penyakit tanpa mengakibatkan adanya bahaya atau efek samping yang merugikan (Budyanto dan Joni, 2012).

Bahan antibakteri merupakan bahan yang mampu mengganggu ataupun menghambat metabolisme mikroorganisme. Sehingga dengan adanya bahan antibakteri dapat mengontrol pertumbuhan dari mikroorganisme atau bakteri. Ditambahkan oleh Pelczar dan Chan (1986), bahwa bahan antibakteri dikenal juga dengan nama antibiotik, artinya suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba itu sendiri dan bisa menghambat pertumbuhan bakteri lain. Senyawa antibakteri berfungsi sebagai bakteristatik, bakterisidal, dan bakterilitik. Menurut Soesanto (2006), antibiotika juga merupakan senyawa organik metabolit sekunder, memiliki berat molekul yang rendah dan bersifat toksin bagi mikroba

lain. Senyawa ini dalam konsentrasi rendah sangat berbahaya bagi pertumbuhan dan keaktifan metabolisme patogen atau mikroba lain. Antibiotika murni berfungsi sebagai pestisida untuk mengendalikan penyakit.

### 2.6.1 Mekanisme Daya Hambat Antibakteri

Antimikroba yang baik menunjukkan sifat toksisitas selektif, artinya zat antibakteri hanya menyerang bakteri, karena hambatan biokimianya hanya terjadi bagi organismenya tidak bagi inang (Ganiswara, 1995). Mekanisme kerja suatu zat antibakteri meliputi: (1) senyawa antibakteri yang menghambat dan mengganggu metabolisme sel bakteri, (2) antibakteri yang menghambat sistesis dinding sel bakteri, (3) antibakteri yang bisa mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, (4) antibakteri yang menghambat sintesis protein sel bakteri, dan (5) senyawa antibakteri yang menghambat atau merusak sintesis nukleat sel bakteri (Amir *et al.*, (1995)).

Ditambahkan oleh Pelczar dan Chan (1986), mekanisme daya hambat suatu senyawa antibakteri yaitu dengan merusak dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Perubahan permeabilitas membran sitoplasma akan menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan dan penghambatan kerja pada molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim.

### 2.6.2 Uji Sensitivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar (diffusion test) yaitu, untuk menentukan daya hambat dari bahan antibakteri dengan melakukan pengamatan zona bening pada media (Rinawati, 2010). Cara pengujian bakteri di inokulasi pada media agar, kemudian meletakkan *paper disk* yang telah dicelupan kedalam ekstrak dengan berbagai konsentrasi secara aseptis pada media agar dengan sedikit ditekan supaya dapat meresap. Setelah itu, diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 35°C. Hasilnya positif jika terbentuk

zona hambatan di sekitar *paper disk*, dan hasil yang didapat akan negatif jika tidak terbentuk zona hambatan disekitar *paper disk* (Trianto *et al.*, 2004).

Pengukuran diameter zona hambat dilakukan dengan menggunakan jangka sorong. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh antimikrobal terlihat sebagai wilayah jernih sekitar kertas cakram. Luasnya wilayah jernih adalah suatu kepekaan mikroorganisme terhadap bahan atau senyawa antimikrobal. Besarnya zona hambat yaitu, diameter zona hambatan dikurangi diameter *paper disk* (Siregar *et al.*, 2012).

## 2.7 Identifikasi Senyawa Bioaktif

### 2.7.1 Kromatografi Kolom

Kromatografi adalah proses pemisahan yang tergantung pada perbedaan distribusi campuran komponen antara fase gerak dan fase diam. Secara umum, prinsip kerja kromatografi didasarkan pada pemisahan campuran dua senyawa berbeda atau lebih yang terdistribusi antara dua fase, yaitu fase gerak dan fase diam. Solut – solut yang mudah menguap (dan stabil terhadap panas) akan bermigrasi atau melewati fase diam dengan kecepatan tertentu tergantung pada rasio distribusinya. Pada umumnya solut akan terelusi berdasarkan peningkatan titik didihnya, kecuali apabila ada interaksi khusus antara solut dengan fase diam (Gandjar dan Rohman, 2007). Kromatografi kolom adalah fase diam yang dapat berupa pembentukan kolom dimana fase gerak dibiarkan untuk mengalir (Noviyanti, 2010). Kromatografi kolom merupakan salah satu metode kromatografi yang digunakan untuk fraksinasi. Metode ini adalah cara terbaik untuk pemisahan campuran dalam jumlah besar (lebih dari 1 gram) (Rouessac dan Rouessac 2004).

Fase diam dalam kromatografi kolom menggunakan *silica gel*. *Silica gel* adalah fase diam yang sangat sering digunakan untuk memisahkan produk alam,

yang memberikan area permukaan yang sangat luas. Ukuran rata – rata *silica gel* yang digunakan dalam kromatografi kolom adalah 40 – 200  $\mu\text{m}$  dengan ukuran pori sebesar 40 hingga 300  $\text{\AA}$  (Cannel, 1998). Permukaan *silica gel* mengandung gugus silanol. Gugus hidroksil ini merupakan pusat aktif yang berpotensi membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan senyawa yang dipisahkan (Palleros, 2000). Seberapa kuat senyawa yang tertahan dalam *silica gel* tergantung pada polaritas fase gerak. Semakin kuat ikatan hidrogen suatu solven, semakin baik eluen untuk melulusi senyawa polar yang teradsorb pada kolom *silica gel* (Cannel, 1998). Biasanya, semakin kuat kemampuan ikatan hidrogen suatu senyawa, semakin kuat akan tertahan oleh *silica gel* (Noviyanti, 2010).

### 2.7.2 Spektrofotometer *Ultraviolet Visible* (UV-VIS)

Spektrofotometri UV-Visible adalah alat yang digunakan untuk analisis kimia kuantitatif. Analisa menggunakan spektrofotometri UV-Vis memiliki kepekaan yang cukup tinggi dan realtif mudah untuk dilakukan (Huda, 2001). Spektrofotometri UV-Vis merupakan pengukuran suatu energi cahaya dengan sistem kimia pada gelombang tertentu (Rohman, 2007).

Metode spektrofotometri ultra violet dan sinar tampak telah banyak diterapkan sebagai penetapan senyawa-senyawa organik yang umumnya dipergunakan untuk penentuan senyawa dalam jumlah yang sangat kecil (Skoog dan West, 1971). Prinsip kerjanya berdasarkan penyerapan cahaya atau energi radiasi oleh suatu larutan. Jumlah cahaya atau energi radiasi yang diserap memungkinkan pengukuran jumlah zat penyerapan dalam larutan tersebut secara kuantitatif (Triyati, 1985). Spektrum cahaya tampak terdiri komponen – komponen merah, jingga, kuning, hijau, biru dan ungu, yang masing-masing warna mempunyai panjang gelombang berbeda. Interval perkiraan panjang gelombang warna-warna cahaya tampak dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Interval Perkiraan Warna –warna Cahaya Tampak**

Warna	Warna pelengkap	Panjang gelombang (mm)
ungu	hijau kuning	400 - 435
biru	kuning	435 - 480
biru hijau	oranye	480 - 490
hijau biru	merah	490 - 500
hijau	merah lembayung	500 - 560
hijau kuning	ungu	560 - 580
kuning	biru	580 - 595
oranye	biru hijau	595 - 610
merah	hijau biru	610 - 750

**Sumber:** Skoog dan West, (1971).

### 2.7.3 *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)*

Kromatografi cair adalah teknik dasar pemisaha senyawa. Kromatografi cair mampu memisahkan senyawa organik yang memiliki molekul kecil hingga molekul besar dengan rentang yang sangat luas. Detektor yang seringkali digunakan untuk kromatografi cair adalah UV-Vis, data yang dihasilkan mewakili kekuatan signal sebagai fungsi dari waktu dan luas area. Spektrometer massa memberikan data tentang spektra massa suatu senyawa, sehingga mampu memberian informasi mengenai struktur, berat molekul, identitas, jumlah dan kemurnian sampel. Data spektra masa mampu menambahkan kepercayaan pada hasil yang diperoleh baik secara kualitatif maupun kuantitatif (Ginting, 2012).

Spektrometri massa adalah penguraian senyawa organik dan perekaman pola fragmentasi menurut massanya. Uap cuplikan akan berdifusi kedalam sistem spektrometer massa yang bertekanan rendah, lalu diionkan untuk memutuskan ikatan kimia. Ion positif yang dihasilkan dipercepat dalam medan magnet yang menyebarkan ion tersebut dan memungkinkan mengukur kelimpahan nisbi ion yang memiliki nisbah massa terhadap muatan tertentu. Rekaman kelimpahan ion terhadap massa merupakan grafik spektrum massa yang terdiri atas sederetan grafis yang intensitasnya berbeda-beda pada satuan massa yang berlainan (Gandjar dan Rohman, 2007). Menurut Vogeser dan

Christoph (2008), kelebihan metode LC-MS meliputi: 1). Spesifitas (hasil analisis yang spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor, 2). Aplikasi yang luas dan praktis, 3). Fleksibilitas, dan 4). Kaya informasi (data kualitatif dan kuantitatif dapat diperoleh).



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama dan bahan kimia. bahan utama terdiri atas: daun mangrove *Rhizophora mucronata* yang diambil dari Ekowisata Mengrove Ngulik, Pasuruan, Jawa Timur. Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* sebagai bakteri gram negatif dan bakteri *Streptococcus agalactiae* sebagai bakteri gram positif yang merupakan koleksi bakteri dari Laboratorium Pengujian Mutu Perikanan Budidaya, Jepara.

Bahan kimia yang digunakan meliputi metanol sebagai pelarut polar, aquades. Bahan lainnya, yaitu: kertas cakram berdiameter 6mm, antibiotik amoksisilin sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Media TSA (*Trypton Soya Agar*) merek "Merck" untuk menumbuhkan *Vibrio parahaemolyticus* dan media NA (*Nutrient Agar*) merek "OXOID" untuk menumbuhkan bakteri *Streptococcus agalacticae*, KCl, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, *cotton swab*, metanol, kloroform, *sillica gel*, *sea sand*, kertas saring, tissue, kertas label, aluminium foil, spiritus, tali, koran, NaFis 0,9%, plastik gula, dan alkohol 90%.

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: autoklaf, evaporator, pipet tetes, pipet volume 10ml, pipet serologis 1 ml, bunsen, gelas ukur 100ml, erlenmeyer 250ml, erlenmeyer 500ml, tabung reaksi, rak tabung, botol spray, *washing bottle*, jarum ose, beaker glass 600ml, inkubator, timbangan digital, cawan petri, pinset, bola hisap, beaker glass 5ml, spatula, mortar dan alu, blender, ayakan, *hot plate*, botol vial, *vortex mixer*, jangka sorong, tabung kolom kromatografi. Peralatan yang digunakan untuk purifikasi dan identifikasi senyawa antibakteri dari daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk adalah erlenmeyer

100 ml, tabung reaksi, statif, corong, pipet tetes, beaker glass, botol vial, alat yang digunakan dalam proses UV-Vis dan LC-MS.

### 3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Tujuan menggunakan metode eksperimen untuk mengetahui pengaruh konsentrasi berbeda pada ekstrak daun mangrove *Rhizophora mucronata* terhadap kemampuan daya hambat antibakteri pada bakteri uji *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae*. Kemampuan daya hambat bakteri dibuktikan dengan adanya (zona hambat bakteri. Indikator yang ingin dicapai adalah dengan adanya perbedaan diameter zona hambat pada setiap konsentrasi ekstrak daun mangrove *Rhizophora mucronata* yang diberikan, semakin lebar zona hambat maka semakin efektif senyawa bioaktif dari sampel ekstraksi.

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu metanol sebagai pelarut senyawa bioaktif pada daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk, penggunaan amoksisilin sebagai antibiotik dan penggunaan konsentrasi yang berbeda dari ekstraksi. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu perbedaan lebar diameter daerah hambat antibakteri yang ditunjukkan dari hasil zona hambat disekitar kertas cakram.

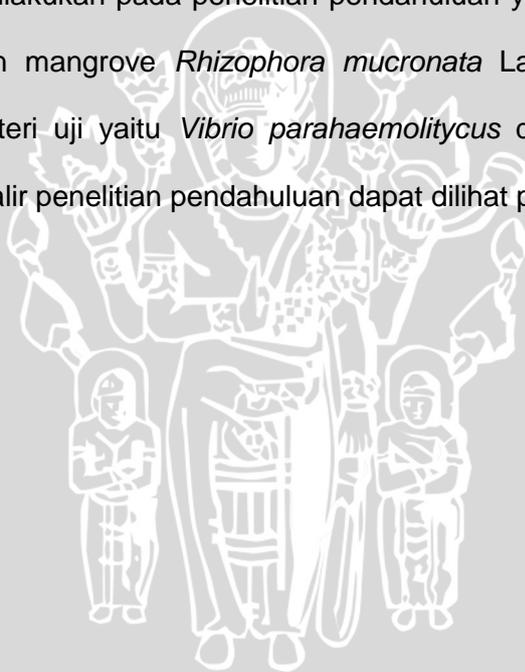
Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahapan, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian inti. Tahapan penelitian pendahuluan: ekstraksi daun *Rhizophora mucronata* Lamk dengan menggunakan pelarut metanol dengan cara dimaserasi. Kemudian ekstrak yang dihasilkan dilakukan uji fitokimia dan uji daya hambat. Uji fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder pada sampel sebagai identifikasi dalam penentuan metode isolasi. Selanjutnya ekstrak dikromatografi kolom dengan pelarut tertentu. Sedangkan uji daya hambat disini

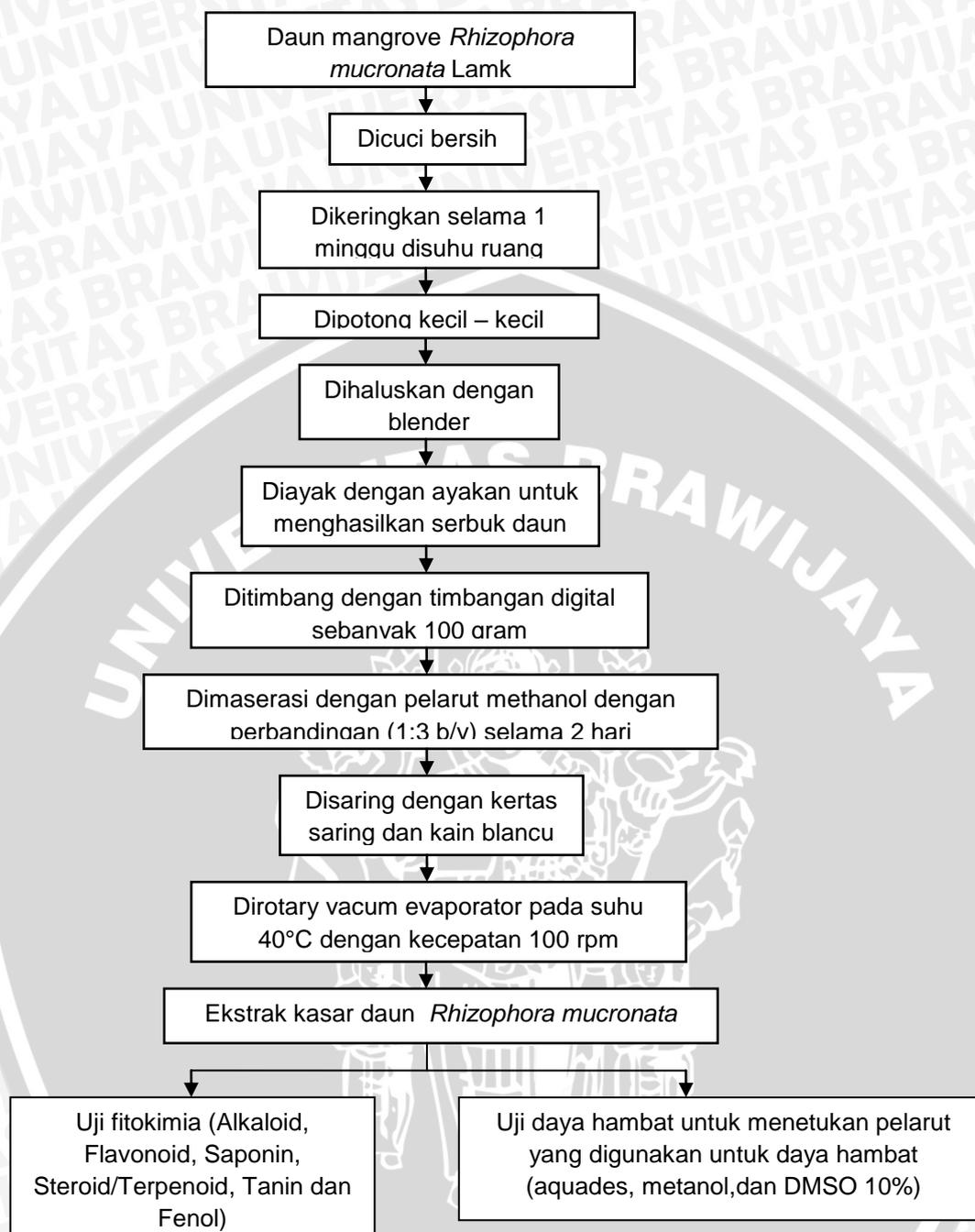
dilakukan untuk membuktikan adanya senyawa antibakteri, serta untuk menentukan pelarut yang digunakan dalam uji daya hambat.

Pada tahapan 2, penelitian inti yaitu ekstrak kasar dikromatografi kolom, dilanjutkan dengan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi yang diperoleh akan dilakukan uji daya hambat terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae* untuk menentukan fraksi yang terbaik. Kemudian fraksi terbaik akan di uji spektrofotometri UV-Vis dan LC-MS untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antibakteri.

### 3.3 Prosedur Penelitian Pendahuluan

Kegiatan yang dilakukan pada penelitian pendahuluan yaitu melakukan uji fitokimia ekstrak daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk dan uji daya hambat terhadap bakteri uji yaitu *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalacticae*. Diagram alir penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Gambar 10.





Gambar 10. Diagram Alir Penelitian Pendahuluan

### 3.3.1 Maserasi Daun Mangrove *Rhizophora mucronata*

Sampel yang digunakan berupa daun mangrove *Rhizophora mucronata* yang diambil dari Ekowisata mangrove Ngulik, Pasuruan, Jawa Timur. Pada penelitian ini daun yang digunakan adalah daun tua. Menurut Djojopranoto

(2013), kriteria untuk pengambilan daun tua adalah dimulai pada daun ke-6 dan selebihnya dari pucuk. Daun mangrove dicuci dengan air bersih dibawah air mengalir untuk menghilangkan debu-debu dan kotoran lain yang menempel pada daun. Kemudian sampel dikeringkan di suhu ruang selama satu minggu, setelah kering di potong kecil-kecil dan diblender serta di ayak untuk mendapatkan serbuk daun mangrovenya. Ditimbang sebanyak 100 gram. Pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi. Metode maserasi adalah penarikan senyawa bioaktif dengan merendam sampel menggunakan pelarut, pada penelitian ini menggunakan larutan metanol p.a. Sampel dimaserasi selama 2 x 24 jam dengan perbandingan sampel dan metanol 1:3. Untuk memisahkan ekstrak dan sampel dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring dan diperas dengan menggunakan kain blacu. Kemudian dilakukan pemekatan sampel dengan cara menguapkan pelarut, menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C dan kecepatan 100rpm. Ekstrak yang diperoleh digunakan untuk uji antibakteri, uji fitokimia, uji kromatografi kolom, dan uji LC-MS.

### 3.3.2 Sterilisasi Alat

Seluruh alat yang digunakan dicuci bersih dan dikeringkan. Selanjutnya dilakukan pensterilan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan temperatur 121°C dan tekanan 1 atm.

### 3.3.3 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA) dan *Trypton Soya Agar* (TSA)

Nutrient agar (NA) yang digunakan bermerek "OXOID" dengan total komposisi 28 g/L terdiri dari campuran pepton 5 g/L, *meat extract* 1 g/L, *yeast extract* 2 g/L, sodium chloride 5 g/L, dan agar 15 g/L. Sedangkan media TSA yang digunakan bermerek "MERCK" total komposisi 40 g/L dibuat dari campuran tripton 15 g/L, soya pepton 5 g/L, sodium chloride 5 g/L, dan agar 15 g/L. Untuk media TSA pembuatan media dicampur dengan larutan 3 garam, antara lain: KCl, NaCl, dan MgSO<sub>4</sub>, hal ini dilakukan untuk menyamai media yang digunakan

oleh bakteri indukan. Media NA digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalactiae* dan TSA sebagai media pertumbuhan *Vibrio parahaemolyticus*.

NA dan TSA ditimbang sesuai kebutuhan dan dilarutkan dalam aquades pada wadah erlenmeyer dan di homogenkan dengan cara dipanaskan di *hot plate*. Media NA yang telah homogen lalu disterilisasi di autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Setelah agak dingin tuangkan media kedalam tabung reaksi dan miringkan untuk media agar miring ataupun kedalam cawan petri. Sebelum digunakan, pastikan media sudah padat.

#### 3.3.4 Regenerasi Bakteri

Bakteri dibiakan pada agar miring steril. Peremajaan bakteri diambil dari stok bakteri yang digunakan sebanyak satu ose. Bakteri yang digunakan merupakan koleksi dari Laboratorium Pengujian Mutu Perikanan Budidaya, Jepara. Kemudian diinokulasi dalam media regenerasi NA dan TSA, lalu di inkubasi selama 2 hari pada suhu 28-30°C. Bakteri yang telah diregenerasi di agar miring kemudian dipindahkan kedalam larutan suspensi yaitu larutan 3 garam untuk bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan dalam larutan NaFis 0,9% untuk bakteri *Streptococcus agalactiae* dengan menggunakan jarum ose, dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*. Kemudian dibandingkan tingkat kekeruhannya dengan reagen Mc Farlan's Barium sulfat yang setara dengan  $10^7$  sel bakteri untuk mengetahui kepadatan dari bakteri.

#### 3.3.5 Uji Fitokimia Ekstrak Daun Mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk

**Uji Alkaloid.** Sebanyak 0,5 gram serbuk daun mangrove ditambahkan 1 mL Hcl 2 N dan 9 mL aquadest dipanaskan selama 2 menit. Kemudian didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Siapkan 3 tabung reaksi, masing-masing berisi 3-5 tetes filtrat. Masing-masing tabung ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Meyer, Wagner, dan Dragendroff. Adanya alkaloid ditandai

dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi Meyer, endapan merah-jingga pada pereaksi Dragendrof, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner (Tarigan *et al.*, 2008).

**Uji Flavonoid.** Sebanyak 0,5 gram serbuk daun mangrove ditambahkan dengan 15 mL metanol. Panaskan di *waterbath* selama 5 menit dengan suhu 50°C. setelah dipanaskan kemudian disaring menggunakan kertas saring dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Hasil filtrat ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat sebanyak 5 tetes. Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan adanya warna hijau kebiruan pada sampel (Harborne, 1987).

**Uji Saponin.** Sebanyak 0,5 gram serbuk daun mangrove ditambahkan dengan 20 mL aquadest dan di panaskan hingga mendidih di *waterbath* dengan suhu 80°C selama 5 menit. Didinginkan dan disaring dengan kertas saring. Filtrat dimasukkan dalam tabung reaksi dan dikocok selama 10 detik. Adanya saponin ditunjukkan dengan timbulnya busa selama ± 10 menit dan tidak hilang saat ditambahkan dengan satu tetes HCl 2 N (Harborne, 1987).

**Uji Steroid dan Terpenoid.** Untuk uji steroid: Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun mangrove dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan asam asetat anhidrat dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat masing-masing sebanyak 2 mL. Adanya steroid ditunjukkan dengan adanya warna ungu atau biru atau hijau. Untuk uji terpenoid: sebanyak 0,5 gram serbuk daun mangrove dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 2 mL kloroform. Kemudian tambahkan asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pekat secara perlahan sebanyak 3 mL. Adanya terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah kecoklatan (Bactiar *et al.*, 2012).

**Uji Tanin.** Sebanyak 5 gram serbuk daun mangrove dimasukkan kedalam erlenmeyer 100 mL dan ditambahkan dengan 50mL aquadest. Dipanaskan sampai mendidih di *waterbath* selama 10 menit dengan suhu 100°C dan disaring dengan kertas saring. Filtrat ditambahkan dengan 3 tetesi FeCl 1%. Warna biru

tua atau hitam kehijauan yang terbentuk menunjukkan adanya tanin (Harborne, 1987).

### 3.3.6 Pengujian Antibakteri dengan Uji Cakram (Lay, 1994)

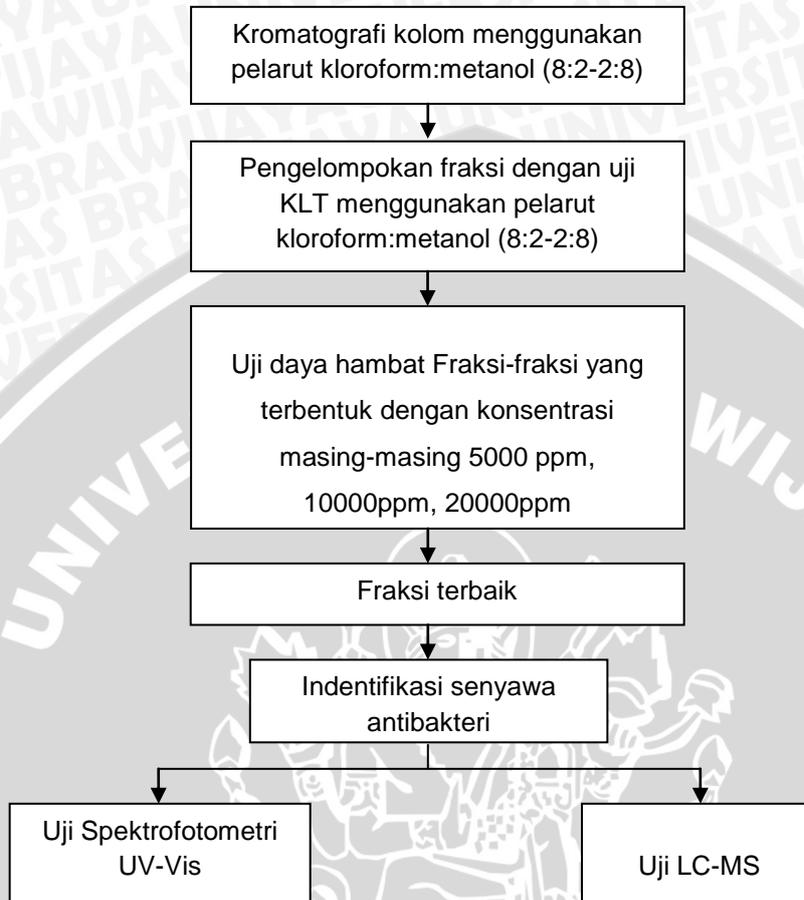
Pengujian antibakteri menggunakan metode difusi kertas cakram memiliki prinsip uji yaitu, lempang agar yang telah disemai dengan bakteri pengujian ditempelkan dengan kertas cakram yang telah direndam dengan berbagai antibiotik (Lay, 1994). Pada penelitian ini yaitu, ekstrak kasar daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk, serta amoksisilin.

Bakteri yang telah di bandingkan kekeruhannya dengan reagen Mc farlan menggunakan *cotton swab* ditanam pada media NA untuk bakteri *Streptococcus agalactiae* dan pada media TSA untuk bakteri *Vibrio parahaemolyticus* di cawan petri dengan disebar pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioles pada media sampai membentuk jaring-jaring rapat. Untuk mendapat pertumbuhan yang merata, oleskan *cotton swab* dengan 4 sisi cawan secara merata. Kemudian siapkan kertas cakram yang sudah steril dan meletakkan kertas cakram yang telah mengandung ekstrak daun mangrove yang telah direndam dalam pelarut(aquades, metanol dan DMSO 10%) untuk menentukan pelarut yang digunakan dalam penelitian inti dan antibiotik dengan konsentrasi 5000 ppm kedalam cawan petri dengan sedikit ditekan agar meresap. Setelah itu dibungkus rapat dengan plastik gula untuk menghindari kontaminasi, dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28-30°C. Menurut Lay (1994), hasilnya positif apabila terbentuk zona hambatan disekitar kertas cakram, dan hasilnya negatif apabila tidak terdapat zona hambatan disekitar kertas cakram.

### 3.4 Penelitian Inti

Hal yang harus dilakukan pada penelitian inti yaitu melakukan kromatografi kolom, uji KLT, dan untuk mengidentifikasi senyawa antibakteri yang terdapat

pada sampel dengan uji spektrofotometri UV-Vis, dan Uji LCMS. Skema kerja penelitian inti terdapat pada Gambar 11.



**Gambar 11. Skema Kerja Penelitian Inti**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktorial dengan 2 ulangan. Faktor yang pertama adalah penggunaan fraksi daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk dan amoksisilin sebagai antibiotik. Faktor yang kedua adalah konsentrasi yang berbeda dari fraksi daun *Rhizophora mucronata* Lamk, antibiotik amoksisilin sebagai kontrol positif (+). Pada tiap perlakuan uji daya hambat dilakukan duplo. Pengamatan dilakukan terhadap zona hambat bakteri yang terbentuk pada tiap perlakuan.

Rumus dari model Rancangan Acak Lengkap (RAL), sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}; \quad i = 1, 2, \dots, t; \quad j = 1, 2, \dots, r$$

dimana :

$Y_{ij}$  = Nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.

$\mu$  = Nilai rata-rata

$\alpha_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$\varepsilon_{ij}$  = Galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.

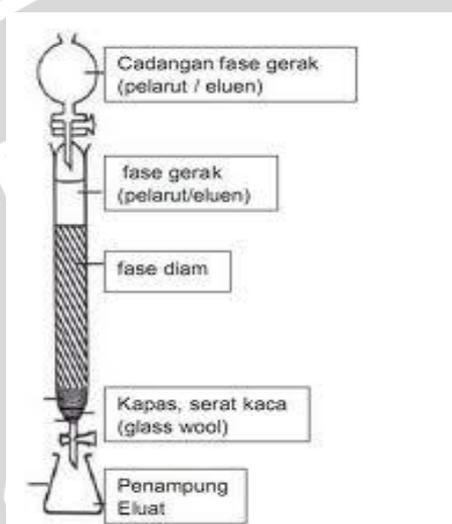
### 3.5 Prosedur Penelitian Inti

#### 3.5.1 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom (Han *et al.*, 2012; Matsuno dan Miyuki, 1995; Melki *et al.*, 2011)

Tahapan pemisahan senyawa aktif dalam ekstrak daun mangrove meliputi kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis (KLT). Kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan campuran beberapa senyawa yang diperoleh dari isolat tumbuhan. Dengan menggunakan fase diam dan fase gerak, maka fraksi-fraksi senyawa akan menghasilkan kemurnian yang cukup tinggi. Menurut Melki *et al.*, (2011), fase diam yang digunakan dalam kromatografi kolom penelitian ini yaitu berupa adsorben padat yaitu silika gel 60F<sub>256</sub> MERCK, sedangkan fase gerak yang digunakan berupa campuran larutan, yaitu kloroform : metanol secara bertingkat (8:2 – 2:8).

Prinsip kerjanya, pertama-tama tutup bagian bawah tabung yang digunakan untuk pemisahan dengan *glass wool* atau kapas yang berfungsi sebagai penyaring untuk menghindari hilangnya fase diam. Kemudian isi kolom dengan bubuk silika gel, yang terbuat dari 40 gr serbuk silika gel dicampur dengan 100 mL larutan fase gerak dan diaduk dengan stirer. Setelah tercampur bubuk silika gel dimasukkan secara perlahan kedalam kolom dan tidak boleh terputus agar tidak terdapat gelembung udara, sambil sesekali diketuk sampai bubuk silika gel mengendap. Kemudian ditambahkan *sea sand* sebagai pelapis, lalu ditunggu sampai *silica gel* memadat sempurna. Setelah persiapan kolom

siap, lalu dialirkan ekstrak kasar daun *Rhizophora mucronata* Lamk kedalam kromatografi kolom dan kran kromatografi kolom dibuka. Ekstrak *Rhizophora mucronata* Lamk akan meserap kedalam kolom silika gel sampai batas silika gel, lalu masukan pereaksi atau fase gerakanya terus-menerus dan kran kolom dibuka. Fraksi yang terpisah ditampung dalam botol vial tiap 5 atau 15 menit sekali. Berikut gambar rancangan kromatografi kolom pada Gambar 12.



**Gambar 12. Prinsip Kerja Kromatografi Kolom (Google image, 2015)**

Untuk mengetahui mengetahui senyawa aktif dalam ekstrak daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk diketahui dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Plat yang digunakan adalah plat silika gel G-60 dengan ukuran panjang 5 cm dan lebar 1 cm. Plat diberi jarak tepi bawah 1cm dan tepi atas 0,5 cm, sehingga didapat jarak tempuh 3,5cm. Uji kemurnian ini menggunakan fase gerak kloroform:metanol (8:2-2:8 v/v). Fraksi-fraksi yang diperoleh ditotolkan pada batas bawah menggunakan pipet kapiler dan diusahakan diameter totalan sekecil mungkin, karena totalan yang diameternya besar akan megakibatkan terjadinya penyebaran noda dan timbulnya noda berekor. Kemudian plat dicelupkan kedalam bejana kromatografi yang berisi fase gerak. Proses ini dilakukan pada bejana yang tertutup rapat. Biarkan fase gerak

bergerak naik pada silika gel, sampai batas atas plat (Nurchayati, 2014). Setelah itu ditentukan Retodansi faktor (Rf) nya.

### 3.5.2 Uji Daya Hambat Fraksi Daun *Rhizophora mucronata* Lamk terhadap

#### Bakteri Uji (Lay, 1994)

Metode yang digunakan pada uji daya hambat penelitian ini adalah metode difusi kertas cakram. Metode ini dilakukan dengan menguji antimikroba dengan mengukur daerah zona hambat yang terbentuk dan dibandingkan dengan antibiotik amoksisilin sebagai kontrol positif (+). Cawan petri dengan NA untuk bakteri *Streptococcus agalactiae* dan media TSA untuk bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yang telah padat disiapkan sebagai media pertumbuhan bakteri. *Cotton swab* steril dicelupkan kedalam biakan bakteri uji *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae* yang kepadatannya telah disamakan dengan *Mc Farland 10<sup>7</sup>*. *Cotton swab* yang telah dicelupkan kedalam biakan bakteri uji disebarakan keseluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan. Cara pengolesan yang dilakukan sama seperti pada penelitian pendahuluan. Siapkan kertas cakram steril yang telah direndam didalam fraksi-fraksi yang diperoleh dengan konsentrasi 5.000 ppm, 10.000 ppm, dan 20.000 ppm, serta amoksisilin sebagai kontrol positif (+) dengan konsentrasi 5.000 ppm. Tempelkan kertas cakram yang telah direndam didalam sampel dan diinkubasi pada suhu 28°C – 30°C selama 2 x 24 jam. Setelah waktu inkubasi selesai diamati zona hambat yang terdapat pada permukaan lempeng agar, dan ukur zona hambatnya.

### 3.5.3 Identifikasi Senyawa Antibakteri Fraksi *Rhizophora mucronata* Lamk

Fraksi dari daun *Rhizophora mucronata* Lamk yang memiliki aktivitas antibakteri yang terbesar akan dilakukan indentifikasi senyawa dengan spektrofotometri UV-Vis dan LC-MS.

## 3.6 Parameter Uji

Parameter uji yang digunakan adalah parameter kuantitatif dengan mengukur diameter (mm) zona daya hambat antibakteri dari fraksi daun *Rhizophora mucronata* Lamk yang diperoleh sebagai analisa data secara sistematis. Hasil dari analisa spektrofotometri UV-Vis, dan LC-MS dijadikan paduan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa antibakteri pada fraksi daun *Rhizophora mucronata* Lamk. Adapun rumus untuk zona daya hambat antibakteri, yaitu:

$$\text{Daya Hambat} = \text{diameter zona hambat} - \text{diameter paper disk}$$

Menurut Suryawiria (1978), klasifikasi aktivitas daya hambatan pertumbuhan bakteri berdasarkan metode David Stout dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Aktivitas Antibakteri berdasarkan Metode David Stout**

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan
>20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
<5 mm	Lemah

Sumber: Suryawiria (1978)

### 3.7 Analisa Data

Pengolahan data hasil penelitian ini menggunakan analisa keragaman (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diukur, dengan selang kepercayaan 95%. Apabila ditemukan hasil yang berbeda nyata, maka akan dilakukan uji BNJ.

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Penelitian Pendahuluan

Hasil penelitian pendahuluan meliputi uji fitokimia dan uji daya hambat dengan ekstrak kasar daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk. Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa yang terkandung pada daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk yang diduga memiliki potensi sebagai antibakteri. Uji daya hambat pada penelitian pendahuluan dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan adanya senyawa antibakteri pada sampel ekstrak *Rhizophora mucronata* Lamk dengan terbentuknya zona hambat, dan untuk menentukan pelarut yang digunakan dalam uji daya hambat.

#### 4.1.1 Uji Fitokimia

Uji fitokimia adalah uji kualitatif, yang dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa bioaktif yang diduga terdapat dalam *R.mucronata* Lamk. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi uji tanin, alkaloid, flavonoid, terpenoid/steroid dan saponin. Hasil dari uji fitokimia yang telah dilakukan adalah terdeteksinya senyawa-senyawa bioaktif yaitu tanin, alkaloid, flavonoid, dan saponin. Hasil ini sesuai dengan penelitian Rohaeti *et al.*, (2010) dan Priyanto (2012) yang menemukan adanya senyawa tanin, alkaloid, flavonoid, triterpenoid dan saponin dalam daun *R.mucronata* Lamk. Dalam penelitian Priyanto (2012) juga menemukan adanya senyawa steroid namun dari hasil penelitian yang telah diuji tidak ditemukannya senyawa tersebut. Hal ini dikarenakan jenis senyawa bioaktif ini sebagian besar banyak terdapat pada hewan. Hasil uji fitokimia daun *R.mucronata* Lamk dapat dilihat dalam Lampiran 2 dan pada Tabel 4.

**Tabel 4. Hasil Uji Fitokimia *R.mucronata* Lamk**

Uji	Hasil	Reaksi
Tanin	+	Terbentuk warna hijau tua atau hitam kehijauan
Alkaloid		Terdapat endapan putih
• Perekasi Mayer	+	Terdapat endapan coklat
• Perekasi Wagner	+	Terdapat endapan jingga kemerah-merahan
• Perekasi Dragendroff	+	
Flavonoid	+	Terbentuknya warna hijau kebiruan pada sampel
Terpenoid	+	Terbentuk warna merah kecoklatan yang menandakan adanya triterpenoid
Steroid	-	Tidak terbentuk warna biru atau ungu atau hijau pada sampel
Saponin	+	Masih terdapat buih setelah ditetesi dengan HCl 2N

Sumber : Data Penelitian, (2015).

Hasil positif tanin dibuktikan dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan pada sampel uji. Tanin juga merupakan senyawa fenolik kompleks yang dapat menghambat aktivitas bakteri patogen, sehingga tumbuhan yang mengandung tanin seringkali digunakan sebagai antiseptik karena mengandung asam tanik (Trianto *et al.*, (2004)). Menurut Dewi *et al.*, (2012), tanin digunakan sebagai antibakteri karena tanin mampu mempresipitasi protein, menginaktifkan enzim dan merusak atau mendestruksi fungsi materi genetik pada bakteri.

Positif alkaloid dengan terbentuknya endapan putih pereaksi Meyer, endapan merah-jingga pada pereaksi Dragendrof, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner. Senyawa alkaloid pada tumbuhan bersifat toksik terhadap mikroba, sehingga efektif membunuh bakteri dan virus (Sari, 2008). Menurut Lamothe (2009), senyawa alkaloid dapat digunakan sebagai antimikroba karena

diprediksi alkaloid melakukan penghambatan sintesis dinding sel yang mengakibatkan lisis pada sel bakteri.

Terdapat senyawa flavonoid pada sampel ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan. Dewi *et al.*, (2012), menjelaskan bahwa flavonoid merupakan senyawa yang dapat berperan sebagai antimikroba, karena senyawa ini dapat mengganggu metabolisme bakteri, merusak dinding sel bakteri dan mendenaturasi protease sel bakteri.

Hasil positif terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah kecoklatan setelah ditetesi asam sulfat pekat pada sampel. Menurut Roihanah *et al.*, (2012), senyawa terpenoid mampu merusak membran sel, menginaktifkan enzim dan mendenaturasi protein sehingga dinding sel mengalami kerusakan. Kerusakan dari dinding sel tersebut dapat berakibat pada terhambatnya pertumbuhan bakteri ataupun kematian bakteri.

Diketahui positif senyawa saponin pada sampel ditunjukkan dengan adanya buih atau busa yang terbentuk kurang lebih 1-10cm, dan busa tidak hilang setelah ditetesi HCl 2N (Harborne,1987). Senyawa saponin dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri karena senyawa ini mampu merusak membran sitoplasma pada bakteri sehingga mampu membunuh sel bakteri (Dewi *et al.*, (2012)).

#### **4.1.2 Uji Daya Hambat Menggunakan Pelarut DMSO 10%, Metanol, dan Aquadest**

Pengujian daya hambat ini dilakukan hanya untuk membuktikan adanya senyawa antibakteri di daun *Rhizophora mucronata* Lamk, dan untuk menentukan pelarut yang paling baik digunakan dalam pengujian daya hambat ini. Penting untuk memilih pelarut yang baik. Hal ini bertujuan, agar ekstrak kasar daun *R.mucronata* Lamk dapat larut dengan baik didalam pelarut, sehingga

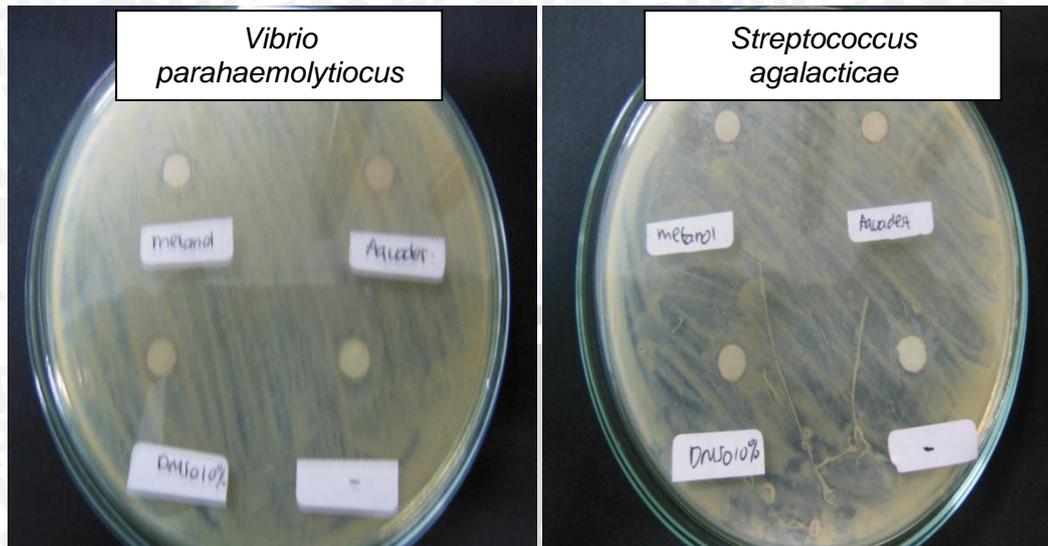
pelarut dan ekstrak kasar dapat menyatu dengan baik. Daya hambat yang dihasilkan pun dapat maksimal. Adapun pelarut yang digunakan adalah DMSO 10%, metanol, dan aquadest dengan masing-masing konsentrasi yang digunakan adalah 5000 ppm. Hasil daya hambat masing-masing pelarut terhadap bakteri uji yaitu, *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalacticae* dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar *R.mucronata* Lamk dalam Berbagai Pelarut**

Pelarut (5000 ppm)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (mm)	<i>Streptococcus agalacticae</i> (mm)
Aquadest	0,65	0,35
Metanol	0,35	0,2
DMSO 10%	1,35	0,4
(+) Amoksilin	1,9	1,35

Sumber : Data Penelitian, (2015).

Hasil uji daya hambat ekstrak kasar daun *R.mucronata* terbaik adalah dengan menggunakan pelarut DMSO 10% dilihat dari zona hambat yang terbentuk seluas 1,35 mm terhadap bakteri *V.parahaemolyticus* dan 0,4 mm terhadap bakteri *S.agalacticae*. Sehingga dalam penelitian utama untuk uji daya hambatnya akan menggunakan DMSO 10% untuk melarutkan hasil fraksi dari daun *R.mucronata* Lamk. Hasil uji daya hambat ekstrak kasar daun *R.mucronata* terhadap bakteri *V.parahaemolyticus* dan *S.agalacticae* dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun *R.mucronata* Lamk

## 4.2 Penelitian Utama

### 4.2.1 Isolasi Ekstrak Daun *Rhizophora mucronata* Lamk dengan Kromatografi Kolom

Isolasi atau pemisahan dengan kromatografi kolom ini bertujuan untuk memisahkan campuran senyawa yang terkandung didalam ekstrak daun *R.mucronata* Lamk, sehingga diperoleh fraksi-fraksi senyawa dengan kemurnian. Untuk memperkuat hasil dari kromatografi kolom dilanjutkan dengan kromatografi lapis tipis.

Pelarut yang digunakan sebagai fase gerak dalam kromatografi kolom adalah kloroform:metanol dengan perbandingan 8:2 – 2:8 (v/v). Fase gerak dengan perbandingan bertingkat bertujuan untuk mengeluarkan senyawa-senyawa dalam sampel yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Proses pemisahan senyawa pada sampel daun *R.mucronata* Lamk dengan kromatografi kolom terdapat pada Gambar 14.



**Gambar 14. Kromatografi Kolom Ekstrak Daun *R.mucronata* Lamk**

Untuk memperkuat hasil fraksi-fraksi yang telah diperoleh dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT). Setelah semua fraksi yang diperoleh diuji KLT, kemudian dihitung nilai  $R_f$  nya. Selanjutnya, kelompokkan fraksi-fraksi berdasarkan warna dan juga nilai  $R_f$  yang diperoleh. Hasil pemisahan senyawa dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6. Fraksi-Fraksi Hasil Pemisahan Senyawa pada Daun *R.mucronata* Lamk**

No Botol	Warna	KLT $R_f$	Fraksi
1	Hijau Pekat	0,97	A
2	Hijau Pekat	0,91	
3	Hijau Pekat	0,91	
4	Hijau Kekuningan	0,68	B
5	Hijau Kekuningan	0,74	
6	Hijau Kekuningan	0,65	
7	Hijau Kekuningan	0,62	
8	Hijau Kekuningan	0,68	
9	Hijau Kekuningan	0,6	
10	Hijau Kekuningan	0,71	

Sumber : Data Penelitian, (2015).

Kromatografi kolom menghasilkan 10 botol fraksi (5ml/botol). Setelah dilakukan uji KLT, kemudian dikelompokkan menjadi 2 fraksi besar yaitu fraksi A dan fraksi B. Botol 1-3 dengan nilai  $R_f$  0,97 dan 0,91 dengan warna yang dihasilkan hijau pekat dikelompokkan menjadi fraksi A. Botol 4-10 dengan nilai

Rf 0,6, 0,62,065, 0,68, 071 dan 0,74 dengan warna yang dihasilkan adalah hijau kekuningan dikelompokkan mejadi fraksi B. Kemudian hasil fraksi yang telah dibentuk dalam kelompok besar akan dilakukan uji daya hambat, untuk menemukan fraksi mana yang paling baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Hasil kromatografi lapis tipis (KLT) dapat dilihat di Lampiran 3.

#### 4.2.2 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini menggunakan bakteri gram negatif (*V.parahaemolyticus*) dan bakteri gram positif (*S.agalactiae*), dengan menggunakan metode difusi kertas cakram. Pengujian aktivitas antibakteri ini dilakukan pada Fraksi A dan Fraksi B untuk menentukan fraksi terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Konsentrasi yang diberikan pada tiap fraksi sama yaitu 5000 ppm, 10000 ppm, dan 20000 ppm, dan amoksisilin sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 5000 ppm. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali dan dilakukan secara duplo.

##### 4.2.2.1 *Vibrio parahaemolyticus*

Aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dapat dilihat dari zona hambat yang terbentuk, dapat dilihat pada Tabel 7.

**Tabel 7. Aktivitas Zona Hambat Antibakteri terhadap *Vibrio parahaemolyticus***

PERLAKUAN	V.parahaemolyticus		TOTAL	Rerata	ST.DEV	
	I (mm)	II (mm)				
A*	5000 ppm	3,25	2,89	6,14	3,07	0,25456
	10000 ppm	3,45	4,06	7,51	3,76	0,43134
	20000 ppm	4,39	5,33	9,72	4,86	0,66468
B*	5000 ppm	0,65	0,68	1,33	0,67	0,02121
	10000 ppm	0,98	1,6	2,58	1,29	0,43841
	20000 ppm	1,57	2,41	3,98	1,99	0,59397
Amox A(+)	5000 ppm	9,4	8,9	18,3	9,15	0,23442
Amox B(+)	5000 ppm	3,66	3,54	7,2	3,60	0,23706
TOTAL		27,35	29,41	31,26		

Ket: Fraksi A = Warna Fraksi Hijau Pekat  
Fraksi B = Warna Fraksi Hijau Kekuningan

Berdasarkan dari luas zona hambat yang terbentuk, besarnya zona bening pada antibiotik amoksisilin sebagai kontrol positif lebih baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Apabila dilihat dari rerata luas zona hambat yang terbentuk antara fraksi A dan fraksi B, dalam menghambat bakteri *Vibrio parahaemolyticus* fraksi A lebih baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan luas zona hambat yang terbesar yang terbentuk yaitu 4,86 mm pada konsentrasi 20000 ppm. Hal ini dibuktikan dengan notasi BNJ 5% yang terbentuk pada notasi fraksi maupun notasi konsentrasi, dapat dilihat pada tabel 8.

**Tabel 8. Notasi Fraksi BNJ 5% terhadap Bakteri *Vibrio parahaemolyticus***

PERLAKUAN FRAKSI	TOTAL	RERATA	NOTASI
B	7,89	3,895	a
A	23,37	1,315	b

Berdasarkan notasi fraksi BNJ 5% yang terbentuk dapat dilihat bahwa yang memiliki potensi lebih baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* adalah fraksi A. Untuk menentukan konsentrasi yang lebih baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji dapat dilihat pada tabel 9.

**Tabel 9. Notasi Konsentrasi BNJ 5% terhadap Bakteri *Vibrio parahaemolyticus***

PERLAKUAN KONSENTRASI	TOTAL	RERATA	NOTASI
5000 ppm	7,47	1,87	a
10000 ppm	10,09	2,52	a
20000 ppm	13,37	3,34	ab

Berdasarkan hasil notasi yang terbentuk, disimpulkan konsentrasi 20000 ppm memiliki potensi yang lebih baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Kesimpulan akhir yang diperoleh, fraksi A dengan konsentrasi 20000 ppm merupakan fraksi dan konsentrasi terbaik atau teraktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus*.

#### 4.2.2.2 *Streptococcus agalactiae*

Aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus agalacticae* dapat dilihat dari luasnya zona hambat yang terbentuk, pada Tabel 10.

**Tabel 10. Aktivitas Zona Hambat Antibakteri terhadap *Streptococcus agalacticae***

PERLAKUAN		S.agalacticae		TOTAL RERATA	ST.DEV	
FRAKSI	KONSENTRASI	I(mm)	II(mm)			
A	5000 ppm	0,82	1,33	2,15	1,08	0,360624
	10000 ppm	1,23	0,84	2,07	1,04	0,275772
	20000 ppm	1,85	1,6	3,45	1,73	0,176777
B	5000 ppm	0,05	0,12	0,17	0,09	0,049497
	10000 ppm	0,18	0,43	0,61	0,31	0,176777
	20000 ppm	1,35	1,15	2,5	1,25	0,141421
Amox A(+)	5000 ppm	3,25	3,54	6,79	3,40	0,108297
Amox B(+)	5000 ppm	4,34	3,06	7,4	3,70	0,076197
TOTAL		13,07	12,07	10,95		

Ket: Fraksi A = Warna Fraksi Hijau Pekat  
Fraksi B = Warna Fraksi Hijau Kekuningan

Berdasarkan zona hambat yang terbentuk, luasnya zona hambat pada antibiotik amoksisilin sebagai kontrol positif memiliki zona hambat yang lebih besar dari pada zona hambat yang terbentuk pada fraksi. Dilihat dari rerata zona hambat yang terbentuk fraksi A lebih baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalacticae* dengan luas zona hambat terbesar pada konsentrasi 20000 ppm yaitu 1,73 mm. Hal ini dibuktikan dengan notasi BNJ 5% yang terbentuk pada notasi fraksi maupun notasi konsentrasi, dapat dilihat pada tabel 11.

**Tabel 11. Notasi Fraksi BNJ 5% terhadap Bakteri *Streptococcus agalacticae***

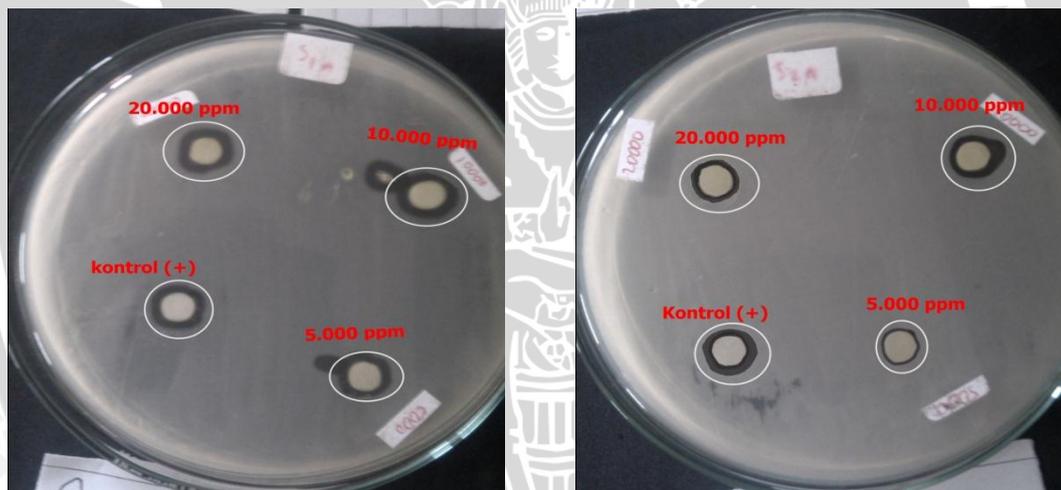
PERLAKUAN FRAKSI	TOTAL	RERATA	NOTASI
B	3,28	0,55	a
A	7,67	1,28	b

Berdasarkan notasi fraksi BNJ 5% yang terbentuk dapat dilihat bahwa yang berpotensi lebih baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalacticae* fraksi A. Untuk menentukan konsentrasi yang lebih baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji dapat dilihat pada tabel 12.

**Tabel 12. Notasi Konsentrasi BNJ 5% terhadap Bakteri *Streptococcus agalacticae***

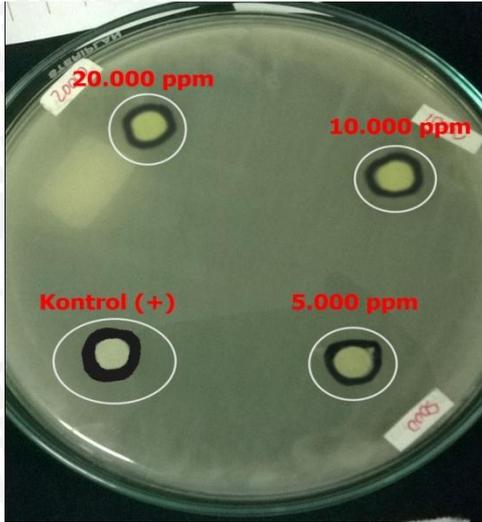
PERLAKUAN KONSENTRASI	TOTAL	RERATA	NOTASI
5000 ppm	2,32	0,58	a
10000 ppm	2,68	0,67	a
20000 ppm	5,95	1,49	b

Dari notasi yang terbentuk maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi terbaik untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. agalacticae* sebesar 20000 ppm. Dari hasil tersebut, kesimpulan akhir yang diperoleh yaitu fraksi A dengan konsentrasi 20000 ppm merupakan fraksi dan konsentrasi terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. agalacticae*. Data perhitungan ANOVA dan BNJ 5% dapat dilihat pada Lampiran 4. Hasil zona hambat yang terbentuk oleh fraksi terbaik, yaitu fraksi A, dapat dilihat pada Gambar 15.

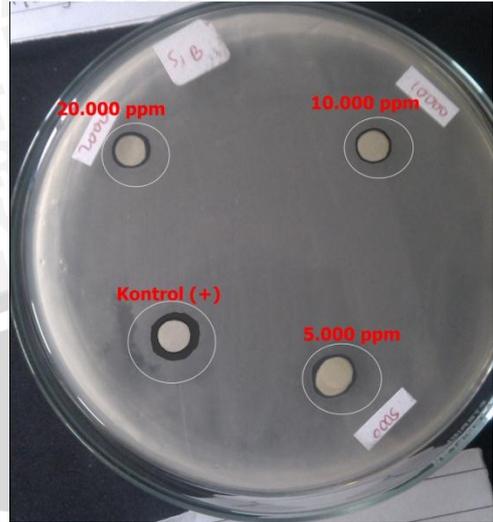


***S. agalacticae* Ulangan 1a**

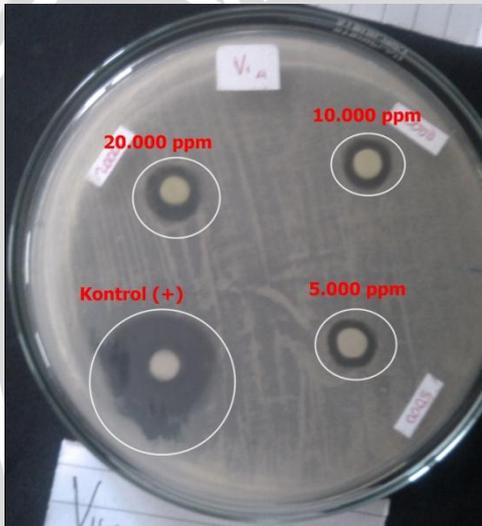
***S. Agalacticae* Ulangan 1b**



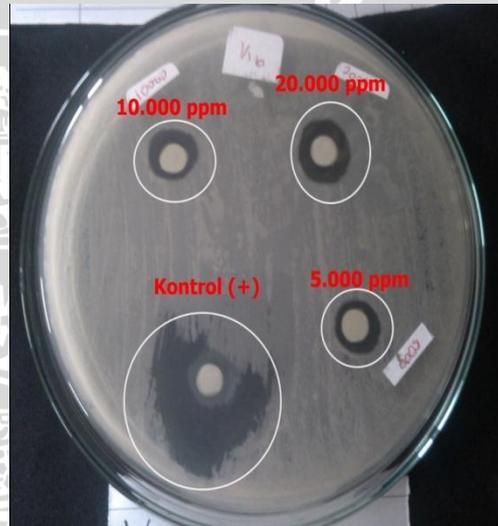
*S. agalacticae* Ulangan 2a



*S. Agalacticae* Ulangan 2b

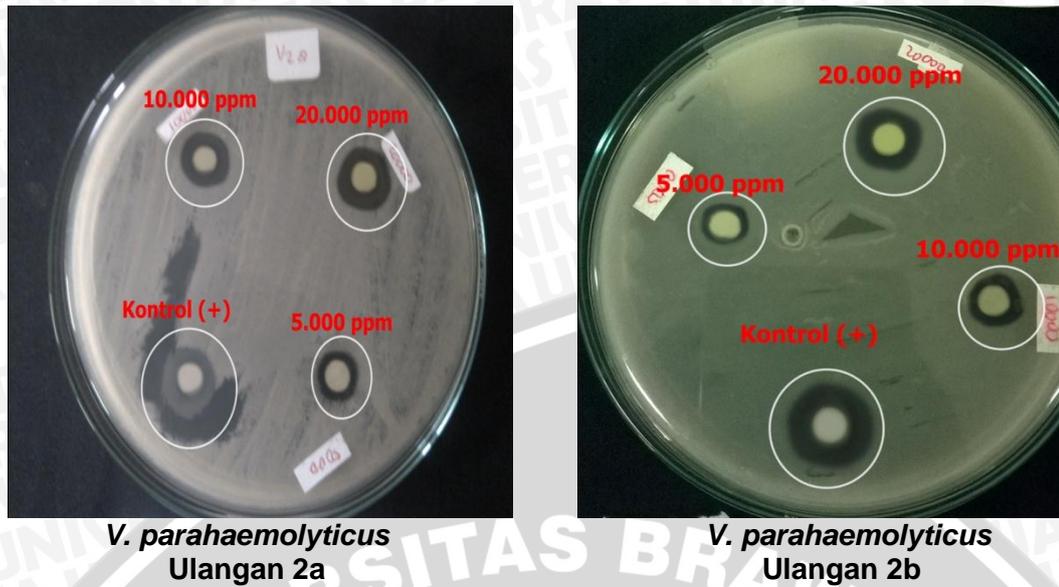


*V. parahaemolyticus*  
Ulangan 1a



*V. parahaemolyticus*  
Ulangan 1b



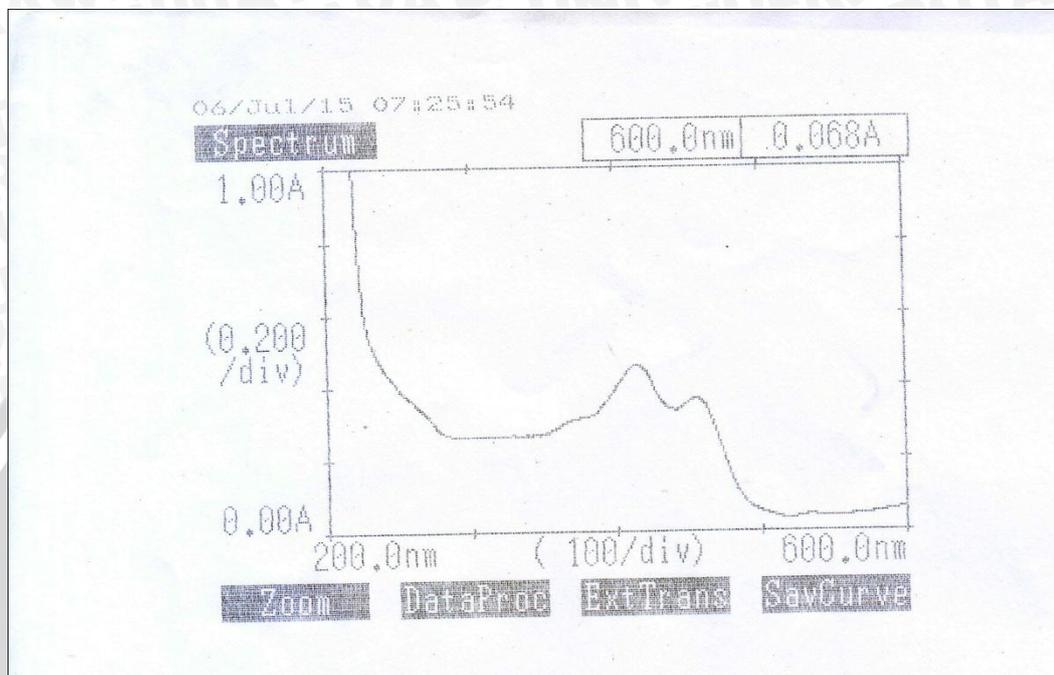


**Gambar 15. Hasil Zona Hambat Fraksi A Terhadap Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae***

Respon daya hambat yang dihasilkan berpengaruh terhadap besarnya konsentrasi yang diberikan pada fraksi A. Semakin besar konsentrasi yang diberikan maka akan makin besar pula zona hambat yang terbentuk. Menurut Darmayasa (2008), besarnya zona hambat juga tergantung pada daya serap zat antibakteri kedalam lempeng agar dan kepekaan bakteri terhadap zat anti bakteri tersebut. Hasil zona hambat yang terbentuk lebih besar pada bakteri *V. parahaemolyticus* dari pada *S. agalacticae*. Hal ini diduga terjadi karena bakteri *S. agalacticae* merupakan bakteri air tawar, sedangkan tumbuhan *R. mucronata* Lamk merupakan tumbuhan air payau. Menurut Davidson *et al* (2005), zona hambat bakteri gram negatif lebih besar dikarenakan senyawa antibakteri yang berupa asam-asam organik mempunyai daya hambat lebih besar terhadap bakteri gram negatif. Tumbuhan mangrove memiliki senyawa yang bersifat asam seperti asam fenolat dan asam-asam organik (suryati *et al*, (2007)).

#### 4.2.3 Identifikasi Senyawa Antibakteri Fraksi A *Rhizophora mucronata* Lamk

Identifikasi senyawa aktif pada fraksi A *Rhizophora mucronata* Lamk yang berperan sebagai antibakteri, dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometri Ultra Violet (UV-Vis) dan LC-MS. Hasil analisis menggunakan Spektrofotometri Ultra Violet (UV-Vis) dapat dilihat pada Gambar 16.

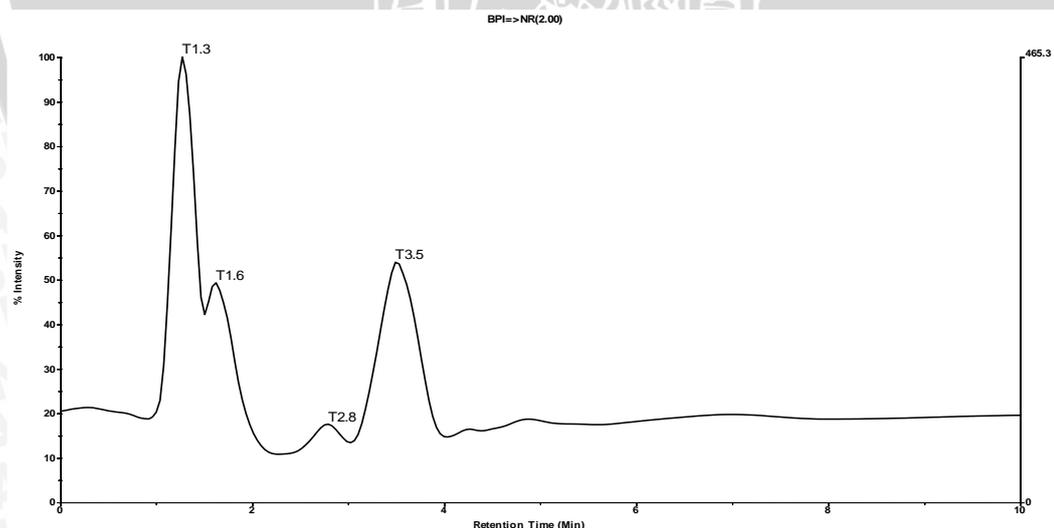


**Gambar 16. Spektrofotometri Ultra Violet (UV-VIS) Fraksi A**

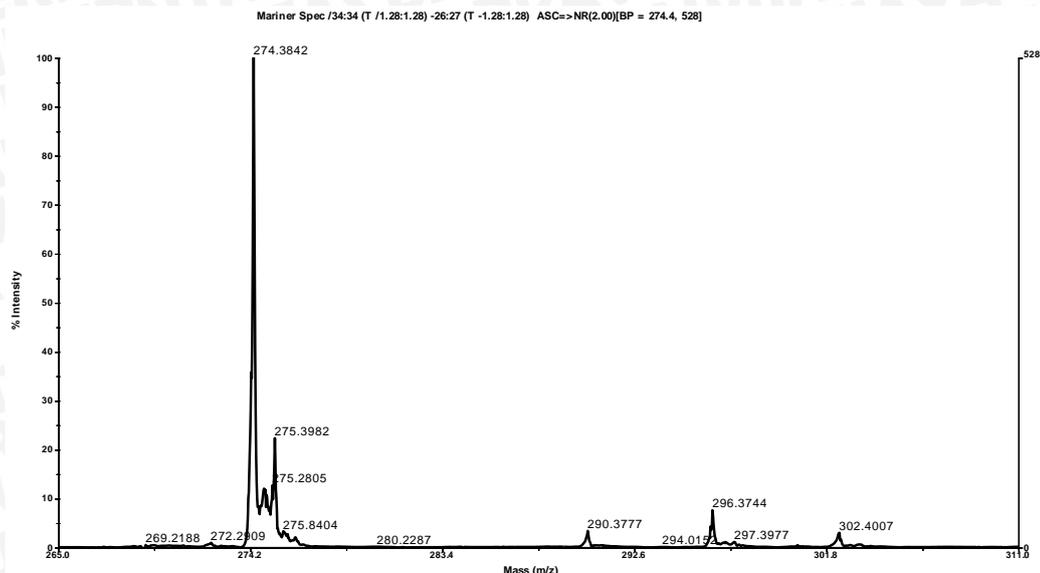
Berdasarkan hasil pengukuran spektrofotometri UV-Vis yang terbentuk didapatkan tiga puncak pita serapan. Puncak gelombang pertama pada daerah 209 nm dengan absorban 3,101. Pada panjang gelombang ini diduga terjadi transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  disebabkan oleh kromofor yang tak terkonjugasi, yang mengabsorbasi cahaya pada panjang gelombang sekitar 200 nm. Menurut Suharto *et al.*, (2012), bahwa puncak gelombang 209 nm merupakan senyawa saponin. Pada kebanyakan transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  dalam pelarut polar, absorpsi akan bergeser ke panjang gelombang yang lebih besar. Pergeseran absorpsi kepanjang gelombang yang lebih besar disebut efek batokromik. Puncak gelombang kedua dan ketiga terdapat pada daerah 415 nm dengan absorban sebesar 0,459. Dan 456 nm dengan absorben 0,366. Pada daerah ini diduga senyawa mempunyai transisi  $n \rightarrow \pi^*$  yang mengabsorpsi cahaya didaerah

serapan 200-400 nm. Menurut penelitian Ratnawati *et al.*, (2012), bahwa panjang gelombang serapan maksimum sebesar 415 nm termasuk senyawa flavonoid. Sedangkan menurut perhitungan Kristianingrum ( panjang gelombang 453 nm mendekati 456 nm adalah senyawa trans  $\beta$  karoten. Senyawa trans  $\beta$  karoten merupakan salah satu jenis karotenoid. Karotenoid berasal dari kelas terpenoid (Fretes *et al.*, (2012)).

Identifikasi dilanjutkan dengan uji LC-MS untuk mengetahui struktur senyawa dan berat molekul senyawa yang terkandung didalam fraksi A dari ekstrak *Rhizophora mucronata* Lamk. Hasil uji LC-MS membentuk empat puncak waktu yang berbeda. Puncak paling besar terbentuk pada puncak pertama yaitu pada waktu 1,3 menit. Puncak terbesar kedua yang terbentuk pada waktu 3,5 menit, puncak terbesar ketiga terbentuk pada waktu ke 1,6 menit dan 2,8 menit terbentuk puncak terbesar keempat. Puncak paling besar yang terbentuk diduga memiliki suatu jenis senyawa yan melimpah. Pola spektrum LC-MS yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 17, dan pola spektrum LC-MS pada waktu 1,3 yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 18.

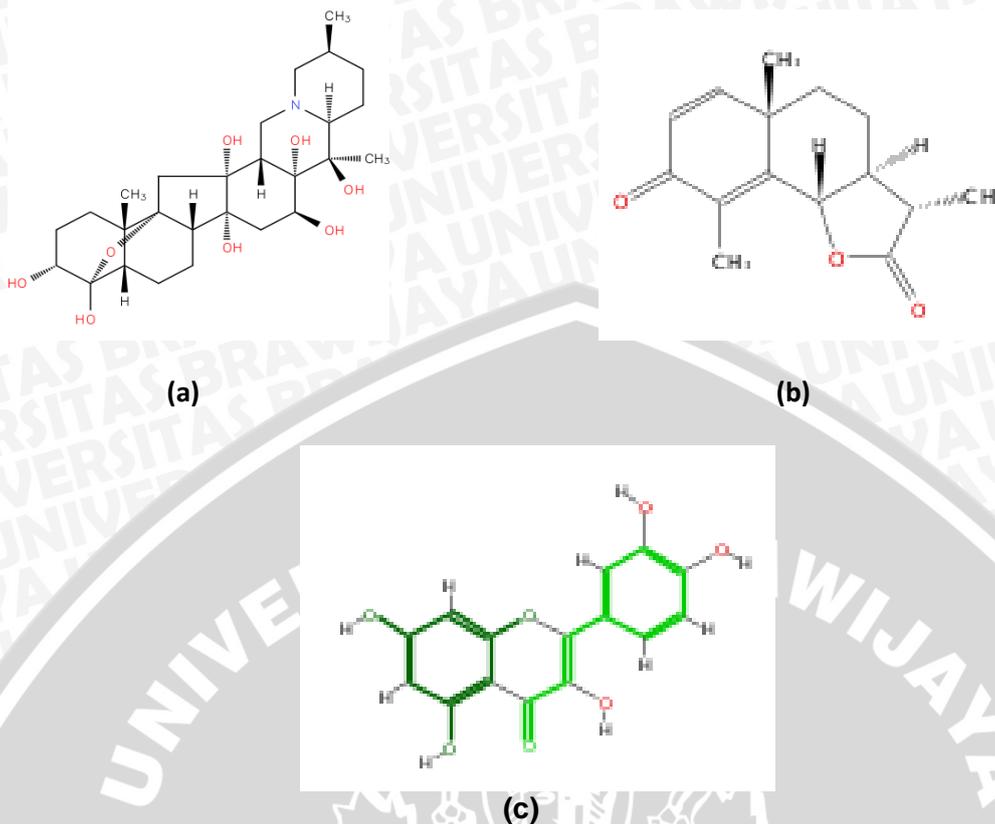


Gambar 17. Pola Spektrum LC-MS Fraksi A



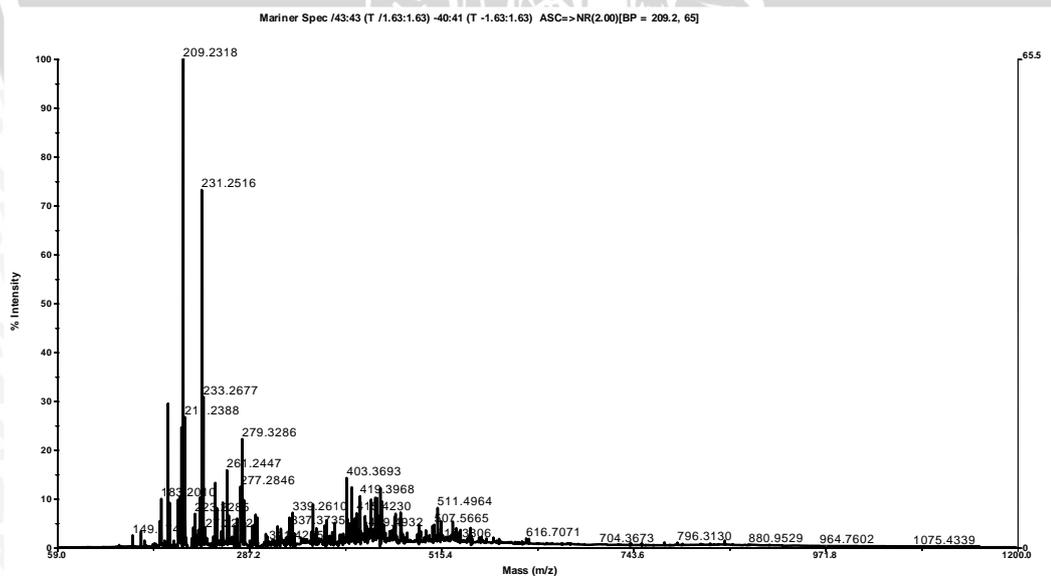
**Gambar 18. Spektrum MS Rt. 1.3 Fraksi A**

Analisa spektrum MS fraksi A pada Rt. 1,3 terdapat beberapa puncak ion yang terbentuk, menandakan fragmentasi dan berat molekulnya. Berdasarkan penelusuran database spektra massa melalui internet, diduga senyawa memiliki berat molekul 509 m/z sebagai  $[M+H]^+$  adalah diduga senyawa cevine golongan saponin steroid. Ditemukan juga dugaan senyawa dengan berat molekul 246 m/z sebagai  $[M+H]^+$  yaitu adalah senyawa santonin yang termasuk kedalam golongan terpenoid. Selain itu diduga terdapat senyawa dengan berat molekul 302 m/z sebagai  $[M+H]^+$  yang merupakan senyawa turunan flavonol, golongan flavonoid yaitu quercetin. Pada Rt. 1.3 ini senyawa yang teridentifikasi merupakan senyawa saponin steroid, terpenoid dan flavonoid. Struktur kimia senyawa dugaan saponin steroid ( $C_{27}H_{43}NO_8$ ) santonin ( $C_{15}H_{18}O_3$ ) dan quercetin ( $C_{15}H_{10}O_3$ ) dapat dilihat pada Gambar 19.



**Gambar 19. Struktur Senyawa Dugaan Cevine (a), Santonin (b), dan Senyawa Quercetin (c) (Massbank, 2016)**

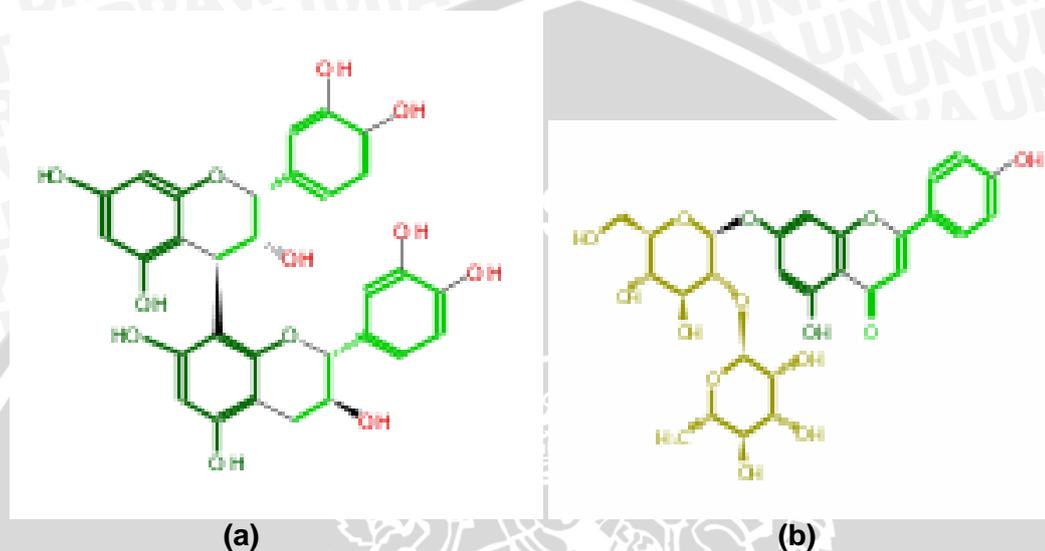
Hasil pola spektrum LC-MS yang terbentuk pada waktu retensi 1.6, dapat dilihat pada Gambar 20.



**Gambar 20. Spektrum MS Rt. 1.6 Fraksi A**

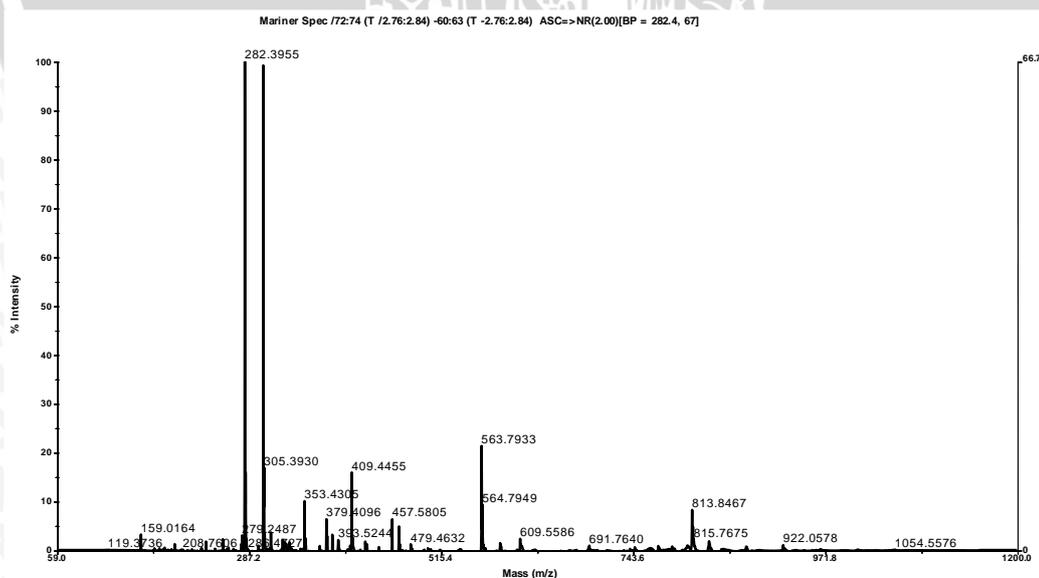
Pada Rt 1.6 berdasarkan penelusuran database spektra massa melalui internet ditemukan senyawa dugaan Procyanidin B1 dan Rhoifolin dengan berat molekul 578 m/z sebagai  $[M+H]^+$  yang merupakan golongan senyawa flavonoid.

Struktur kimia senyawa Procyanidin B1(  $C_{30}H_{26}O_{12}$ ) dan Rhoifolin ( $C_{27}H_{30}O_{14}$ ) terdapat pada Gambar 21.



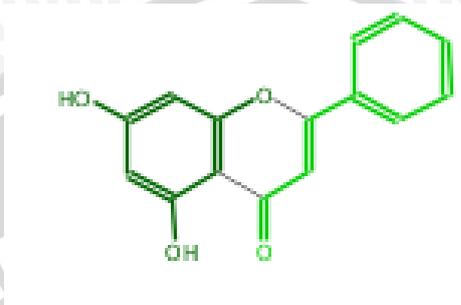
Gambar 21. Struktur Senyawa Procyanidin B1(a), dan Senyawa Rhoifolin (b) (Massbank, 2016)

Hasil pola spektrum LC-MS yang terbentuk pada waktu retensi 2.8, dapat dilihat pada Gambar 22.



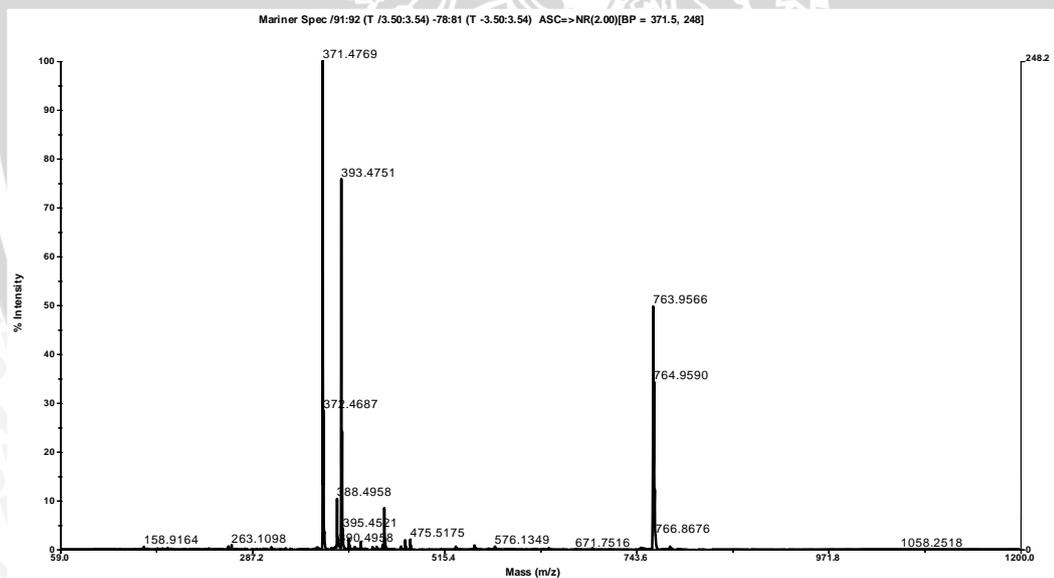
Gambar 22. Spektrum MS Rt. 2.8 Fraksi A

Analisa spektrum MS fraksi A pada Rt. 2.8. berdasarkan penelusuran database spektra massa melalui internet, diduga senyawa memiliki berat molekul 254 m/z sebagai  $[M+H]^+$  yang merupakan senyawa golongan flavonoid yaitu chrysin. Struktur kimia senyawa dugaan chrysin ( $C_{15}H_{10}O_4$ ) dapat dilihat pada Gambar 23.



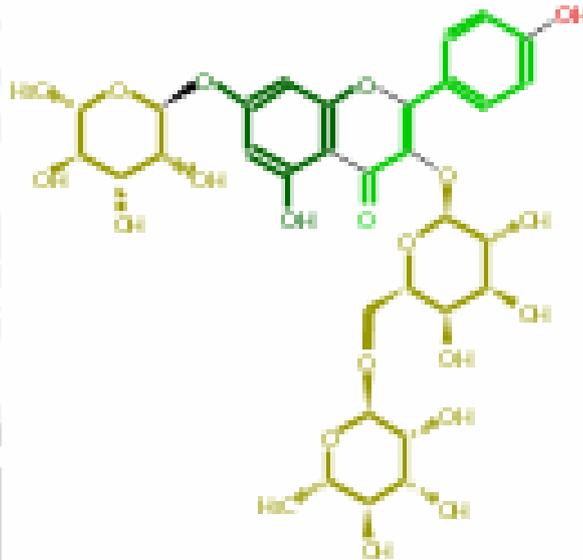
**Gambar 23. Struktur Senyawa Chrysin (Massbank, 2016)**

Hasil pola spektrum LC-MS yang terbentuk pada waktu retensi 3.5, dapat dilihat pada Gambar 24.



**Gambar 24. Spektrum MS Rt. 3.5 Fraksi A**

Analisa senyawa pada Rt 3.5 berdasarkan penelusuran database spektra massa melalui internet ditemukan senyawa dugaan yaitu Robinin sebagai  $[M+H]^+$  yang merupakan golongan senyawa flavonoid. Struktur kimia senyawa Robinin ( $C_{33}H_{40}O_{19}$ ) terdapat pada Gambar 25.



**Gambar 25. Struktur Senyawa Robinin (Massbank, 2016)**

Berdasarkan hasil dari analisa uji spektrofotometri UV-Vis dan LC-MS senyawa dugaan yang terkandung didalam fraksi A adalah senyawa saponin, flavonoid dan terpenoid.

#### **4.2.4 Mekanisme Penghambatan Bakteri *Vibrio prahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae***

Ekstrak daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji, yaitu *Vibrio prahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae*, hal ini dapat dilihat dari zona hambat yang terbentuk pada uji cakram. Terdapat perbedaan daya hambat terhadap bakteri *Vibrio prahaemolyticus* (bakteri gram negatif) dan *Streptococcus agalactiae* (bakteri gram positif), meskipun kita ketahui komponen penyusun dari bakteri gram negatif lebih kompleks dibandingkan dengan komponen penyusun bakteri gram positif. Namun, pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa ekstrak daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk lebih baik dalam menghambat bakteri gram negatif dari pada bakteri gram positif. Hal ini kemungkinan dapat disebabkan senyawa antibakteri yang berupa asam-asam organik mempunyai daya hambat lebih besar terhadap bakteri gram negatif (Davidson *et al.*,(2005)).

Tumbuhan mangrove memiliki senyawa yang bersifat asam seperti asam fenolat dan asam-asam organik (suryati *et al*, (2007)). Ditambahkan oleh Marlina (2004), bahwa bakteri *Vibrioparahaemolyticus* adalah bakteri gram negatif dengan dinding sel yang lebih tipis dari bakteri gram positif. Dari besarnya zona hambat yang terbentuk, terdapat pada **Lampiran 4**, berdasarkan metode David Stout (pada tabel 3) aktivitas daya hambat ekstrak daun mangrove *Rhizophora mucronata* Lamk termasuk kategori respon hambat pertumbuhan lemah, yaitu <5 nm. Meskipun demikian, daun *R.mucronata* Lamk dapat dikategorikan memiliki potensi sebagai antibakteri alami.

Identifikasi senyawa bioaktif pada fraksi A ditemukan dugaan senyawa adalah senyawa golongan saponin, flavonoid dan terpenoid. Menurut Dewi *et al.*, (2012), senyawa saponin dapat dikatakan sebagai antibakteri karena saponin dapat merusak membran sitoplasma pada bakteri sehingga mengakibatkan terbunuh nya bakteri. Pernyataan ini didukung oleh penelitian Retnowati *et al.*,(2011), bahwa senyawa saponin dapat merusak membran sitoplasma. Kerusakan pada membran sitoplasma dapat mengakibatkan sifat permeabilitas membran sel berkurang yang berdampak pada transportasi zat yang keluar masuk tidak terkontrol. Zat dalam sel antara lain: ion organik, enzim, asam amino, dan nutrisi dapat keluar. Apabila zat tersebut keluar bersamaan dengan air dan enzim serta nutrisi, maka metabolisme akan terhambat yang menyebabkan kematian sel.

Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol. Flavonoid mempunyai sifat efektif menghambat pertumbuhan virus, bakteri dan jamur. Mekanisme kerja flavonoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri dan mampu menghambat motilitas bakteri (Darsana *et al.*,(2012). Flavonoid mempunyai sifat bakteriostatik, tetapi pada konsentrasi semakin tinggi juga mampu untuk membunuh bakteri

gram negatif dan positif (Charyadie *et al.*,(2014)). Ditambahkan oleh Plectzar dan Chan (1986), bila senyawa aktif bekerja menghambat pertumbuhan bakteri dengan merusak dinding sel,maka dapat merubah permeabilitas sel, merubah molekul protein dan asam nukleat, serta menghambat kerja enzim, sintesis asam nukleat dan protein dari bakteri tersebut, sehingga menyebabkan kematian bakteri.

Senyawa terpenoid pada tumbuhan juga bermanfaat sebagai obat tradisional karena memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan antijamur (Thomson,1993). Menurut Ajizah (2004), mekanisme kerja terpenoid yaitu menghambat pertumbuhan bakteri dengan mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel dang mengubah permeabilitas membran sitoplasma sel. Perubahan-perubahan dan kerusakan yang terjadi mengakibatkan terganggunya sistem metabolisme sel dan kebocoran bahan-bahan intraseluler. Ditambahkan oleh Maryati *et al.*,(2007), bahwa mekanisme terpenoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri, yaitu senyawa aktif terpenoid membentuk antagonis pada permukaan sel yang menghambat proses transduksi suatu sinyal (faktor pertumbuhan) kedalam sel bakteri sehingga pertumbuhan sel akan terhambat.

## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

- Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi daun *Rhizophora mucronata* Lamk memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji yaitu *Vibrio parahaemolyticus* dan *Streptococcus agalactiae*. Konsentrasi terbaik dalam menghambat kedua bakteri uji adalah Fraksi A dengan konsentrasi 20000 ppm dengan rata-rata zona hambat sebesar  $4,86 \pm 0,66$  mm mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus*, dan rata-rata zona hambat yang terbentuk sebesar  $1,73 \pm 0,17$ mm mampu menghambat *Streptococcus agalactiae*. Adapun senyawa yang terkandung melalui uji fitokimia diantaranya adalah alkaloid, tanin, flavonoid, terpenoid, dan saponin. Dari uji LC-MS senyawa dugaan yang teranalisis adalah cevine, santonin, quercetin, Procyanidin B1, Rhoifolin, chrysin, dan robinin.

### 5.2 Saran

Untuk penelitian lebih lanjut disarankan untuk menggunakan senyawa isolat murni dari daun *Rhizophora mucronata* Lamk sehingga dapat benar-benar teridentifikasi senyawa bioaktif apa aja yang terkandung dalam daun *Rhizophora mucronata* Lamk yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba. Disarankan pula untuk dilakukan penelitian dengan menggunakan uji FTIR dan uji NMR sehingga senyawa bioaktif yang ditemukan bisa mendapatkan hasil yang lebih valid.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas Salmonella Typhimurium Terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L. Bioscientie. Vol 1(1) : 31-8.
- Agoramoorthy, G., dan Hsu, M.J. 2005. Borneo's Proboscis Monkey- A Study Of Diet Of Mineral And Phytochemical Concentrations. *Current Science*, Vol. 89, No. 3.
- Amir, S., A. Setiawan., A. Muchtar., A. Arif., B. Bahry., D. Tirza., H.R. Dewoto, dan L. Darmansjah. 1995. Farmakologi Dan Terapi. Gaya Baru. Jakarta. Hal: 572-573.
- Astarina, N. W. G., Astuti, K. W., Warditiani, N. K. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (Zingiber purpureum Roxb). Jurusan Farmasi Fakultas.
- Alfarobi, Abdul Hakim. 2010. Skripsi Aktifitas Bioaktif Pada Ekstrak Daun Bakau *Rhizophora mucronata* Terhadap Penghambatan Bakteri *Escherichia coli*. FPIk-THP. Universitas Brawijaya. Malang.
- Bachtiar S.Y., Wahyu. T dan Nanik S., 2012. Pengaruh Ekstrak Alga Coklat (Sargassum sp.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. *Journal of Marine and Coastal Science*. 1 (1): 53-60.
- Bandaranayake, WM. 2002. Traditional and Medicinal Uses of Mangroves. *Mangroves and Salt Marshes*. 2:133-148.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards., G.H. Fleet, dan M. Wootton. 1987. Food Science. A Course Manual In food Science.
- Budyanto, Ponco, dan Joni Kusnadi. 2012. Formulasi Edible Film Antibacterial Active Packaging Dengan Penambahan Ekstrak Antibakteri Daun Jati. *Jurnal. Universitas Brawijaya, Malang*.
- Cannell, R.J.P. 1998. Natural Produk Isolation. Humana Press, Totowa.
- Charyadie, F.L., S. Adi., dan R.P.Sari. 2014. Daya hambat Ekstrak Daun Alpukat (*Persea americana, Mill*) Terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. *Jurnal kedokteran Gigi*, Vol.8, No. 1
- Connors, K. A., Amidon, G.L., Stella, V. J., 1992. Stabilitas Kimiawi Sediaan Farmasi : Buku Pegangan bagi Tenaga Farmasi, Terjemahan Didik, G., Ed. 2, Semarang : IKIP Semarang Press, hal. 3 – 30, 163 – 71.
- Correll, D.S., B.G. Schubert., H.S. Gentry, and W. D. Hawley. 1955. The Search For Plant Precursors Of Cortisone. *Economic Botany*. 52:307-375.
- Davidson P.M., J.N. Sofos, A.I. Branen. 2005. Antimicrobial in Food third edition. New York. Taylor and Francis Group.

- Darmayasa, I.B.C., 2008. Daya Hambat Fraksinasi Ekstrak Sembung Delan (*Sphaerantus indicus* L.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Biologi*, 11 (2) : 74-77.
- Darsana I Gede Oka, Besung INK, Mahatmi Hapsari. 2012. Potensi Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Tenore) Steenis) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli* secara *In Vitro*. Indonesia. *Medicus Veterinus*, 1(3) : 351-337
- Dewi, R.S., N. D. Hapsari., dan S. Mulyani. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Dan Etanol Daun Sidaguri (*Sida Rhombifolia* L.) Terhadap Bakteri *Bacillus licheniformis* Lebih Besar Dari *Salmonella typhi*. Progam Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS. Surakarta.
- Djojopranoto, Riana. R. 2013. Daya Perendaman Radikan Bebas Ekstrak Etanol Daun Jambu Mente (*Anacardium occidentale* L) Terhadap DPPH (1,1- *Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*). *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*, Vol. 2. No. 2 (2013).
- Faikoh, E. N., Denok, E. K., Sari, S, dan Herlin, Q. A. 2013. Studi Daya Antibakteri Ekstrak Karang Lunak (*Geodia sp*) Segar Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Dan *Vibrio parahaemolyticus* Serta Kandungan Senyawa Aktifnya. *Jurnal Teknologi Pertanian*, Vol. 14 No.3: 201-208.
- Feliatra. 1999. Identifikasi Bakteri Patogen (*Vibrio sp*) Di Perairan Nongsa Batam Provinsi Riau. *Jurnal Natur Indonesia* 11(1).
- Felix, Feliatra., Nugroho, Titania T., Silalahi, Sila., Octavia, dan Yuslina. 2011. Skrining Bakteri *Vibrio sp*. Asli Indonesia Sebagai Penyebab Penyakit Udang Berbasis Teknik 16S Ribosomal DNA. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, Vol. 3(2): 85-99.
- Fretes, H.D., A.B. Susanto., B. Prasetyo., dan L. Limantara. 2012. Karotenoid dari Mikroalgae: Potensi Kesehatan Aplikasi dan Bioteknologi. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol.XXIII, No.2. Hal: 221-228.
- Gamse,T. 2002. Liquid-Liquid Extraction And Solid-Liquid Extraction. Graz University Of Technology.
- Gandjar, I.G., dan A. Rohman. 2007. Kimia Farmasi Analisis. PT: Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Gaylord Chemical Company, L. L. C. 2007. Dimethyl sulfoxide (DMSO): Health And Safety Information. Gaylord Chemical Company, L. L. C. Bulletin 106:1-16.
- Guenther, E. 1987. Minyak Atsiri Jilid 1. Penerbit UI Press. Jakarta.

- Gunarto, Muliani, Hidayat. S., Sahabuddin, dan Ery. S. 2010. Pemanfaatan Daun Tanaman Mangrove *Rhizophora mucronata* dan *Avicennia sp* Pada Budidaya Udang Windu Pola Intensif. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau. Balai Penelitian dan Pengembangan Kelautan dan Perikanan. Kementerian Kelautan Dan Perikanan.
- Gurtovenko, A.A., dan J. Anwar. 2007. Modulating The Structure And Properties Of Cell Membranes: The Molecular Mechanism Of Action Of Dimethyl Sulfoxide. *Journal Of Physical Chemistry*. Vol. 111:10453-10460.
- Han, H., L. Ling, Y. Yang-hua, W. Xiao-hua, dan P. Min-xiang. 2012. Triterpene Glycosides From Sea Cucumber *Holothuria scabra* with Cytotoxic Activity. *Journal of Chinese Herbal Medicines* 4 (3) : 183-188.
- Harborne JB. 1984. Metode Fitokimia. Padmawinata K, Soediro I. Bandung: ITB Press. Terjemahan dari: Phytochemical method 2nd. (Hal.69-73; 102-104; 147-149; 184- 187; 271-274)
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Terjemahan Padmawinata, K. Penerbit ITB. Bandung. 354 hlm.
- Hardi, E.H., Sukenda, Enang Haris, dan Angela Mariana L. 2011. Toksisitas Produk Ekstrasellular (ECP) *Streptococcus agalactiae* Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Natur Indonesia* 13(3), Juni 2011: 187-199.
- Hardiningtyas, S.D. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak *Sarcophyton* sp. yang Difragmentasi dan Tidak Difragmentasi di Perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 67 hlm.
- Hery, P. 2004. Potensi Mangrove Sebagai Tanaman Obat. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Jawetz, E., J. L. Melnick, and E. Adelberg. 2001. Medical Microbiology 22nd Ed. McGraw-Hill Companies Inc. New York. Hlm 235-237.
- Joyce, J. E., Philip, H.K., David, J.P., dan Jhon, F.B. 2009. Human *Streptococcus agalactiae* Isolate In Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerging Infectious Diseases Journal*, Vol.15 No.5 (2009).
- Keeley, Martin. A. 2007. Hutan Mangrove Yang Menakutkan. Buku Panduan Pendidikan Lingkungan Hidup Berbasis Kurikulum (*Marvelous Mangrove In The Cayman Island: A Curicullum Based Teacher*). Mangrove Action Project-Indonesia. UGM. Yogyakarta.
- Khopkar, S.M. 2003. Konsep Dasar Kimia Analitik. Terjemahan Saptoharjdo. PT. UI Press. Jakarta.
- Kristianingrum, Susila.----. Handout Spektroskopi Ultra Violet Dan Sinar Tampak (Spektroskopi Uv – Vis). UNY.Yogyakarta.
- Kustanti, Asihing. 2011. Manajemen Hutan Mangrove. PT: IPB Press. Bogor.

- Lamothe, R.G. 2009. Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens. *Int. J. Mol. Sci* 10 : 3400-3419.
- Lay, B.H. 1994. Analisis Mikroba Di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Liaw WJ, Shung TH, Jhi JW, Oliver YPH, Jih HL. 1998. Determination of morphine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: application to human and rabbit pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography*. 714(2):273-245.
- Manitto, P. 1981. Biosintesis Produk Alami. Terjemahan : Koensoemardiyah. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Marlina. 2004. Penelitian Karakteristik Molukuler Bakteri *Vibrio Parahaemolyticus* Dari Sampel Air Laut Dan Uji Resistensi Antibiotiknya. Fakultas MIPA- Universitas Andalas.
- Markham, K.R. 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoid. Penerjemah: Kokasih,P. ITB. Bandung.
- Marnoto, T., Gogot. H., Dewi. G., dan Fendy A.P. 2012. Ekstraksi Tannin Sebagai Bahan Pewarna Alami Dari Tanaman Putri Malu (*Mimosa pudica*) Menggunakan Pelarut Organik. *Reaktor*, Vol. 14, No. 1. Hal:39-45.
- Matsuno, Takao dan Miyuki Tsushima. 1995. Comparative Biochemical Studies Of Carotenoids In Sea Cucumbers. *Journal of Comp Biochem Physiol* 111b (4) : 597-605.
- Melki., Wike Ayu.E.P., dan Kurniawati. 2011. Uji Anti Bakteri Ekstrak *Gracilaria sp* (Rumput Laut) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Prodi Ilmu Kelautan. FMIPA. Universitas Sriwijaya.
- Muchtadi D. 1989. Aspek Biokimia dan Gizi dalam Keamanan Pangan. Bogor: Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor (Hal. 89-90).
- Neal, M.J. 2007. At A Glance Farmakologi Medis. PT: Erlangga. Jakarta. Hal:124.
- Ningsih, Dian Riana., Warsinah, dan Suwandari. 2006. Fraksinasi Ekstrak Metanol Kulit Batang *Rhizophora mucronata* Dan Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Molekul*, Vol. 1. No. 1, November, 2006: 30-35.
- Nurchayati, Ois. 2014. Skripsi Aktivitas Antimalaria Ekstrak Daun Baru Laut (*Thespesia populnea* (L) *Soland Ex correa*) Pada *Muc musculus* Terinfeksi *Plasmodium berghei* Dan Karakteristik Hasil Isolasinya. Fak. Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Bengkulu. Bengkulu.
- Noviyanti, Lenia. 2010. Skripsi Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom Untuk Pemisahan Trigliserida Dari Estrak Buah Merah (*Pandanus conoidens* Lamk). FMIPA. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.

- Oktavianus, Satria. 2013. Skripsi Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Mangrove Jenis *Avicennia marina* Terhadap Bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. FPIK. Universitas Hasanudin. Makassar.
- Oktaviani, Maulida. 2011. Skripsi Penggunaan metode Freezing (-4°C) Dengan Konsentrasi DMSO 5% Untuk Preservasi Strain-Strain *Nostoc* (Vaucher 1803) Bornet Et Flahault 1886. FMIPA. UI. Depok. Jakarta.
- Palleros, D. R. 2000. Experimental Organic Chemistry. John Willey and Sons. New York.
- Pratt, DE, Hudson B.J.F. 1990. Natural Antioxidant Not Exploited Commercially. Di dalam: Hudson B.J.F, editor. Food Antioxidant. London: Elsevier Applied Science. hlm. 230-429.
- Pelczar, M.J dan E. C. S Chan. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi Edisi ke-5 Jilid 1. Terjemahan Sri, R.H *et al.* Penerbit Universitas Indonesia Press. Jakarta. 88 hlm.
- Plantmor. 2012. Klasifikasi *Rhizophora mucronata* Lamk. [www.plantamor.com](http://www.plantamor.com). Diakses 21 September 2014.
- Prajitno, Arief. 2008. Penyakit Ikan- Udang Virus. UM Press. Malang.
- Priyanto, Adi Riyan. 2012. Skripsi Aktivitas Antioksidan Dan Komponen Bioaktif Pada Buah Bakau (*Rhizophoramucronata* Lamk). FPIK-IPB. Bogor.
- Rahayu, I.D. 2007. Produksi Antibiotik Alami Hasil Isolasi Aloe barbadensis Miller :Penanggulangan Mastitis pada Sapi Perah. Laporan Penelitian Hibah.
- Rahayu, Elvi. 2012. Skripsi Aktivitas Gabungan Ekstrak Bakau (*Rhizophora apiculata*), Alamanda (*Allamanda schottii*) Dan Binahong (*Anredera cordifolia*) Terhadap Enzim Tirosinase. FMIPA. IPB. Bogor.
- Ratnawati, Devi., Evi. M., dan Afriana, MS. 2012. Aplikasi Ekstrak Umbi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas var ayamurasaki*) Sebagai Pengawet Dan Perna Alami Tahu. *Jurnal Gradien*, Vol. 8. No.2. Juli 2012: 825-831.
- Retnowati, Yuliana., Nurhayati Bialangi, dan Nona Wingti Posangi. 2011. Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Media Yang Di Ekspos Dengan Infus Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*). *Jurnal Saintek*, Vol.6, No. 2. 2011.
- Rinawati, Nanin Dwi. 2011. Skripsi Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujete* L) Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*. ITS-Surabaya.
- Roihanah, S, Sukoso, Andayani, S. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria sp.* Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara In Vitro. *J. Exp. Life Sci.* 2 (1) : 1-5.

- Rohaeti, E., Batubara, I., Lieke, A., dan Darusman, LK. 2010. Potensi Ekstrak *Rhizophora* sp. Sebagai Inhibitor Tirosinase. Prosiding Semnas Sains III. IPB. Bogor.
- Rohman.2007. Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar: Yogyakarta.
- Saparinto, Cahyo. 2007. Pendayagunaan Ekosistem Mangrove – Mengatasi Kerusakan Wilayah Pantai (Abrasi) Meminimalisasi Dampak Gelombang Tsunami. PT. Dhara Prize:Semarang.
- Sari, D.K. 2008. Penapisan Antibakteri dan Inhibitor Topoisomerase I dari *Xylocarpus granatum*. Tesis. ITB. Bogor.
- Schofield, P., Mbugua, D.M, and Pell, A.N. 2001. Analysis of Condensed tannins: a Review, *Animal Feed Science and technology*, 91, pp. 21-40.
- Sheehan Brian. 2009. Streptococcal diseases in farmed tilapia. *Aquaculture Asia pacific*. 5 (6).
- Skoog, D.A. and D.M. West. 1971. Principles of instrumental analysis. Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York.
- Siswandono. 2000. Kimia Medical. PT. Airlangga University Press. Surabaya. Hal: 124.
- Sirait M. 2007. Penuntun Fitokimia dalam Farmasi. Bandung: Institut Teknologi Bandung (Hal. 55-69; 93-122; 131-133; 147-148).
- Siregar, A. F., Agus. S., dan Delianis, P.2012. Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut Terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermis*, dan *Micrococcus luteus*. *Journal Of Marine Research*. Vol. 1. No. 2. Hal: 152-160.
- Soesanto, Loekas. 2006. Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman. Rajawali Press. PT. Raja Grafindo Perkasa. Yogyakarta.
- Sudarmadji. 2004. Deskripsi Jenis-Jenis Anggota Suku *Rhizophoraceae* Di Hutan Mangrove Taman Nasional Baluran Jawa Timur. *Biodiversitas*, Vol. 5. No. 2. Hal: 66-70.
- Suharto, M. A.P., Hosea. J.D, dan Jovie, M. D. 2012. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Saponin Dari Ekstrak Metanol Batang Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var. *Sapientum* L). Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT dan Politeknik Kesehatan Kemenkes, Manado.
- Sinulingga, S.E. 2011. Isolasi Dan Karakteristik Senyawa Steroid / Triterpenoid Dari Akar Tanaman Ekor Naga (*Rhaphidophora pinnata* Schott). Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Sum, A. K. & J. J. Pablo. 2003. Molecular Simulation Study On The Influence Of Dimethylsulfoxide On The Structure Of Phospholipid Bilayers. *Biophysical Journal* 85: 3636--3645.

- Suryawiria, U. 1978. Mikroba Lingkungan Edisi ke-2. ITB. Bandung.
- Suryati, Emma., Rosmiati., dan A. Tenriulo. 2007. Penanggulangan Penyakit Bakteri Pada Udang Windu (*Penaeus monodon*) Menggunakan Bioaktif Tanaman Mangrove *Avicenia alba*. *Jurnal Marina Chimia Acta*. Vol.2, No.2. Hal: 19-23.
- Susanti, A.D., Dwi. A., Gita. G.P., dan Yosephin. B.G. 2012. Polaritas Pelarut Sebagai Pertimbangan Dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak Bekatul Dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza Sativa Glatinosa*). *Simposium Nasional RAPI XI FT UMS-2012*.
- Susanto, W. H. 1999. Teknologi Lemak dan Minyak Makan. Jurusan THP Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Tarigan, J. B., Zuhra, C. F, dan Sihotang, H. 2008. Skrining Fitokimia Tumbuhan yang Digunakan Oleh Pedagang Jamu Gendong Untuk Merawat Kulit Wajah di Kecamatan Medan Baru. *Jurnal Biologi Sumatera*. 3: 1-6.
- Thompson, J., R. Walker, D. Faulkner. 1985. Screening And Bioassays For Biologically-Active Substances From Forty Marine Sponge Species From San Diego, California, USA. *Journal of Mar. Biol.* 88 : 11–21.
- Tohir, A. M. 2010. Teknik Ekstraksi Dan Aplikasi Beberapa Pestisida Nabati Untuk Menurunkan Palatabilitas Ulat Grayak (*Spodoptera litura fabr*). *Buletin Teknik Pertanian*. 15(1): 37-40.
- Trianto, Agus., Edi W., Suryono, dan Rahayu S. S. 2004. Ekstrak Daun Mangrove *Aegiceras corniculatum* Sebagai Antibakteri *Virio harveyi* dan *Vibrio parahaemolyticus*. *Jurnal Ilmu Kelautan*, Desember 2004, Vol. 9(4): 186-189.
- Turner, J.W. 2013. *Vibrio parahaemolyticus*. Armbrust Lab.
- Ubio. 2014. Klasifikasi Bakteri *Streptococcus agalactiae*. [www.ubio.org/classificationbank/streptococcusagalactiae](http://www.ubio.org/classificationbank/streptococcusagalactiae). Diakses 21 september 2014.
- Vogeser, M, dan Christoph Seger. 2008. A Decade Of Hplc-Ms/Ms In The Routine Clinical Laboratory-Goals For Futher Development. *Journal of Chlinical Biochemistry Rev* 41 : 649-662.
- Welly, M., Wira M., I. Nyoman. S., dan Dewa N. A. 2010. Identifikasi Flora Dan Fauna Mangrove Nusa Lembongan Dan Nusa Ceningan. Coral Triangle (CTC) dan Balai Pengelola Hutan Mangrove Wilayah I (BPHMW I)- Nusa Penida.
- Wijayani, Cintya. 2008. *Streptococcus agalactiae*. Fakultas Farmasi. Universitas Samata Dharma. Yogyakarta. [www.mikrobia.wordpress.com](http://www.mikrobia.wordpress.com). Diakses tanggal 21 September 2014.
- Yasmon, A. 2000. Sensitifitas *Vibrio parahaemolyticus* Terhadap Ekstrak Mangrove *Rhizophora apiculata* Di Dalam Lumpur Dan Air Laut. Skripsi Sarjana FPIK Universitas Riau. Riau. Hal:37.



## LAMPIRAN

**Lampiran1. Prosedur pembuatan DMSO 10% dan Konsentrasi****• Pembuatan DMSO 10 %**

$DMSO\ 100\ \% \times 1\ ml\ stok = DMSO\ 10\ \% \times (x)\ ml$

$$(x)\ ml = \frac{DMSO\ 100\ \% \times 1\ ml}{DMSO\ 10\ \%}$$

$$(x)\ ml = 10\ ml$$

Jadi sebanyak 1 ml DMSO 100 % dilarutkan dengan aquadest hingga volume 10 ml.

**• Pembuatan Konsentrasi**

$$1\ ppm = \frac{1\ mg}{1000\ ml}$$

**Konsentrasi 20000 ppm**

$$20000\ ppm = \frac{20000\ mg}{1000\ ml} = \frac{200\ mg}{10\ ml}$$

Jadi sebanyak 200 mg sampel Fraksi dilarutkan kedalam 10 ml DMSO 10%.

**Konsentrasi 10000 ppm**

$$10000\ ppm = \frac{10000\ mg}{1000\ ml} = \frac{100\ mg}{10\ ml}$$

Jadi sebanyak 100 mg sampel Fraksi dilarutkan kedalam 10 ml DMSO 10%.

**Konsentrasi 5000 ppm**

$$5000\ ppm = \frac{5000\ mg}{1000\ ml} = \frac{50\ mg}{10\ ml}$$

Jadi sebanyak 50 mg sampel Fraksi dan antibiotik amoksisilin dilarutkan kedalam

10 ml DMSO 10%

Lampiran 2. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



Hasil Fraksi Botol 1-9



Lampiran 3. Hasil Uji Fitokimia Daun *Rhizophora mucronata* Lamk



(a). Tanin



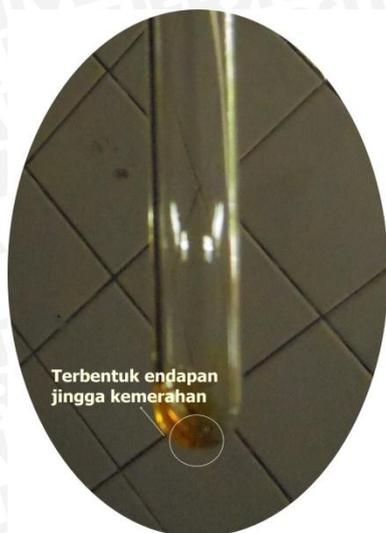
(b). Terpenoid



(c). Saponin



(d). Flavonoid



(e). Alkaloid – Reagen Dragendroff



(f). Alkaloid – Reagen Mayer



(g). Alkaloid – Reagen Wagner

#### Lampiran 4. Hasil Zona Hambat

##### A. Zona Hambat Ekstrak Daun Mangrove *R.mucronata* Lamk Terhadap Bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

FRAKSI	KONSENTRASI (ppm)	PERLAKUAN			
		Vibrio parahaemolyticus			
		I		II	
		a	b	a	b
A	5000	3,45	3,05	3,075	2,7
	10000	3,45	3,45	4,675	3,45
	20000	4,75	4,025	5,05	5,6
B	5000	0,675	0,625	0,675	0,675
	10000	1,15	0,8	2,05	1,15
	20000	1,75	1,39	2,775	2,05
Amox A (+)	5000	10,05	8,75	9,05	8,75
Amox B (+)	5000	3,7	3,625	3,625	3,45

##### B. Zona Hambat Ekstrak Daun Mangrove *R.mucronata* Lamk Terhadap Bakteri *Streptococcus agalactiae*

FRAKSI	KONSENTRASI (ppm)	PERLAKUAN			
		Streptococcus agalactiae			
		I		II	
		a	b	a	b
A	5000	0,95	0,69	1,08	1,58
	10000	0,85	1,61	0,075	1,6
	20000	1,65	2,05	1,15	2,05
B	5000	0,05	0,05	0,175	0,05
	10000	0,25	0,1	0,175	0,675
	20000	1,05	1,65	1,15	1,15
Amox A (+)	5000	3.45	3.05	3,5	3,58
Amox B (+)	5000	4.32	4.37	2,98	3,14

### Lampiran 5. Analisa Keragaman (ANOVA) Penelitian Utama

#### • Data Hasil Pengamatan Zona Bening Bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

FRAKSI	PERLAKUAN KONSENTRASI	V.parahaemolyticus		TOTAL	Rerata	ST.DEV
		I	II			
A	5000 ppm	3,25	2,89	6,14	3,07	0,25456
	10000 ppm	3,45	4,06	7,51	3,76	0,43134
	20000 ppm	4,39	5,33	9,72	4,86	0,66468
B	5000 ppm	0,65	0,68	1,33	0,67	0,02121
	10000 ppm	0,98	1,6	2,58	1,29	0,43841
	20000 ppm	1,57	2,41	3,98	1,99	0,59397
Amox A(+)	5000ppm	9,4	8,9	18,3	9,15	0,23442
Amox B(+)	5000ppm	3,66	3,54	7,2	3,60	0,23706
TOTAL		27,35	29,41	31,26		

#### • ANOVA

SK	db	JK	KT	F hit	F5%	F1%
ULANGAN	1	0,602				
PERLAKUAN:	5	25	5	39,68254	5,05	10,97
FRAKSI	1	19,97	19,97	158,492***	6,61	16,26
KONSENTRASI	2	4,9	2,45	19,444**	5,79	13,27
FRAKSIKONSENTRASI	2	0,13	0,065	0,51587tn	5,79	13,27
GALAT	5	0,63	0,126			
TOTAL	11	26,232				

\*\*\*: Berbeda sangat nyata

\*\* : Beda nyata

tn: Tidak nyata

Karena perlakuan (FRAKSIKONSENTRASI) tidak nyata, maka untuk menentukan fraksi dan konsentrasi terbaik maka dicari dengan perlakuan fraksi dan perlakuan konsentrasi yang berbeda nyata. Dari perlakuan fraksi Fhit (158,492) > F 5% (6,61) artinya perlakuan fraksi sangat berbeda nyata. Untuk menentukan fraksi terbaik dalam menghambat bakteri uji dilakukan uji lanjutan. Uji lanjutan yang digunakan adalah uji BNJ 5%. Dimana BNJ 5% untuk perlakuan fraksi adalah sebesar 0,53. Sedangkan untuk perlakuan konsentrasi F hit (19,444) > F 5% (5,79) yang artinya berbeda nyata.

#### Lanjutan Lampiran 5.

Untuk menentukan konsentrasi terbaik yang digunakan juga dilakukan uji lanjutan BNJ 5%, dengan hasil BNJ 5% untuk konsentrasi sebesar 0,82.

- **Perhitungan BNJ 5% untuk Notasi Fraksi**

$$\text{BNJ 5\%} = Q_{\alpha} \left( \frac{p}{db \text{ galat}} \right) \times \sqrt{\frac{\text{KT galat}}{\text{ulangan} \times \text{level konsentrasi}}} = 3,635 \times \sqrt{\frac{0,126}{2 \times 3}} = 0,53$$

**Tabel Notasi Fraksi BNJ 5% terhadap Bakteri *Vibrio parahaemolyticus***

NOTASI FRAKSI	Rerata	1,315	3,895	NOTASI
FRAKSI B	1,315	-		a
FRAKSI A	3,895	2,58	-	b

- **Perhitungan BNJ 5% untuk Notasi Konsentrasi**

$$\text{BNJ 5\%} = Q_{\alpha} \left( \frac{p}{db \text{ galat}} \right) \times \sqrt{\frac{\text{KT galat}}{\text{ulangan} \times \text{level fraksi}}} = 4,602 \times \sqrt{\frac{0,126}{2 \times 2}} = 0,82$$

**Tabel Notasi Konsentrasi BNJ 5% terhadap Bakteri *Vibrio parahaemolyticus***

NOTASI KONSENTRASI	Rerata	1,87	2,52	3,34	NOTASI
5000ppm	1,87	-			a
10000ppm	2,52	0,65	-		a
20000ppm	3,34	1,47	0,82	-	ab

Dari hasil notasi yang terbentuk, disimpulkan Konsentrasi 20000 ppm memiliki potensi yang lebih baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Kesimpulan akhir yang diperoleh, fraksi A dengan konsentrasi 20000ppm merupakan fraksi dan konsentrasi terbaik atau teraktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus*.

### Lanjutan Lampiran 5.

- **Data Hasil Pengamatan Zona Bening Bakteri *Streptococcus agalactiae***

PERLAKUAN	S.agalacticae	TOTAL RERATA		ST.DEV		
		I	II			
FRAKSI	KONSENTRASI					
A	5000ppm	0,82	1,33	2,15	1,08	0,360624
	10000ppm	1,23	0,84	2,07	1,04	0,275772
	20000ppm	1,85	1,6	3,45	1,73	0,176777
B	5000ppm	0,05	0,12	0,17	0,09	0,049497
	10000ppm	0,18	0,43	0,61	0,31	0,176777
	20000ppm	1,35	1,15	2,5	1,25	0,141421
Amox A(+)	5000ppm	3,25	3,54	6,79	3,40	0,108297
Amox B(+)	5000ppm	4,34	3,06	7,4	3,70	0,076197
TOTAL		13,07	12,07	10,95		

- **ANOVA**

SK	db	JK	KT	F HIT	F 5%	F 1%
ULANGAN	1	0,002				
PERLAKUAN:	5	3,741	0,7482	12,9446	5,05	10,97
FRAKSI	1	1,61	1,61	27,8547**	6,61	16,26
KONSENTRASI	2	2,003	1,0015	17,3270**	5,79	13,27
FRAKSIKONSENTRASI	2	0,128	0,064	1,1073tn	5,79	13,27
GALAT	5	0,289	0,0578			
TOTAL	11	4,032				

\*\* : sangat berbeda nyata      tn : tidak nyata

Karena perlakuan Fraksi Konsentrasi dari hasil ANOVA tidak nyata, maka untuk menentukan fraksi dan konsentrasi terbaik dicari melalui perlakuan Fraksi dan perlakuan Konsentrasi. Pada perlakuan Fraksi F Hit (27,8547) > F 5% (6,61) artinya berbeda sangat nyata. Untuk menentukan fraksi terbaik dalam menghambat bakteri *Streptococcus agalactiae* dilakukan dengan uji lanjutan. Uji lanjutan yang digunakan adalah uji BNJ 5%. Dimana hasil BNJ 5% untuk fraksi adalah 0,36. . Sedangkan untuk perlakuan Konsentrasi F hit (17,3270) > F 5% (5,79), artinya berbeda sangat nyata. Dengan BNJ 5% untuk Konsentrasi sebesar 0,55, sehingga notasi yang dihasilkan dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

- **Perhitungan BNJ 5% untuk Notasi Fraksi**

$$\text{BNJ } 5\% = Q_{\alpha \left( \frac{p}{db \text{ galat}} \right)} \times \sqrt{\frac{\text{KT galat}}{\text{ulangan} \times \text{level konsentrasi}}} = 3,635 \times \sqrt{\frac{0,0578}{2 \times 3}} = 0,36$$

**Tabel Notasi Fraksi BNJ 5% terhadap Bakteri *Streptococcus agalacticae***

NOTASI FRAKSI	Rerata	0,55	1,28	NOTASI
FRAKSI B	0,55	-		a
FRAKSI A	1,28	0,73	-	b

- **Perhitungan BNJ 5% untuk Notasi Konsentrasi**

$$\text{BNJ } 5\% = Q_{\alpha \left( \frac{p}{db \text{ galat}} \right)} \times \sqrt{\frac{\text{KT galat}}{\text{ulangan} \times \text{level konsentrasi}}} = 4,602 \times \sqrt{\frac{0,0578}{2 \times 2}} = 0,55$$

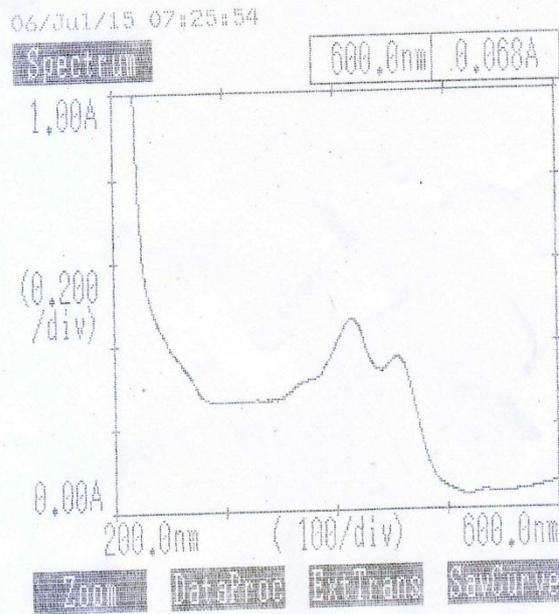
**Tabel Notasi Konsentrasi BNJ 5% terhadap Bakteri *Streptococcus agalacticae***

NOTASI KONSENTRASI	Rerata	0,58	0,67	1,49	NOTASI
5000ppm	0,58	-			a
10000ppm	0,67	0,09	-		a
20000ppm	1,49	0,91	0,82	-	b

Dari notasi yang terbentuk maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi terbaik untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. agalacticae* sebesar 20000ppm. Dari hasil tersebut, kesimpulan akhir yang diperoleh yaitu fraksi A dengan konsentrasi 20000ppm merupakan fraksi dan konsentrasi terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. agalacticae*.

Lampiran 6. Hasil Analisa Spektrofotometer UV-Vis

Sampel A  
Pengenceran  
50x



06/Jul/15 07:26:16

Peak detection

Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
535,0	0,047		
456,5	0,366		
415,5	0,459		
209,0	3,101		

Graph PrintOut Valley

**Lampiran 7. Hasil Analisa LC-MS**

Berlian Septyara Sampel A

LC MS –ESI pos ion

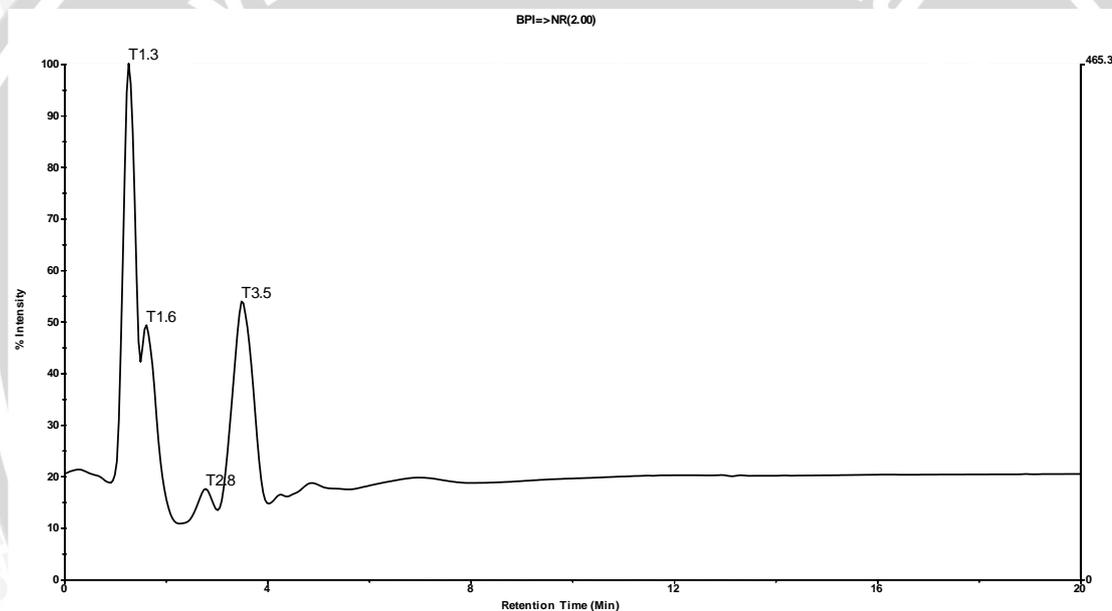
Vol injection 2 ul

Flow 0.1 ml/min

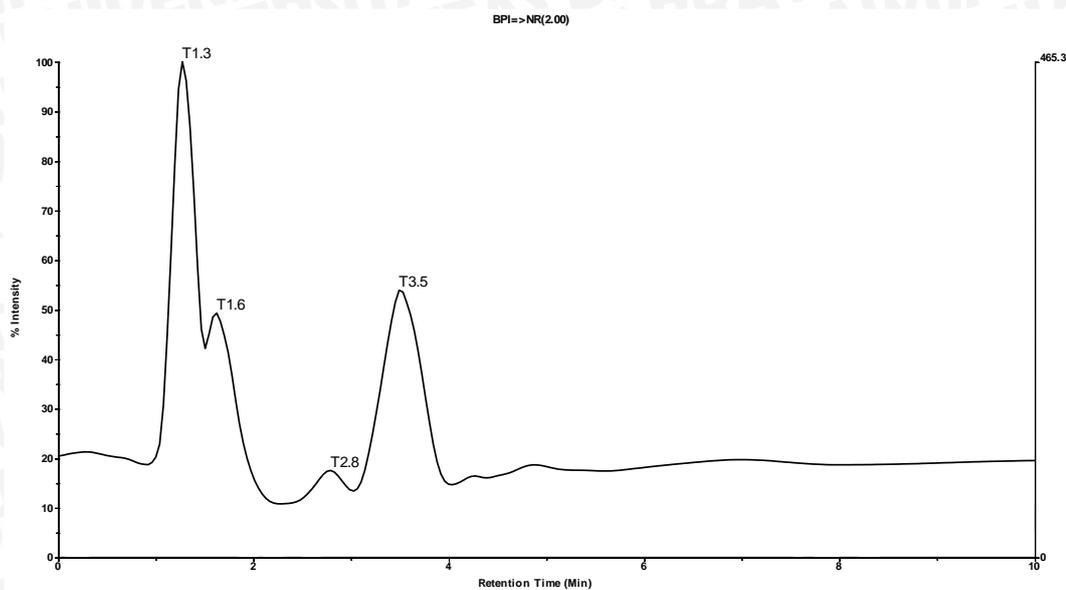
Collumn C-18 (15mm x 1 mm)

Eluent MeOH

Operating by : Puspa D N Lotulung

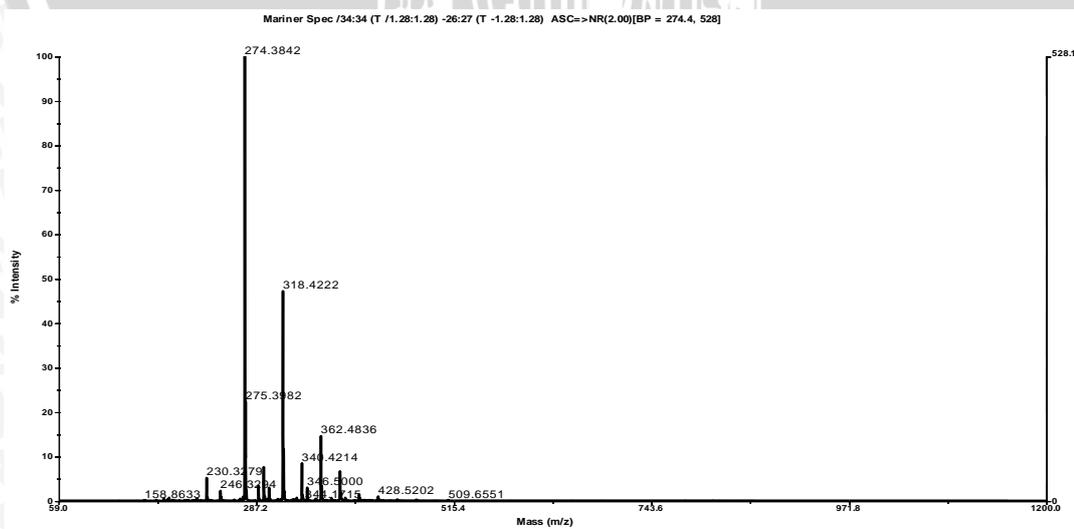


Lanjutan Lampiran 7.

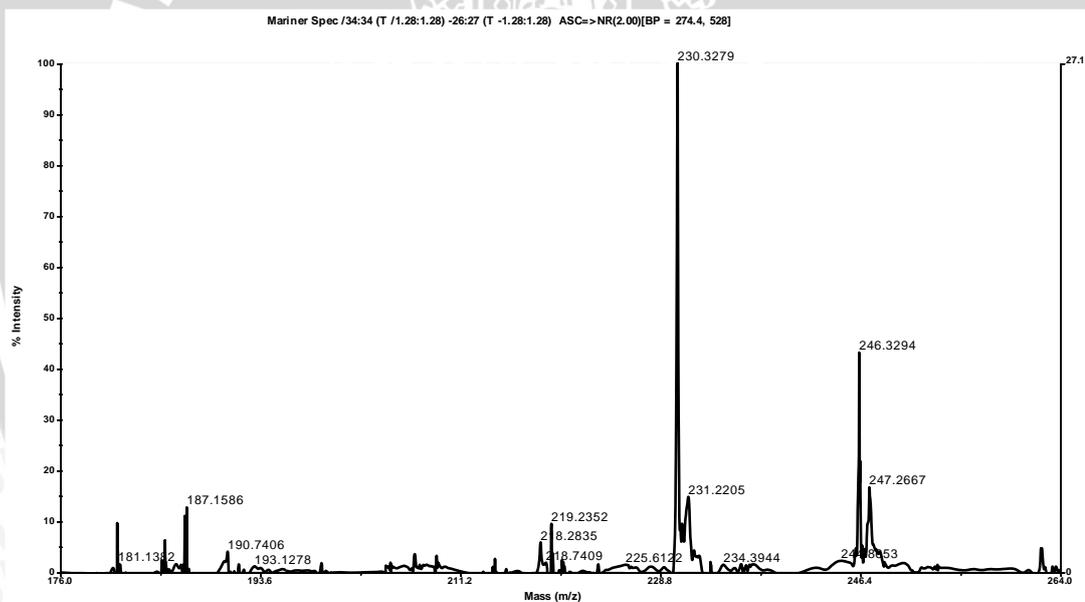
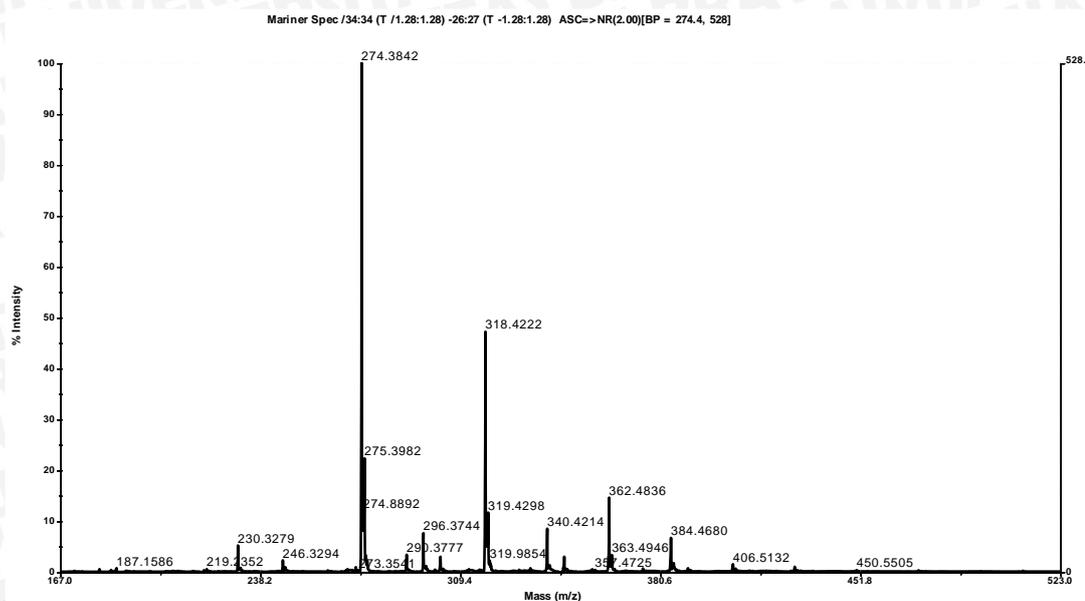


Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	1.276500	1.005283	1.471450	465	2568.89
2	1.628000	1.549567	2.212350	229	1450.18
3	2.796350	2.329183	2.990800	81	271.76
4	3.496200	3.068750	4.001583	251	2195.1

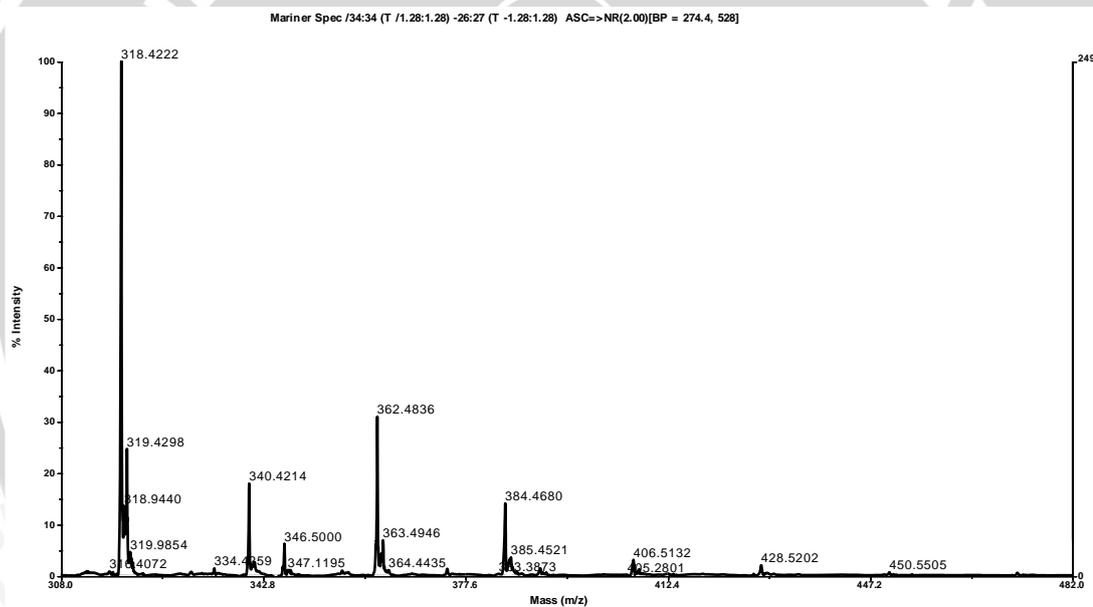
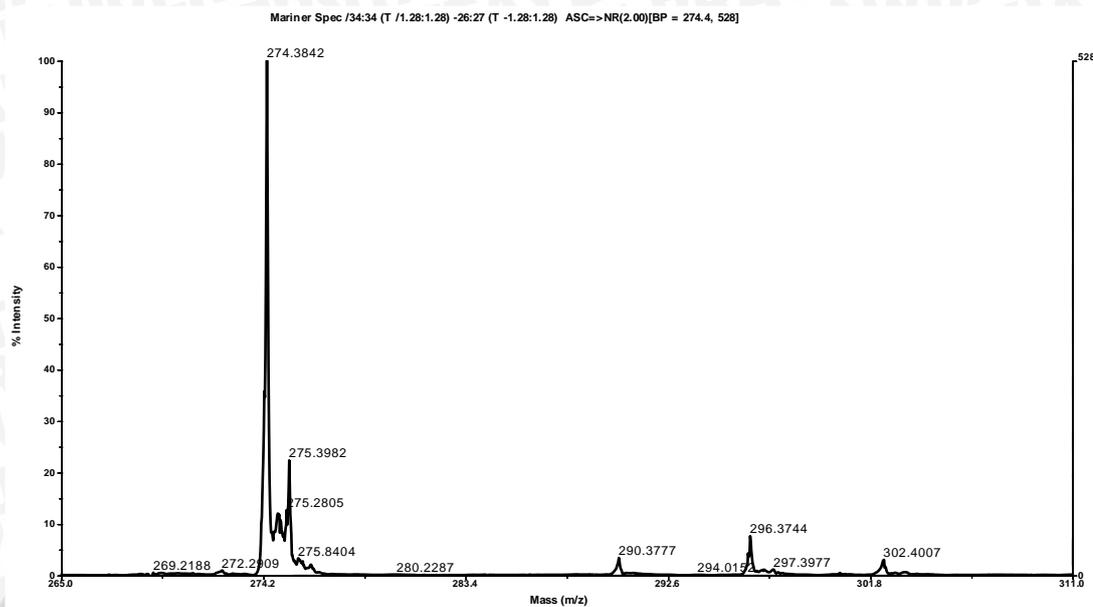
Rt 1.27



Lanjutan Lampiran 7.

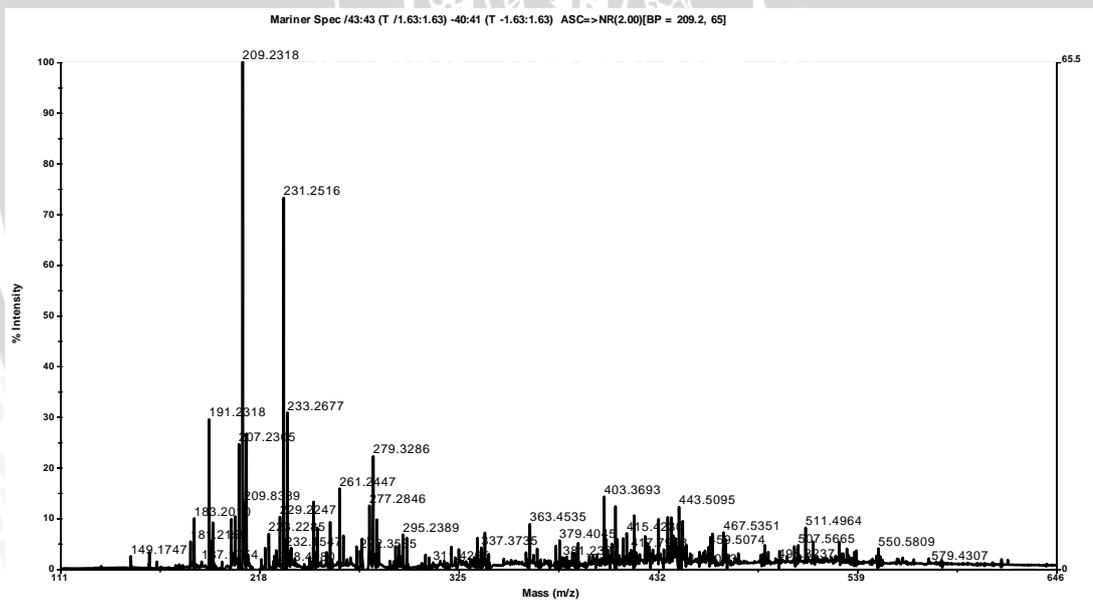
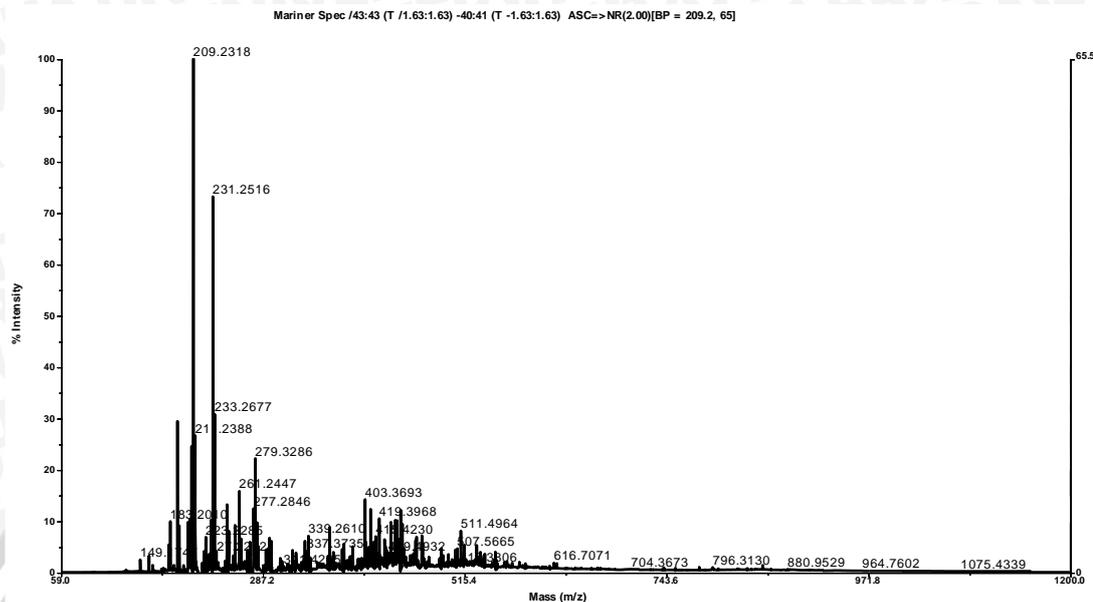


Lanjutan Lampiran 7.



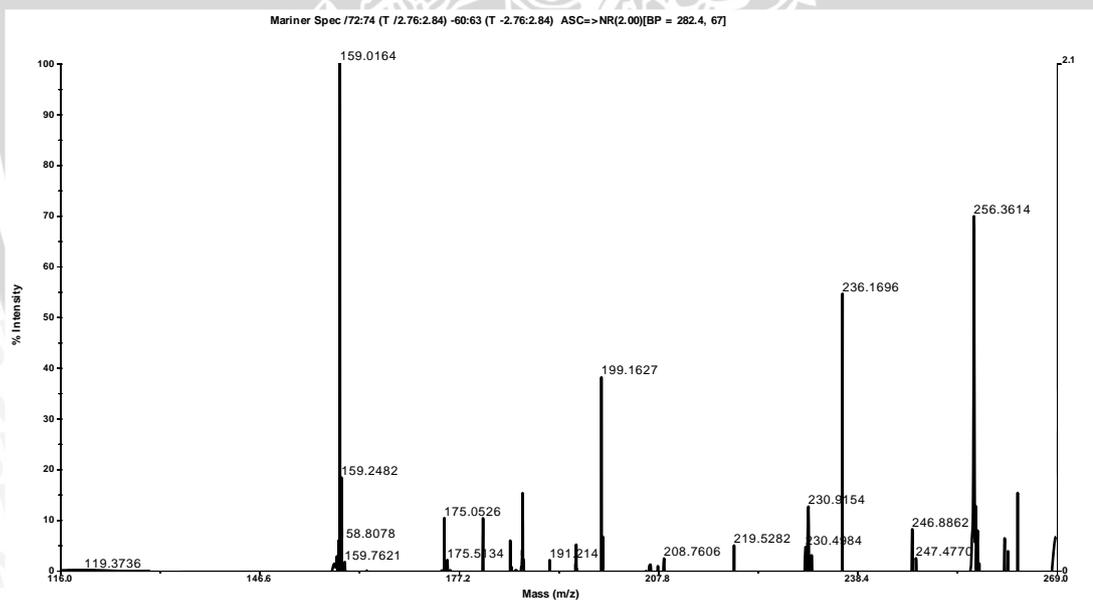
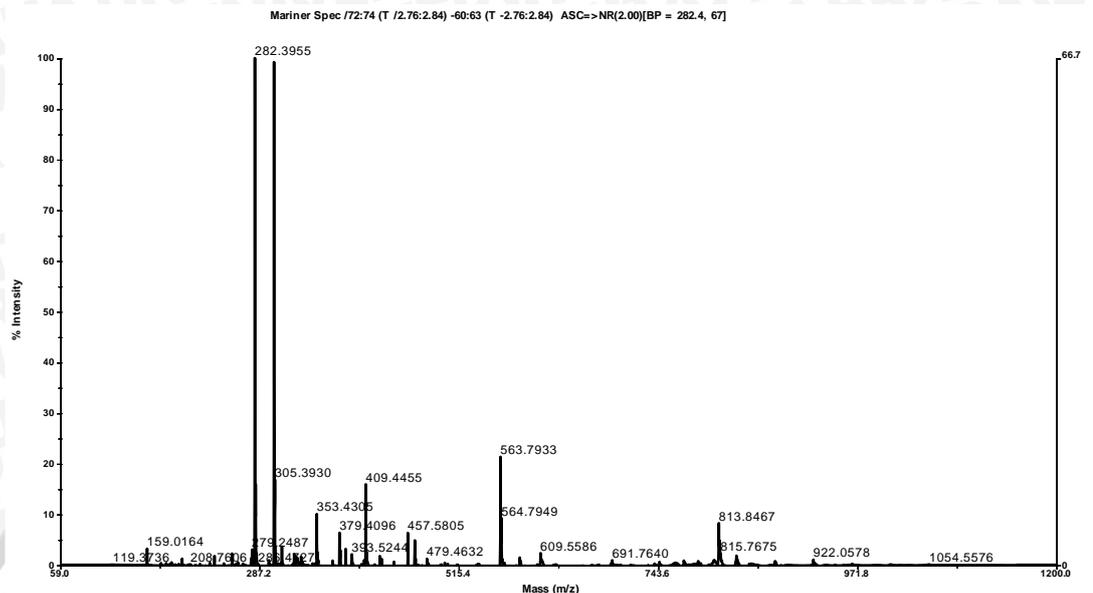
Lanjutan Lampiran 7.

Rt 1.62

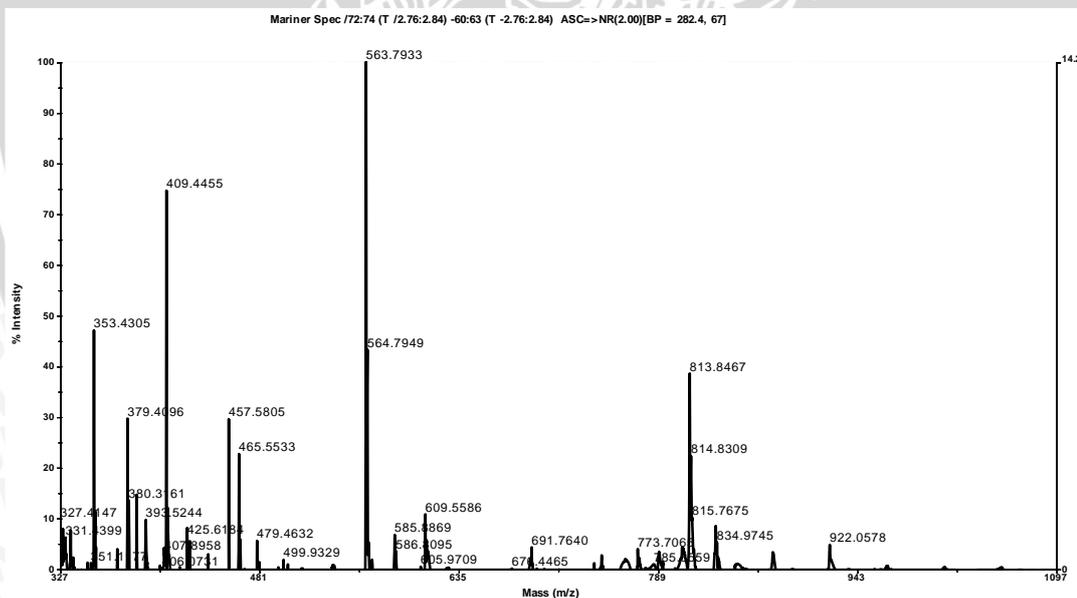
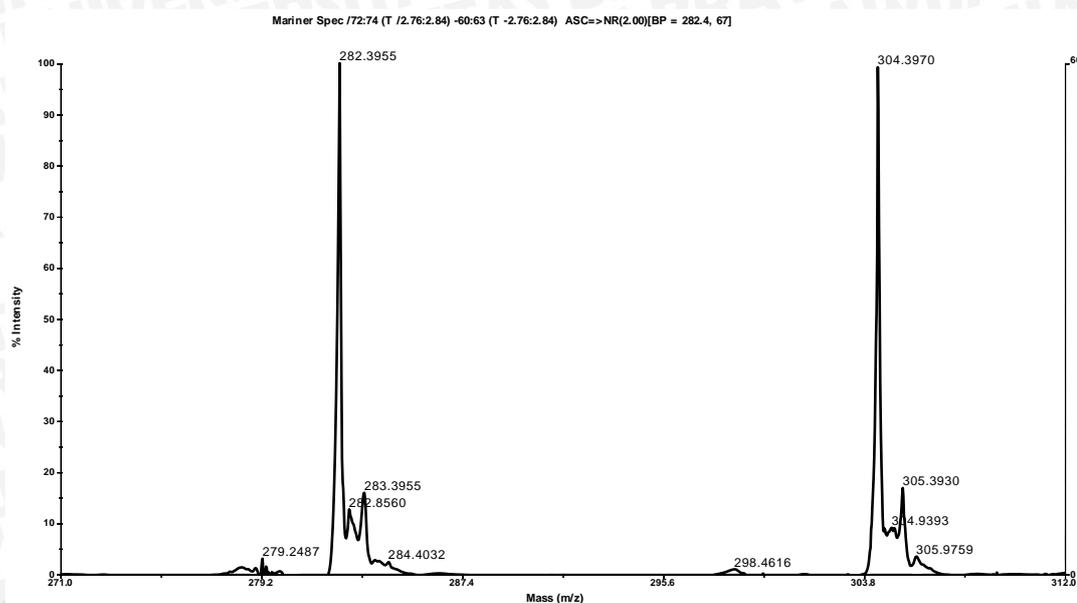


Lanjutan Lampiran 7.

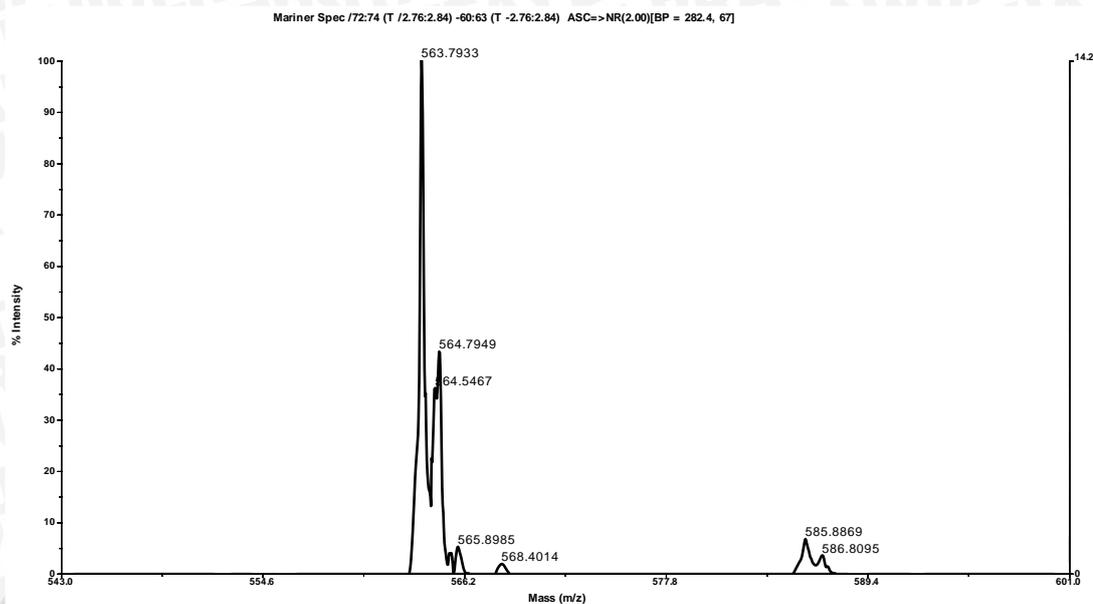
Rt 2.79



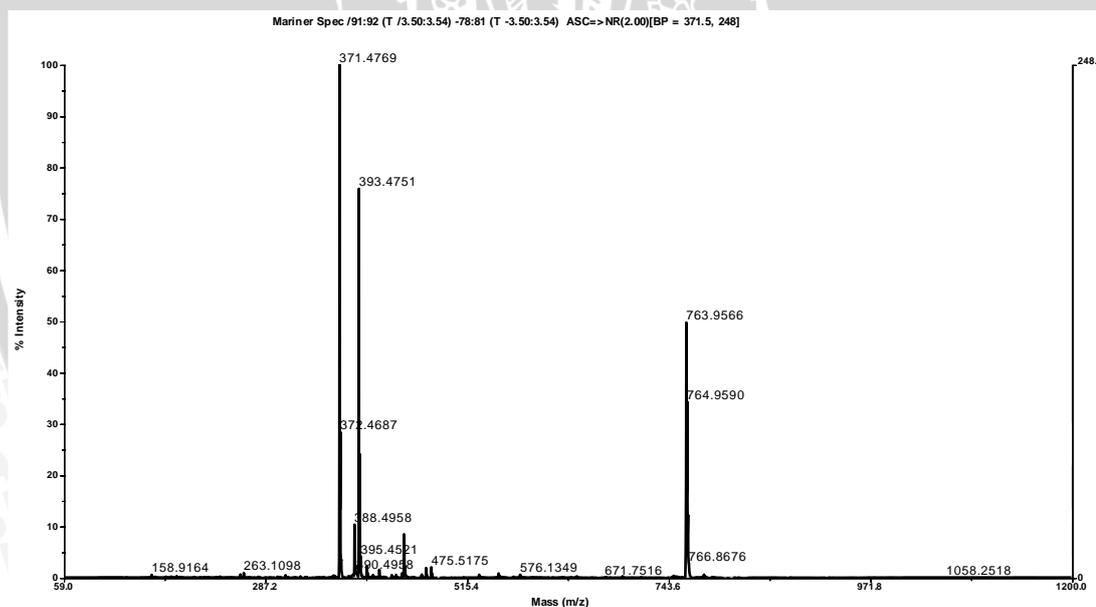
Lanjutan Lampiran 7.



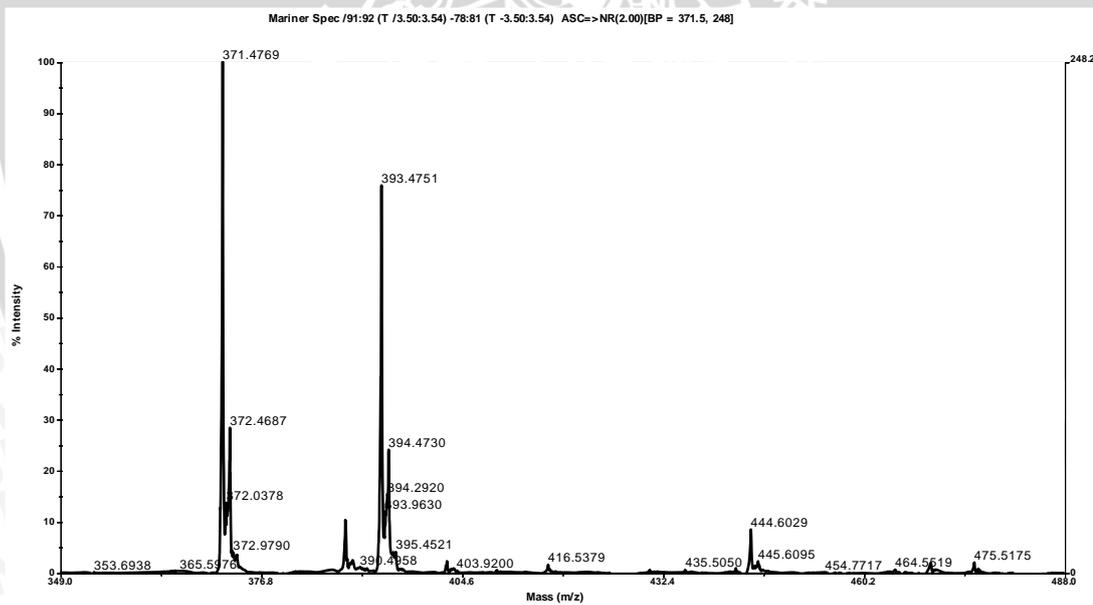
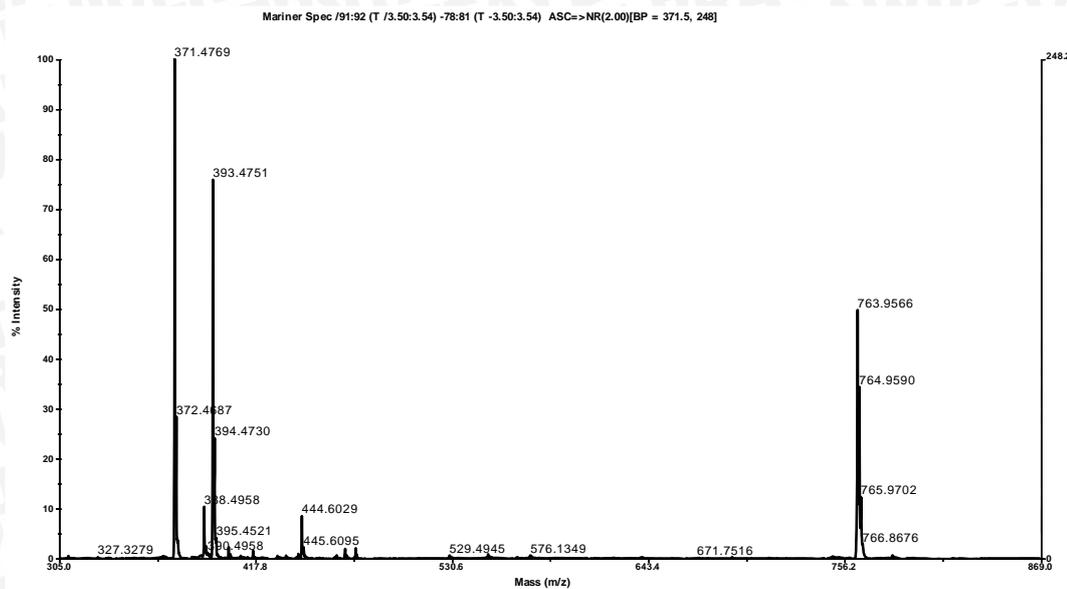
Lanjutan lampiran 7.



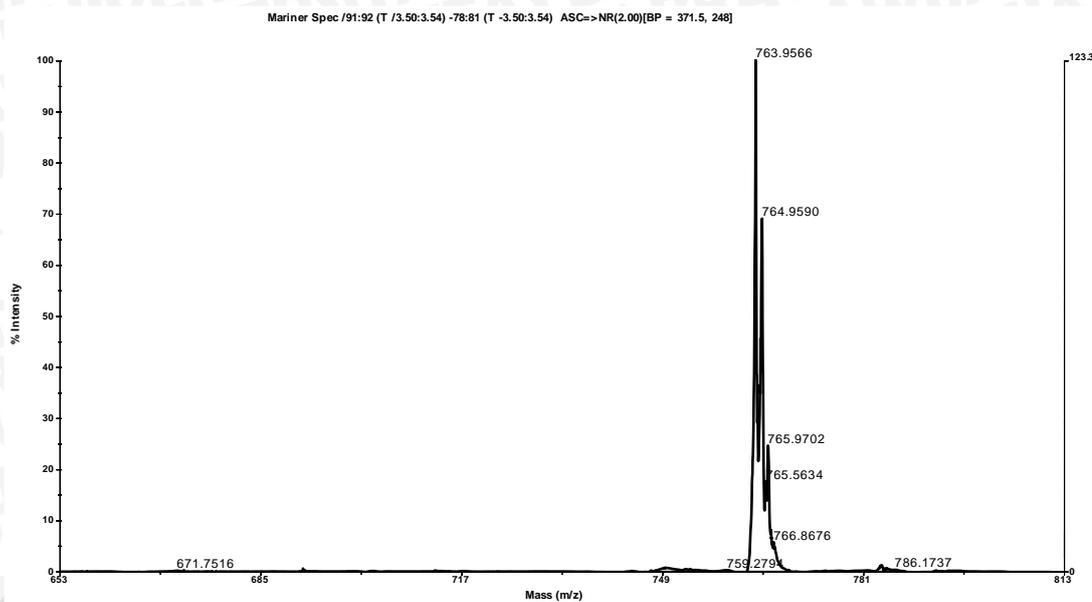
Rt 3.49



Lanjutan Lampiran 7.



### Lanjutan lampiran 7.



Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian



1. Proses penghalusan daun *R. mucronata* Lamk dengan blender



2. Serbuk daun *R. mucronata* Lamk



3. Hasil Maserasi dengan metanol (1:3)



4. Pemisahan pelarut dengan *vacuum rotary evaporator*



5. Uji Fitokimia



6. Isolasi dengan Kromatografi Kolom

Lanjutan Lampiran 8.



7. Fraksi hasil kromatografi kolom



8. Pengelompokan fraksi dengan kromatografi lapis tipis



9. Noda hasil KLT



10. Pembuatan konsentrasi fraksi



11. Kultur Bakteri

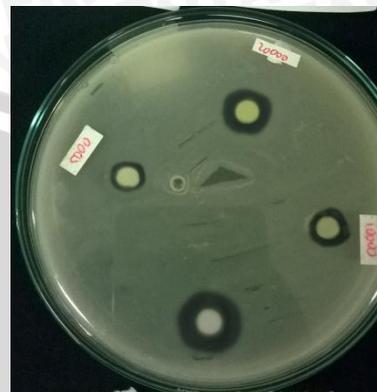


12. Uji daya Hambat

Lanjutan Lampiran 8.



13. Inkubasi pada suhu 37<sup>o</sup>C selama 2x 24 jam



14. Hasil Zona Bening yang terbentuk



15. Analisa Spektrofotometer UV-Vis



16. Analisa LC-MS HITACHI L 6200

Lampiran 9. Hasil Identifikasi Senyawa Bioaktif *R.mucronata* Lamk

Puncak	Rt	BM	BM senyawa	Dugaan senyawa	Rumus Bangun
1	1.3	509.6551	509.63220	Cevine : Steroid	C27H43NO8
		406.5132	466.17987	GalNAcGlcNAcGA : oligosakarida	C18H30N2O12
		247.2667	246.12559	Santonin :Terpenoid	C15H18O3
		302.4007	302.04265	Quercetin :Flavonoid	C15H10O7
2	1.6	964.7602	815.31716	GalNAc2FucGlcNAcGA : Oligosakarida	C32H53N3O21
		579.4307	578.16356	Kaempferitrin :Flavonoid	C27H30O14
			578.14243	Procyanidin B1 : Flavonoid	C30H26O12
			578.16356	Rhoifolin : Flavonoid	C27H30O14
3	2.8	562.775	818.7634	Tryacylglycerol	C52H90O6
		256.3614	254.05791	Chrysin : Flavonoid	C15H10O4
		305.9759	303.1470582	Cocaine :Alkaloid	C17H21NO4
		586.8095	585.28574	Amikacin :aminoglikosida	C22H43N5O13
4	3.5	763.9566	740.21638	Robinin :hydroxyflavone	C33H40O19
		763.9566	740.21638	Robinin :hydroxyflavone	C33H40O19
		475.5175	480.29881	Emetine : Alkaloid	C29H40N2O4
		786.1737	785.15713	FAD : Flavin adenine dinucleotide	C27H33N9O15P2