

**UJI AKTIVITAS DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF EKSTRAK MURNI
DAUN MANGROVE MENENGAN (*Excoecaria agallocha*) TERHADAP
BAKTERI *Shigella flexneri***

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

Oleh:
**SUVENIR DEBRI ANGGA
NIM. 125080307111014**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



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

**UJI AKTIVITAS DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF EKSTRAK MURNI
DAUN MANGROVE MENENGAN (*Excoecaria agallocha*) TERHADAP
BAKTERI *Shigella flexneri***

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

Oleh:
**SUVENIR DEBRI ANGGA
NIM. 125080307111014**



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

repository.ub.ac.id

SKRIPSI
UJI AKTIVITAS DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF EKSTRAK MURNI
DAUN MANGROVE MENENGAN (*Excoecaria agallocha*) TERHADAP
BAKTERI *Shigella flexneri*

Oleh:

SUVENIR DEBRI ANGGA
NIM. 125080307111014

Telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 22 September 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji I



Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS
NIP. 19550503 198503 2 001
Tanggal : 17 OCT 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I



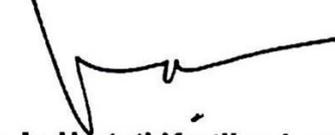
Dr. Ir. Yahya, MP
NIP. 19630706 199003 1 003
Tanggal : 17 OCT 2016

Dosen Penguji II



Eko Waluyo, S.PI, M.Sc
NIP. 19800424 200501 1 001
Tanggal : 17 OCT 2016

Dosen Pembimbing II



Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS
NIP. 19640726 198903 2 004
Tanggal : 17 OCT 2016



Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

Dr. Ir. Arning Wiluleng Ekawati, MS
NIP: 19620805/198603 2 001
Tanggal : 17 OCT 2016



PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa 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, 22 September 2016

Mahasiswa

Suvenir Deбри Angga

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang senantiasa memberikan karunia berupa kekuatan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan laporan skripsi ini.
2. Dr. Ir. Yahya, MP. Selaku Dosen Pembimbing I dan Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS. Selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, pengarahan dan masukan sejak penyusunan usulan sampai dengan selesainya laporan skripsi ini.
3. Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS. Selaku Dosen Penguji I dan Eko Waluyo, S.Pi. M.Sc Selaku Dosen Penguji II yang telah banyak memberikan masukan dan saran untuk menyelesaikan laporan skripsi ini.
4. Kedua Orang Tua dan kedua Kakak tercinta, yang terus mendoakan dan memberikan dukungan yang telah diberikan selama ini.
5. Teman-teman bimbingan Bapak Yahya, GURITA 2012 dan Hura – Hura FC yang memberikan do'a dan semangat serta berperan dalam memperlancar jalannya penelitian dan penulisan laporan skripsi ini.
6. Dwi Septi Handayani yang selalu memberikan dorongan dan semangat agar segera menyelesaikan penelitian dan laporan skripsi ini, kepada semua pihak tersebut semoga amal baik yang telah diberikan mendapat limpahan rahmat dari Allah SWT, Amin.

Malang,

PENULIS

RINGKASAN

SUVENIR DEBRI ANGGA. Skripsi tentang Uji Aktivitas dan Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Murni Daun Mangrove Menengan (*Excoecaria Agallocha*) Terhadap Bakteri *Shigella Flexneri* (di bawah bimbingan **Dr. Ir. Yahya, MP.** dan **Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS**).

Excoecaria agallocha merupakan jenis mangrove yang dapat digunakan untuk pengobatan maag dan sebagai afrodisiak. Ekstrak tanaman ini digunakan sebagai obat pencahar, epilepsi, dermatitis, hematuria dan sakit gigi. Mangrove jenis ini memiliki senyawa aktif seperti excoecariatoxins, fluratoxin, phorbol, ester, polyhenols, polisakarida, saponin dan steroid. Secara tradisional, jenis mangrove ini telah digunakan untuk mengobati luka dan sengatan dari makhluk laut serta bisul, minyak dari kulit kayu pohon ini juga efektif untuk mengobati rematik, lepra dan kelumpuhan. Uji klinis dilakukan pada jenis tanaman ini menunjukkan potensi sebagai antibakteri. Uji efektifitas ekstrak mangrove jenis ini menghasilkan daerah hambat terhadap bakteri Gram positif tetapi tidak terhadap bakteri Gram negatif. Dari hasil tersebut maka perlu dilakukan uji terhadap bakteri gram negatif menggunakan ekstrak murni daun *Excoecaria agallocha* untuk mengetahui efektifitas daya hambat bakteri gram negatif salah satunya yaitu *Shigella flexneri*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan konsentrasi terbaik dari fraksi *Excoecaria agallocha* untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* dan mengetahui senyawa-senyawa bioaktif apa saja yang terkandung pada ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha*. Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai Juni 2016. Metode yang digunakan adalah metode eksploratif-deskriptif (tanpa hipotesis) untuk mendapatkan senyawa bioaktif dari ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* dengan data yang diperoleh dari beberapa pengujian seperti kromatografi kolom yang bertujuan untuk memisahkan fraksi-fraksi murni yang terkandung dalam ekstrak, kromatografi lapis tipis (KLT) yang dilakukan untuk mengetahui senyawa aktif dengan nilai *Retodansi factor* (Rf) yang didapat, FT-IR dilakukan untuk mengetahui gugus fungsional dari ekstrak yang di uji, LC-MS untuk mengidentifikasi ion menurut massa sesuai rasio fragmentasi dan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dilakukan untuk mengamati morfologi bakteri.

Ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* kasar dan terfraksinasi menunjukkan hasil pada uji FT-IR dan LC-MS menunjukkan bahwa terdapat senyawa dugaan *hypoxanthine* pada crude sebesar 136 m/z serta gugus fungsional yang terdeteksi antara lain C-OH aromatik, C-H, CH₂ dan CH₃. Pada fraksi A sebesar 314 m/z serta gugus fungsionalnya O-H, C-H, CH₃ dan CH₂ yang merupakan senyawa 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone, pada fraksi B sebesar 348 m/z serta gugus fungsionalnya O-H, CH₃ dan CH₂ yang merupakan senyawa 3(2'-Chlorophenyl)-7-hydroxy-4-phenylcoumarin. Pada fraksi C sebesar 314 m/z dengan gugus fungsionalnya OH, CH₂ dan CH₃ yang merupakan senyawa 6-Bromo-3'-methylflavone. Pada fraksi D sebesar 178 m/z serta gugus fungsionalnya OH, CH₂, CH₃ dan NH yang merupakan senyawa 6,7-Dihydroxycoumarin. Dari hasil penelitian ini dilanjutkan dengan uji *Scanning Electron Microscope* (SEM) untuk menunjukkan aktivitas ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* terfraksinasi dalam menghambat pertumbuhan ataupun merusak sel bakteri *Shigella flexneri*.

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efektivitas bakteriostatik dan bakteriosidal dari senyawa aktif dari ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* dengan metode cakram. Pada identifikasi senyawa aktif disarankan melakukan analisa dengan uji NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) untuk mengukur banyaknya jumlah atom pada suatu senyawa.



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga terselesaikannya laporan Skripsi yang berjudul Uji Aktivitas dan Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Murni Daun Menengan (*Excoecaria Agallocha*) Terhadap Bakteri *Shigella Flexneri*. Didalam tulisan ini menyajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi pendahuluan, tinjauan pustaka, materi dan metode penelitian, hasil dan pembahasan serta kesimpulan dan saran. Dalam pembuatan laporan, penulis mengambil referensi-referensi baik dari buku, jurnal maupun artikel ilmiah untuk dijadikan tinjauan pustaka yang dapat mendukung penyusunan laporan ini.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki oleh penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangan tepatnya, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Semoga persembahan sederhana ini dapat bermanfaat bagi para pembaca khususnya mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Malang, 22 September 2016

Penulis

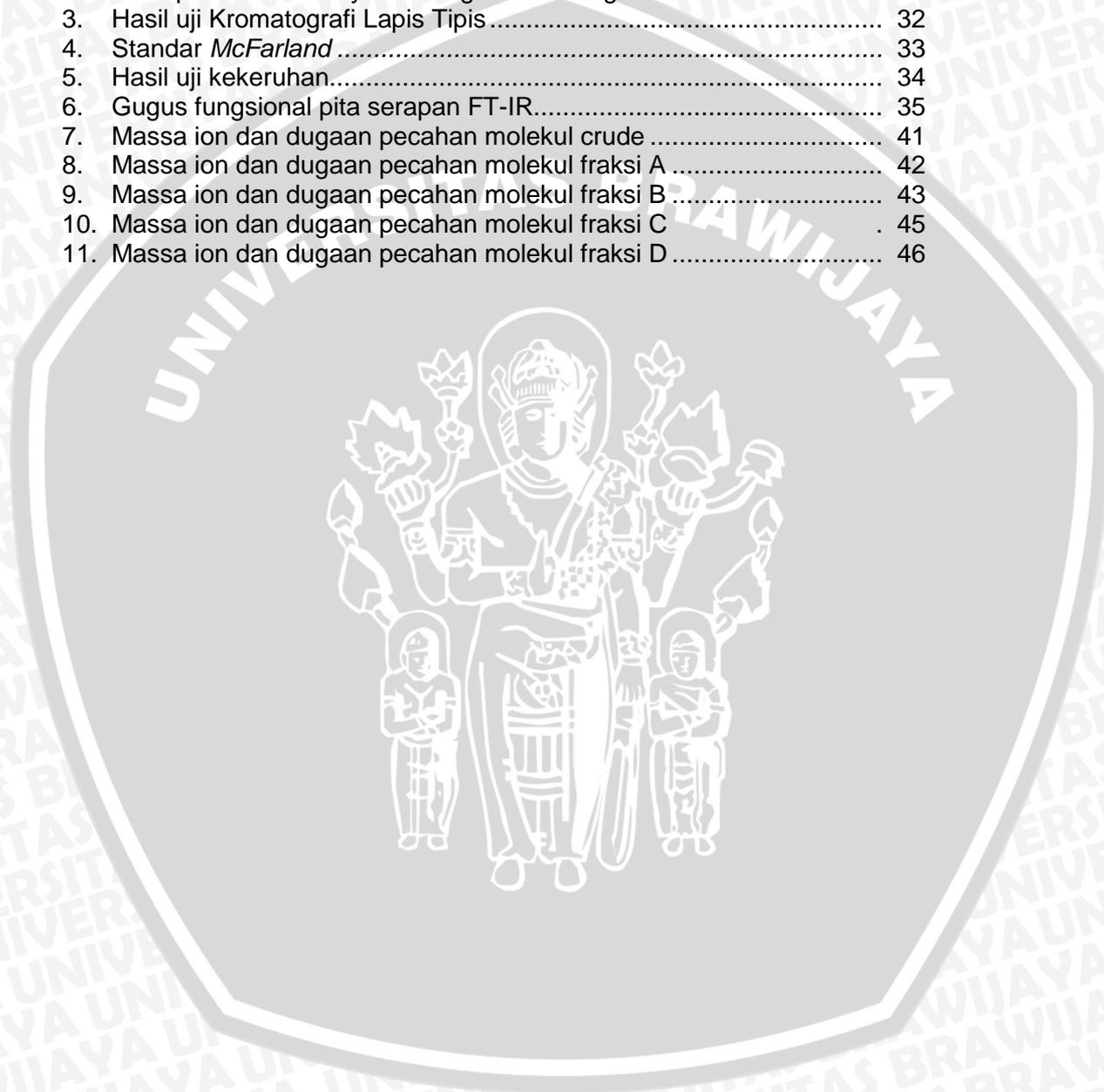
DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Orisinalitas	iii
Ucapan Terima kasih.....	iv
Ringkasan	v
Kata Pengantar	vii
Daftar Isi	viii
Daftar tabel.....	x
Daftar gambar	xi
Daftar lampiran	xii
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Kegunaan penelitian.....	3
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Mangrove	4
2.2 <i>Excoecaria agallocha</i>	4
2.3 Kandungan Senyawa Bioaktif	6
2.4 <i>Shigella flexneri</i>	6
2.5 Ekstraksi.....	8
2.6 Identifikasi Senyawa Bioaktif	9
2.6.1 Uji Kualitatif Fitokimia	9
2.6.1.1 Flavonoid	10
2.6.1.2 Steroid	10
2.6.1.3 Tanin	11
2.6.1.4 Alkaloid.....	11
2.6.1.5 Saponin	12
2.6.1.6 Terpenoid	12
2.6.2 Kromatografi Kolom.....	13
2.6.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	13
2.7 Uji Aktivitas Antibakteri	14
2.8 Spektrofotometer <i>Fourier Transform Infrared</i>	15
2.9 <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)</i>	16
2.10 Uji <i>Scanning Electron Microscope (SEM)</i>	16

3.	MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1	Materi Penelitian.....	18
3.1.1	Bahan Penelitian	18
3.1.2	Alat Penelitian	18
3.2	Metode Penelitian.....	19
3.3	Prosedur Penelitian	20
3.3.1	Persiapan Sampel.....	20
3.3.2	Ekstraksi	20
3.3.3	Identifikasi Senyawa Aktif.....	21
3.3.3.1	Uji Fitokimia	21
3.3.3.2	Uji Kromatografi Kolom	22
3.3.3.3	Uji Kromatografi lapis Tipis (KLT).....	24
3.3.4	Uji Pertumbuhan Bakteri Berdasarkan Kekeruhan	24
3.3.4.1	Peremajaan bakteri.....	24
3.3.4.2	Pewarnaan Gram.....	24
3.3.4.3	Pembuatan Suspensi <i>Shigella flexneri</i>	25
3.3.4.4	Pembuatan Larutan Uji	25
3.3.4.5	Uji Kekeruhan Bakteri	25
3.3.5	Uji Spektrofotometer FT-IR (<i>Fourier Transform Infrared</i>)... ..	26
3.3.6	Uji LC-MS (<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>) ..	27
3.3.7	Uji SEM (<i>Scanning Electron Microscope</i>)	28
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1	Analisa Fitokimia	30
4.2	Kromatografi Kolom.....	31
4.3	Kromatografi Lapis Tipis	32
4.4	Uji Pertumbuhan Bakteri Berdasarkan Kekeruhan.....	33
4.5	Uji Spektrofotometer <i>Fourier Transform Infrared</i> (FT-IR)	35
4.6	Uji <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (LC-MS).....	39
4.6.1	LC-MS crude daun mangrove <i>Excoecaria agallocha</i>	39
4.6.2	LC-MS fraksi A daun mangrove <i>Excoecaria agallocha</i>	41
4.6.3	LC-MS fraksi B daun mangrove <i>Excoecaria agallocha</i>	43
4.6.4	LC-MS fraksi C daun mangrove <i>Excoecaria agallocha</i>	44
4.6.5	LC-MS fraksi D daun mangrove <i>Excoecaria agallocha</i>	45
4.7	Hasil <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM).....	47
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1	Kesimpulan.....	50
5.2	Saran.....	51
	Daftar Pustaka.....	52
	Lampiran	59

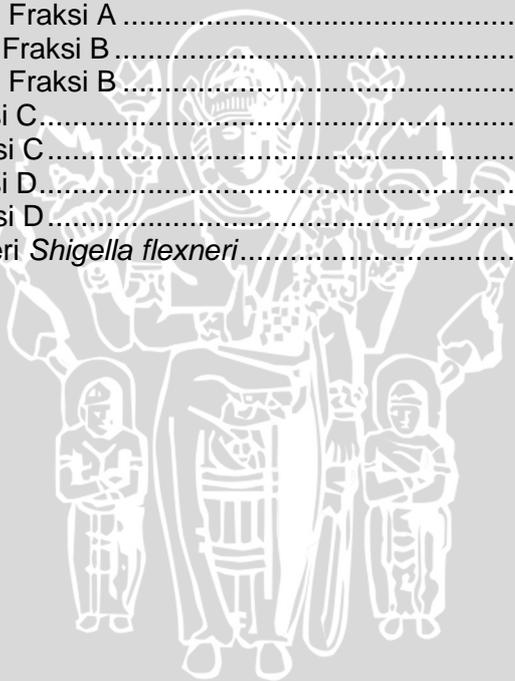
DAFTAR TABEL

Tabel	Hal
1. Uji fitokimia ekstrak daun mangrove <i>Excoecaria agallocha</i>	30
2. Hasil pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom.....	31
3. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis	32
4. Standar <i>McFarland</i>	33
5. Hasil uji kekeruhan.....	34
6. Gugus fungsional pita serapan FT-IR.....	35
7. Massa ion dan dugaan pecahan molekul crude	41
8. Massa ion dan dugaan pecahan molekul fraksi A	42
9. Massa ion dan dugaan pecahan molekul fraksi B	43
10. Massa ion dan dugaan pecahan molekul fraksi C	45
11. Massa ion dan dugaan pecahan molekul fraksi D	46



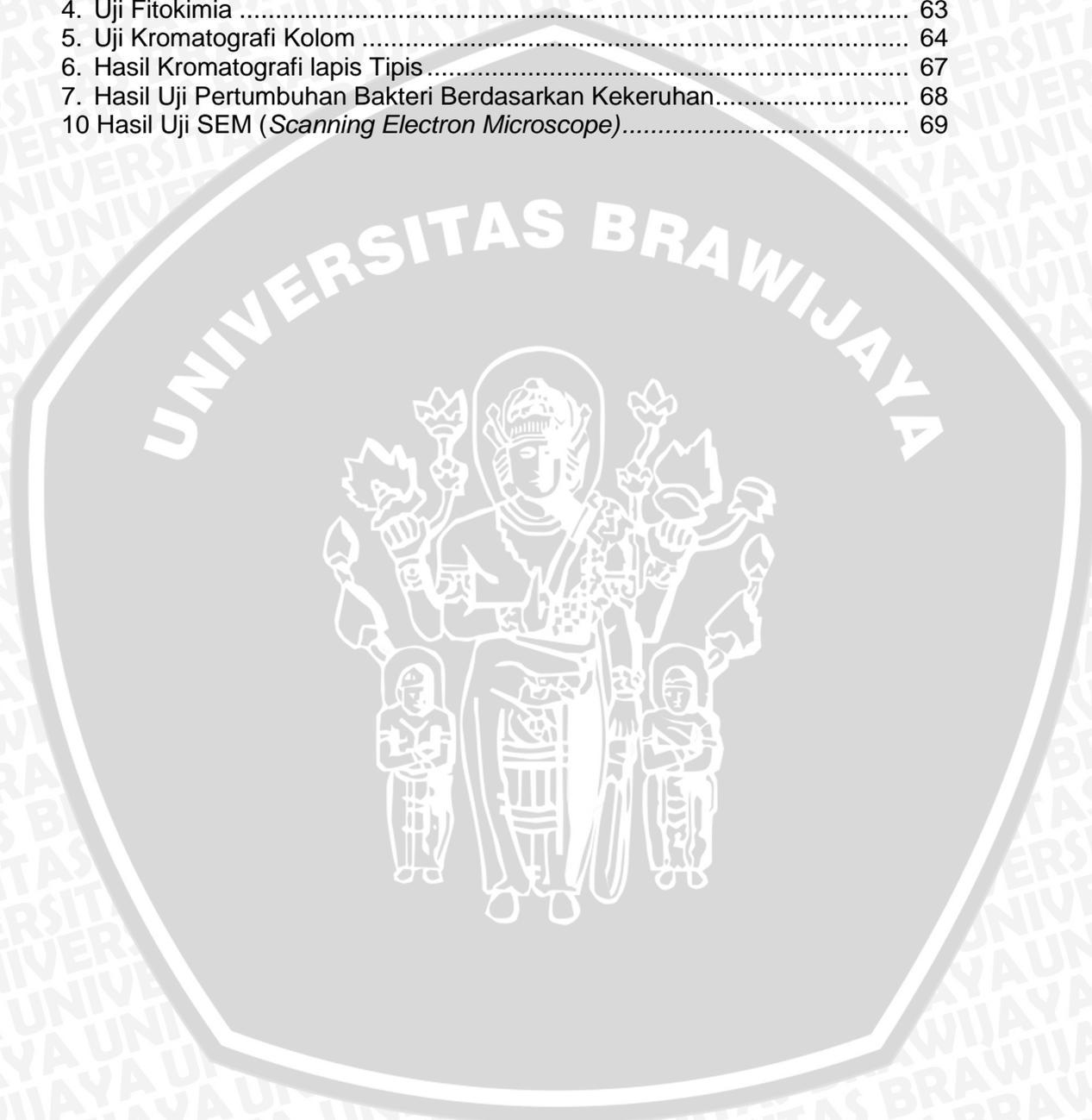
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Hal
1. <i>Excoecaria agallocha</i> batang, daun dan buah.....	5
2. Morfologi Bakteri <i>Shigella flexneri</i>	7
3. Spektrum FT-IR daun <i>Excoecaria agallocha</i>	35
4. Spektrum FT-IR crude	35
5. Spektrum FT-IR fraksi A.....	36
6. Spektrum FT-IR fraksi B.....	36
7. Spektrum FT-IR fraksi C	36
8. Spektrum FT-IR fraksi D	36
9. Sprektrum LC crude daun mangrove <i>Excoecaria agallocha</i>	39
10. Spektrum MS crude Rt 1,27	40
11. Spektrum MS crude Rt 3,9.....	40
12. Spektrum MS crude Rt 4,7.....	40
13. Spektrum LC pada Fraksi A.....	41
14. Spektrum MS pada Fraksi A	42
15. Spektrum LC pada Fraksi B.....	43
16. Spektrum MS pada Fraksi B	43
17. Spektrum LC Fraksi C.....	44
18. Spektrum MS Fraksi C.....	44
19. Spektrum LC Fraksi D.....	45
20. Spektrum MS Fraksi D.....	46
21. Hasil uji SEM bakteri <i>Shigella flexneri</i>	47



DAFTAR LAMPIRAN

1. Prosedur penelitian secara umum.....	59
2. Pembuatan DMSO 10% dan Konsentrasi Fraksi.....	60
3. Pembuatan Media <i>Nutrient Broth</i> (NB) dan <i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA)...	62
4. Uji Fitokimia	63
5. Uji Kromatografi Kolom	64
6. Hasil Kromatografi lapis Tipis.....	67
7. Hasil Uji Pertumbuhan Bakteri Berdasarkan Kekeruhan.....	68
10 Hasil Uji SEM (<i>Scanning Electron Microscope</i>).....	69



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Excoecaria agallocha merupakan jenis pohon bakau yang biasa disebut bakau susu, sangat toleran terhadap kondisi lingkungan yang tercemar, *Excoecaria agallocha* dapat digunakan untuk pengobatan maag dan sebagai afrodisiak. Ekstrak tanaman ini digunakan sebagai obat pencahar, epilepsi, dermatitis, hematuria dan sakit gigi. *Excoecaria agallocha* memiliki senyawa aktif, seperti excoecariatoxins, fluratoxin, phorbol, ester, polyhenols, polisakarida, saponin, steroid (Manickam *et al.*, 2012).

Mangrove jenis ini secara tradisional telah digunakan untuk mengobati luka dan sengatan dari makhluk laut serta bisul. Minyak dari kulit kayu pohon ini juga efektif untuk mengobati rematik, lepra dan kelumpuhan. Uji klinis dilakukan pada jenis tanaman ini menunjukkan potensi untuk antibakteri, antikanker dan sifat antivirus (Arumugam *et al.*, 2012). Uji efektifitas ekstrak mangrove jenis ini menghasilkan daerah hambat terhadap bakteri Gram positif (*S. epidermidis*, *S. Aureus* dan *S. agalactiae*) tetapi tidak terhadap bakteri Gram negatif. Bakteri *S. epidermidis* lebih sensitif dari pada bakteri uji yang lain dengan konsentrasi hambat minimum terkecil (Poeloengan dan Andriani, 2013). Dari hasil tersebut maka perlu dilakukan uji terhadap bakteri Gram negatif menggunakan ekstrak murni daun *Excoecaria agallocha*, bakteri Gram negatif salah satunya yaitu *Shigella flexneri*.

Bakteri Gram negative seperti *Shigella flexneri* merupakan bakteri nonmotile dan berbentuk batang. Bakteri ini dapat menimbulkan penyakit *Shigellosis* (disentri basiler) dengan cara menginvasi epitel usus besar. Bakteri *Shigella flexneri* mampu menyerang dan memecah sel-sel epitel serta makrofag

dan sel dendritik yang kemudian masuk ke sitosol. Bakteri ini umumnya ditemukan dalam air yang tercemar oleh kotoran manusia kemudian ditransmisikan ke dalam air atau makanan yang terkontaminasi dan melalui kontak antara manusia (Ainurrochmah *et al.*, 2013). Pada penelitian Firdaus *et al.* (2013) ekstrak mangrove jenis *Excoecaria agallocha* menunjukkan hasil yang positif menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*. Ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* telah banyak diteliti mampu menunjukkan hasil yang positif untuk menghambat bakteri Gram positif maupun Gram negatif dengan menggunakan pelarut jenis polar maupun non polar, hal ini perlu dikembangkannya penelitian lanjutan tentang identifikasi senyawa aktif dan pemanfaatan dari ekstrak mangrove *Excoecaria agallocha* sebagai antibakteri alami terhadap bakteri *Shigella flexneri*.

Untuk mengetahui pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* perlu dilakukan uji kekeruhan dengan standard *McFarland* untuk mengetahui pertumbuhan bakteri dilihat dari kekeruhan dan aktivitas yang terjadi pada bakteri *Shigella flexneri*. Setelah diperoleh hasil kekeruhan dilakukan pengamatan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscope*) pada konsentrasi terbaik untuk mengetahui perubahan morfologi pada bakteri *Shigella flexneri*.

1.2 Rumusan Masalah

Kajian tentang pemanfaatan daun mangrove *Excoecaria agallocha* sebagai antibakteri alami dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Pada konsentrasi berapa fraksi murni *Excoecaria agallocha* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*?
- Senyawaa bioaktif apa saja yang terkandung pada ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* dan yang berperan sebagai antibakteri alami?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- Mendapatkan konsentrasi terbaik dari hasil fraksinasi *crude Excoecaria agallocha* untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*.
- Mengetahui senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung pada ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan :

- Memberikan informasi kepada masyarakat tentang manfaat daun mangrove *Excoecaria agallocha*.
- Masyarakat dapat memanfaatkan daun mangrove jenis *Excoecaria agallocha* sebagai antibakteri alami yang potensial.

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Laboratorium Farmasi Universitas Airlangga Surabaya, Laboratorium Kimia PUSPITEK LIPI Serpong, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Sentral MIPA Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Negeri Malang pada bulan Maret – Juni 2016.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mangrove

Mangrove merupakan suatu kumpulan pohon dan semak-semak belukar yang biasa hidup di daerah perairan laut dan sebagian kecil hidup di perairan tawar yang berbatasan langsung dengan estuary. Tanaman ini umumnya hidup di daerah tropis dengan tanah yang mengandung garam, tumbuhan ini merupakan tumbuhan perantara antara laut dengan daratan. Tanaman jenis ini biasanya digunakan untuk menamai tumbuhan yang dapat beradaptasi dengan baik pada ekosistem hutan tropis dan sub tropis pasang surut (Firdaus *et al.*, 2013).

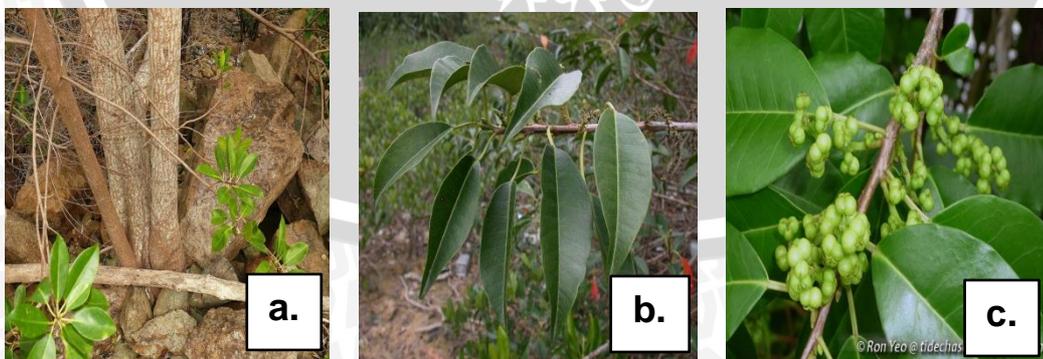
Mangrove merupakan sekelompok tumbuhan yang berbeda satu dengan yang lainnya akan tetapi mempunyai persamaan adaptasi morfologi dan fisiologi terhadap habitat yang dipengaruhi oleh pasang surut, tumbuhan ini hidup di antara laut dan darat. Tanaman jenis ini ada yang berbentuk pohon dan ada yang berbentuk semak, pada waktu pasang akar akarnya tergenang oleh air garam tetapi pada waktu air surut akar akar tersebut tampak (Soeroyo, 1992).

2.2 *Excoecaria agallocha*

Excoecaria agallocha atau umumnya dikenal dengan istilah bakau susu dan memiliki nama daerah Tilla ini merupakan spesies pohon bakau yang diklasifikasikan dalam keluarga tanaman Euphorbiaceae serta tersebar luas di daerah tropis dan sub tropis, tumbuhan ini tumbuh di zona intertidal garam dari garis pantai. Tanaman ini dilaporkan mampu mentolerir kondisi cuaca ekstrim dan angin kencang (Vadiapudi *et al.*, 2009). Klasifikasi *Excoecaria agallocha* menurut Trimulyono (2012) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Malpighiales
Famili : Euphorbiaceae
Genus : *Excoecaria*
Spesies : *Excoecaria agallocha*

Mangrove jenis ini memiliki bermacam-macam nama daerah, seperti buta-buta. Gambaran umum mengenai mangrove yang dikategorikan sebagai mangrove sejati ini adalah berupa pohon merangas, kecil dengan ketinggian mencapai 1,5 m. daun mangrove jenis ini berwarna hijau tua dan akan berubah menjadi merah bata sebelum rontok, pinggiran bergerigi halus, ada 2 kelenjar pada pangkal daun, bentuk daunnya elips dengan ukuran 6,5-10,5 x 3,5-5 cm, daun memiliki getah (warna putih dan lengket) yang dapat mengganggu kulit dan mata. *Excoecaria agallocha* memiliki tipe batang berkayu, memiliki kulit kayu berwarna abu-abu, halus, tetapi memiliki bintil. Bunga *Excoecaria agallocha* termasuk bunga berumah dua (*dioceus*), jenis mangrove ini memiliki buah yang berbentuk seperti bola dengan 3 tonjolan, memiliki warna hijau, permukaan seperti kulit dan berisi biji berwarna coklat tua, mangrove ini memiliki akar menjalar di sepanjang permukaan tanah.



Gambar 1. *Excoecaria agallocha* a. Batang b. Daun c. Buah

2.3 Kandungan Senyawa Bioaktif

Ekstrak daun mangrove jenis *Excoecaria agallocha* dapat digunakan sebagai antibakteri, menurut Patra *et al.* (2009) sifat bioaktivitas dari ekstrak mangrove jenis *Excoecaria agallocha* dipengaruhi karena adanya berbagai metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, fenol, saponin. Sifat antimikroba dari mangrove jenis ini dapat dilihat dari sifat beberapa senyawa aktif dalam semua ekstrak organik seperti senyawa lipofilik dan fenolik.

Jenis mangrove *Excoecaria agallocha* memiliki potensi bioaktif yang sangat bermanfaat sebagai antibakteri, komponen bioaktif yang dimiliki mangrove jenis ini menurut Firdaus *et al.* (2013) yaitu mengandung alkaloid, steroid, flavonoid, tanin, terpenoid dan saponin.

2.4 *Shigella flexneri*

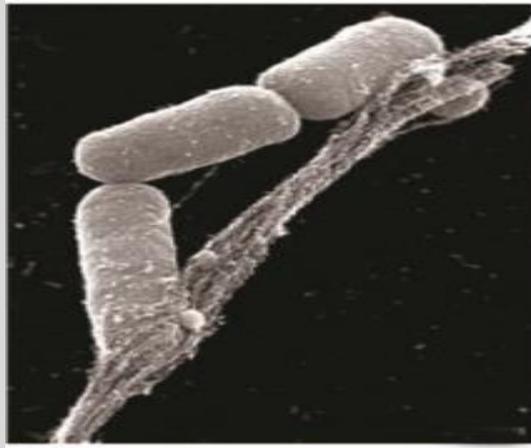
Bakteri *Shigella flexneri* merupakan jenis bakteri penyebab penyakit disentri basiler, penyakit ini ditandai dengan tanda-tanda nyeri pada perut yang hebat, diare dan sakit dengan volume tinja sedikit yang disertai lendir dan darah. Kebanyakan penyakit ini menyerang anak-anak usia 1-10 tahun. *Shigella flexneri* termasuk bakteri Gram negatif yang menyebabkan penyakit disentri (Nuriyatun, 2013).

Shigella flexneri merupakan bakteri Gram negatif, nonmotile dan berbentuk batang. Bakteri jenis ini dapat menyebabkan *Shigellosis* (disentri basiler) dengan cara menginvasi epitel usus besar, *Shigella flexneri* mampu menyerang dan memecah sel-sel epitel serta makrofag dan sel dendritik yang kemudian masuk ke dalam sitosol. Bakteri ini umumnya ditemukan dalam air yang tercemar oleh kotoran manusia kemudian ditransmisikan ke dalam air atau makanan yang terkontaminasi dan melalui kontak antara manusia

(Ainurrochmah, 2013). Klasifikasi *Shigella flexneri* menurut Yudhaningtyas (2012) sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria
Phylum : Proteobacteria
Class : Gamma Proteobacteria
Order : Enterobacteriales
Family : Enterobacteriaceae
Genus : *Shigella*
Species : *Shigella flexneri*

Shigella flexneri kurang tahan terhadap agens fisis dan kimia dibandingkan bakteri enterik lain, konsentrasi asam yang tinggi dapat mengganggu pertumbuhan bakteri ini, sehingga diperlukan media yang dapat dengan baik untuk transport bahan pemeriksaan dan untuk menumbuhkan mikroorganismenya. *Shigella flexneri* mampu beradaptasi dengan suhu rendah dan dapat hidup lebih dari 6 bulan didalam air pada suhu kamar (Yudhaningtyas, 2012).



Gambar 2. Morfologi Bakteri *Shigella flexneri* (Brinkmann et al., 2004)

2.5 Ekstraksi

Ekstraksi yaitu satu proses memisahkan senyawa-senyawa yang penting dalam suatu bahan. Pemilihan pelarut yang akan digunakan dalam proses ekstraksi harus memperhatikan sifat kandungan senyawa yang akan diisolasi. Sifat yang penting tersebut seperti polaritas dan gugus polar dari suatu senyawa. Pada prinsipnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya sehingga akan mempengaruhi sifat fisikokimia ekstrak yang dihasilkan, metode ekstraksi yang digunakan juga dapat mempengaruhi sifat fisikokimia dari ekstrak tersebut. Ekstraksi dapat dilakukan dengan cara satu tahap yaitu hanya menggunakan satu pelarut untuk ekstraksi, pada ekstraksi bertingkat digunakan dua atau lebih pelarut (Septiana dan Ari, 2012).

Metode ekstraksi maserasi merupakan suatu proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan yang dilakukan pada suhu ruang, penggunaan metode ekstraksi maserasi ini memiliki keuntungan yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sangat sederhana dibandingkan dengan metode ekstraksi yang lain. Metode ekstraksi maserasi tidak dipanaskan sehingga bahan alami tidak menjadi terurai, maserasi merupakan metode ekstraksi dingin dimana metode ini memungkinkan banyak senyawa terekstrak meskipun beberapa senyawa memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut ekstraksi pada suhu kamar (Istiqomah, 2013).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Saputra *et al.* (2013), maserasi dilakukan dengan dua macam cara yaitu pada perbandingan 1:4 dan 1:6 dengan menggunakan waktu dan konsentrasi pelarut yang sama. Sampel serbuk kering ditimbang 5 gram kemudian dilarutkan menggunakan pelarut etanol (0%, 35%, 70%) sebanyak 200 mL. Pada rasio 1:6 dengan cara yang sama, ditimbang serbuk sampel kering 3 gram kemudian dilarutkan menggunakan pelarut etanol.

Serbuk sampel yang telah direndam dengan pelarut didiamkan selama 72 jam pada suhu kamar.

2.6 Identifikasi Senyawa Bioaktif

Senyawa bioaktif merupakan suatu senyawa aktif yang terdapat di dalam produk alam, pengelompokkan produk-produk alam sendiri meliputi komponen organisme itu sendiri yang tidak mengalami pengolahan atau pengawetan kecuali pengeringan, bagian dari organisme seperti daun atau bunga dari tanaman yang terisolasi, ekstrak dan senyawa aktif seperti alkaloid, terpenoid, tannin, flavonoid dan steroid (Firdaus *et al.*, 2013). Senyawa aktif dapat diidentifikasi melalui beberapa cara seperti uji kualitatif fitokimia, kromatografi kolom maupun kromatografi lapis tipis (KLT).

2.6.1 Uji Kualitatif Fitokimia

Fitokimia secara umum dapat diartikan sebagai suatu kandungan kimia atau nutrisi yang terkandung dalam tumbuhan. Biasanya fitokimia digunakan untuk mengetahui senyawa tumbuhan yang tidak dibutuhkan untuk fungsi normal tubuh, tetapi memiliki efek yang menguntungkan bagi kesehatan atau memiliki peran aktif sebagai pencegahan bagi penyakit. Fitokimia memiliki pengaruh biologis sebagai antioksidan yang mampu menghambat pertumbuhan kanker, memiliki sifat menghambat bakteri, fitokimia yang saat ini diketahui sekitar 30.000 jenis dan sebanyak 5.000-19.000 jenis terdapat dalam bahan pangan serta hampir 400.000 jenis tanaman mengandung fitokimia (Andriana, 2009).

Fitokimia merupakan hasil metabolit sekunder dari tumbuhan yang dapat digolongkan menjadi beberapa jenis senyawa seperti alkaloid, antrakuinon, kumarin, flavonoid, steroid dan terpenoid (Channell, 1998).

2.6.1.1 Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa yang terdiri dari lebih 4000 polifenol yang terdapat secara alami di beberapa tumbuhan. Senyawa ini terdiri dari struktur phenylbenzopyrone (C6-C3-C6), dan senyawa ini dikategorikan berdasarkan tingkat kejenuhan dan bukaan cincin piran yang ada ditengah. Umumnya senyawa ini dibedakan menjadi flavon, flavanol, isoflavon, flavonol, flavanone dan flavanonol (Firdaus *et al.*, 2013).

Flavonoid merupakan suatu senyawa metabolit sekunder yang dapat ditemukan pada tanaman hijau, kecuali alga. Senyawa ini biasa ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi (Angiospermae) adalah flavon dan flavonol dengan C- dan O-glikosida, isoflavon C- dan O-glikosida, flavanon C- dan O-glikosida, khalkon dengan C- dan O-glikosida, dan dihidrokhalkon, proantosianidin dan antosianin, auron O-glikosida, dan dihidroflavonol O-glikosida. Golongan flavon, flavonol, flavanon, isoflavon, dan khalkon juga sering ditemukan dalam bentuk aglikonnya (Yohrami, 2008).

2.6.1.2 Steroid

Steroid merupakan interpenes termodifikasi yang banyak ditemukan di hewan, tanaman dan mikroorganisme (Firdaus *et al.*, 2013). Steroid mempunyai kerangka dasar siklopentano perhidro fenantren. Ditinjau dari struktur molekul terdapat perbedaan antara kelompok steroid ini yang ditentukan oleh jenis substituen R pada C17, C13 dan C10 yang terikat pada kerangka dasar karbon. Perbedaan antara senyawa satu dengan yang lain dari suatu kelompok tertentu ditentukan oleh panjang rantai karbon R pada C17, gugus fungsi yang terdapat pada substituen R pada ketiga C serta jumlah posisi gugus fungsi oksigen dan ikatan rangkap. Rumus kimia steroid adalah $C_{17}H_{16}N_8$ dan berat molekul sebesar 293,66 g/mol.

Steroid pada tumbuhan memiliki fungsi protektif, misalnya fitoekdison yang memiliki struktur mirip dengan hormon molting serangga sehingga kandungan steroid dapat menghambat proses molting larva jika termakan (Yunita *et al.*, 2009).

2.6.1.3 Tanin

Tanin ($C_{76}H_{52}O_{46}$) merupakan senyawa polifenol yang banyak terkandung dalam tanaman tingkat tinggi. Biasanya terdiri dari senyawa fenolik alami yang mampu memprespipitasi protein dari larutan. Sifat ini disebut sebagai astringency. Berdasarkan strukturnya, tanin dibagi menjadi dua grup yaitu proanthocyanidins dan tannin yang larut air. (Firdaus *et al.*, 2013).

Tanin dapat diperoleh dari semua jenis tumbuhan hijau, baik tumbuhan tingkat rendah maupun tingkat tinggi dengan kadar dan kualitas yang bervariasi. Tanin adalah senyawa polifenol yang sangat kompleks. Oleh karena adanya gugus fenol, maka tanin dapat bereaksi dengan formaldehid (polimerisasi kondensasi) yang dapat membentuk produk thermosetting yang dapat digunakan sebagai bahan perekat (Danarto *et al.*, 2011).

2.6.1.4 Alkaloid

Alkaloid ($C_{21}H_{20}N_2O_3$) merupakan salah satu senyawa metabolisme sekunder yang dapat ditemukan pada tumbuhan, yang dapat dijumpai pada bagian daun, ranting, biji, dan kulit batang. Senyawa ini mempunyai efek dalam bidang kesehatan berupa pemicu sistem saraf, menaikkan tekanan darah, mengurangi rasa sakit, antimikroba, obat penenang, obat penyakit jantung dan lain-lain (Aksara, 2013).

Alkaloid menurut Firdaus *et al.* (2013) alkaloid bersifat racun bagi makhluk hidup, dari hasil penelitian telah teridentifikasi senyawa 1,2-dithiolane, brugierol, isobrugierol dan 4-hydroxy-1, 2-dithiolane-1-oxide dari spesies bakau

B. conjugata. Brugierol dan beberapa derivatifnya seperti carbamates, phosphates, dan N, N-dialkylates dari dithiolane atau trithiane menunjukkan aktivitas antibakteri dan insektisidal.

2.6.1.5 Saponin

Senyawa saponin ($C_{27}H_{42}O_3$) yang berasal dari tumbuhan merupakan glikosida dari triterpene dan steroid yang larut dalam air dan mempunyai kemampuan membentuk buih sabun bila dikocok di air. Penggunaan saponin sebagai deterjen alam dan sebagai racun ikan telah dikenal oleh masyarakat tradisional. Sifat farmatikal yang berhubungan dengan obat Cina 'ginseng' merupakan komponen dari senyawa saponin. Saponin dari tumbuhan seperti halnya dioscin, bernilai komersial setelah ditemukan sebagai bahan untuk hormone steroid sintetis (Purnobasuki, 2004).

Saponin merupakan suatu senyawa yang mempunyai sifat seperti sabun, senyawa ini merupakan senyawa aktif permukaan yang kuat dan menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan pada konsentrasi rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Beberapa saponin bekerja sebagai antimikroba (Santosa dan Triana, 20005). Struktur senyawa saponin dapat dilihat dibawah ini.

2.6.1.6 Terpenoid

Golongan terpenoid ($C_{10}H_{16}$) merupakan senyawa penyusun minyak atsiri, golongan terpenoid yang memiliki aktivitas antibakteri adalah borneol, soneol, pinene, kamfene, kamjor, nerelidol dan kadinen. Senyawa-senyawa golongan terpenoid dapat merusak membran biologis sel atau asosiasi enzim sehingga pertumbuhan bakteri akan terhambat (Pasaraeng *et al.*, 2013).

Terpenoid merupakan senyawa kimia yang berfungsi sebagai pertahanan pada tumbuhan dalam bentuk metabolit sekunder. Zat aktif dari

metabolit sekunder terpenoid memiliki efek farmakologis dengan membantu proses sintesis organik tubuh dan pemulihan sel-sel tubuh manusia. Sebagai fungsinya dalam pertahanan tubuh, terpenoid memiliki efek farmakologis dan efek toksik (Sari, 2015).

2.6.2 Kromatografi Kolom

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

Pemisahan kandungan senyawa bioaktif yang terkandung didalam mangrove dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom. Kromatografi kolom merupakan metode untuk pemisahan campuran. Prinsip kerja metode kromatografi kolom ialah kolom pemisah yang diisi dengan penyerap zat padat seperti alumina (fase tetap) dan dialiri dengan pelarut benzene (fase gerak). (Sastrohamidjojo, 2007)

2.6.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi awal untuk mengetahui komponen pigmenyaitu dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), metode ini merupakan salah satu contoh metode kromatografi serapan. Pada metode ini fase diam berbentuk lapisan tipis atau biasa yang disebut lempeng KLT, sedangkan fase gerak berupa campuran pelarut dengan perbandingan tertentu (Sastrohamidjojo, 2001).

KLT merupakan salah satu teknik pemisahan senyawa. Cuplikan yang akan dipisahkan akan terdistribusi diantara 2 fase, yaitu fase diam dan fase gerak sehingga akan terurai menjadi komponen-komponen tunggal. Secara luas KLT banyak digunakan untuk penelitian atau analisis tumbuhan obat. Kromatogram yang dihasilkan merupakan pola yang menggambarkan senyawa dalam setiap tumbuhan obat sehingga bermanfaat dalam kendali mutu tumbuhan obat baik untuk pencirian bahan mentah maupun produk akhir. Identifikasi pigmen secara kualitatif dilakukan dengan cara menghitung nilai *retardation factor* (Rf), pengukuran jumlah perbedaan warna yang terbentuk dari campuran dilakukan berdasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna.

2.7 Uji Aktivitas Antibakteri

Antimikroba harus memenuhi beberapa syarat seperti mempunyai kemampuan untuk mematikan atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang luas (*broad spectrum antibacterial*), kemudian tidak menimbulkan terjadinya resistensi dari mikroorganisme patogen, tidak menimbulkan efek samping (*side effect*) yang buruk pada tubuh seperti alergi, rusaknya syaraf dan iritasi lambung (Jawetz *et al.*, 2001).

Antibakteri merupakan suatu obat atau suatu senyawa yang dapat digunakan untuk membunuh bakteri yang merugikan, antibakteri yang ideal memiliki toksisitas selektif yang berarti obat atau senyawa tersebut hanya berbahaya bagi bakteri target, akan tetapi relatif tidak membahayakan bagi hospes. Berdasarkan sifat toksisitas selektif antibakteri terdapat antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan ada yang bersifat membunuh bakteri (bakterisida). Kadar hambat minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri dikenal sebagai kadar hambat minimal (KHM)

yaitu kadar atau konsentrasi minimal larutan antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji, ditandai dengan lebih jernihnya larutan pada tabung perlakuan apabila dibandingkan dengan tabung kontrol bahan. Sedangkan kadar bunuh minimal (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan antibakteri yang mampu membunuh bakteri uji, ditandai oleh penurunan jumlah koloni pada media NAP dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% original inoculum (Prihantoro *et al.*, 2006).

2.8 Spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (FT-IR)

Spektrofotometer infra merah adalah suatu metode yang mengamati interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada daerah panjang gelombang 0,75 – 1000 μm atau pada panjang gelombang 1300-10.000 cm^{-1} dengan menggunakan alat yang dinamakan spektrofotometer inframerah. Uji dengan metode ini dilakukan untuk mengetahui gugus fungsional dari senyawa bioaktif ekstrak mangrove, uji ini dilengkapi dengan *transformasi fourier* yang berfungsi untuk mendeteksi hasil spektrumnya. Spektrum inframerah yang diperoleh kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}). Analisa gugus fungsi sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum inframerah menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spectrum pembanding yang telah diketahui (Anam *et al.*, 2007).

Daerah pada spectrum inframerah dengan nilai diatas 1500 cm^{-1} menunjukkan pita *spectrum* atau gugus fungsi dalam molekul kimia, sedangkan daerah dengan nilai dibawah 1500 cm^{-1} menunjukkan sebagai daerah *finger print* (sidik jari) (Sastrohamidjojo, 2001).

2.9 **Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)**

LC-MS merupakan gabungan dari MS dan HPLC yang memiliki prinsip kerja pemisahan sampel dalam kolom kemudian diuapkan pada suhu tinggi dan diionisasikan, kemudian difragmentasi ion yang terbentuk sesuai dengan rasio massa/muatan (m/z) dan dideteksi secara elektrik (Maryam, 2007).

Secara umum prinsip dari spektrometer massa dalam menghasilkan spektrum massa melalui empat tahap, yakni pengenalan sampel, ionisasi molekul sampel untuk mengubah molekul netral menjadi ion dalam fase gerak, menganalisis massa (memisahkan ion yang dihasilkan oleh rasio massa ke muatan) dan mendeteksi ion yang telah dipisahkan. Kelebihan metode ini yaitu spesifitas hasil analisa yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor, aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis, berbeda dengan GC-MS sebagai spektrometer massa yang klasik, penerapan alat LC-MS tidak hanya digunakan untuk molekul volatil.

Alat ini juga mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu untuk persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya derivatisasi. Fleksibilitas, pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat. Kaya informasi, data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh, hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.

2.10 **Uji Scanning Electron Microscope (SEM)**

Scanning Electron Microscope digunakan untuk melihat kerusakan bakteri yang telah terpapar oleh ekstrak maupun fraksi yang diberikan, prinsip metode ini yaitu gambar dibuat berdasarkan pada deteksi electron baru (electron sekunder) atau electron pantul yang muncul dari bagian permukaan sampel pada saat permukaan sampel tersebut dipindai dengan sinar elektron. Pantulan yang terdeteksi kemudin akan diperkuat sinyalnya, selanjutnya besar amplitudo

ditampilkan dalam gradasi gelap-terang pada layar monitor *cathoderay tube* (CRT). Di layar CRT inilah gambar struktur objek yang sudah diperbesar dapat dilihat. Pada proses operasinya, SEM tidak memerlukan sampel yang ditipiskan, sehingga dapat digunakan untuk melihat objek dari sudut pandang 3 dimensi (Nursidika *et al.*, 2014). Analisis morfologi terhadap penampang atas film bioplastik dilakukan dengan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscope*) JEOL JSM-6360LA. Sampel edible film ditempelkan pada set holder dengan perekat ganda, kemudian dilapisi dengan logam emas dalam keadaan vakum. Setelah itu, sampel dimasukkan pada tempatnya di dalam SEM, kemudian Gambar topografi diamati dan dilakukan perbesaran 5000 kali (Setiawan, 2015).



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan-bahan dan alat penelitian, penjelasannya dapat dilihat sebagai berikut :

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini menggunakan daun mangrove jenis *Excoecaria agallocha* atau yang biasa dikenal masyarakat yaitu jenis mangrove menengan/buta-buta yang diperoleh dari daerah sekitar Ekowisata Mangrove Wonorejo, Surabaya. Bahan-bahan yang digunakan dalam proses ekstraksi dan isolasi antara lain etanol, n-heksan, etil asetat, aquadest, bubuk dan plat silica gel 60 GF₂₅₄ MERCK, kapas, kertas saring halus, aluminium foil, pasir laut, plastik wrap dan tissue. Bahan yang digunakan untuk kultur bakteri adalah bakteri *Shigella flexneri* biakan murnikoleksi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, media nutrient agar, nutrient broth, aquadest dan alkohol. Untuk menuji tingkat kekeruhan bakteri, bahan-bahan yang digunakan adalah fraksi etanol daun mangrove *Excoecaria agallocha* yang diperoleh dari kromatografi kolom dengan berbagai konsentrasi, biakan *S. flexneri* koleksi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, media nutrient agar, nutrient broth, Nacl fisiologis, DMSO 10 % MERCK dan alkohol 70 %.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi dan isolasi ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* adalah beaker glass 1000 mL, rotary vacuum evaporator merk IKA, corong, timbangan digital, gelas ukur 100 mL, magnetic stirrer, tabung kolom kromatografi dan botol vial. Untuk kultur bakteri *S. flexneri*,

alat-alat yang diperlukan adalah tabung reaksi, Erlenmeyer 500 mL, gelas ukur 100 mL, timbangan digital, jarum ose, Bunsen, *autoclave* dan *incubator* merk MEMMERT. Untuk pengujian tingkat kekeruhan bakteri, alat-alat yang dibutuhkan adalah tabung reaksi, Bunsen, pinset, *vortex mixer*, rak tabung reaksi. Alat yang digunakan untuk purifikasi dan identifikasi senyawa biaktif dari daun mangrove jenis *Excoecaria agallocha* adalah Erlenmeyer 100 mL, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spektrofotometer FTIR milik Laboratorium Farmasi Universitas Airlangga serta LCMS merk HITACHI L 6200 milik Laboratorium Kimia LIPI Serpong.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif untuk mencapai tujuan utama yakni mengetahui pengaruh pemberian fraksi murni daun mangrove *Excoecaria agallocha* terhadap morfologi bakteri *Shigella flexneri* dalam bentuk gambar struktur mikro. Pada penelitian deskriptif analisis yang dilakukan hanya sampai taraf deskripsi yaitu menganalisis dan menyajikan fakta secara sistematis sehingga dapat lebih mudah untuk dipahami dan disimpulkan. Penelitian deskriptif bertujuan untuk mendapatkan gambaran yang benar mengenai subyek yang diteliti. Kebanyakan pengolahan datanya didasarkan pada analisis presentase dan analisis kecenderungan tanpa mengkaitkan dengan keadaan populasi dimana data tersebut diambil (Dharminto, 2012).

Penelitian deskriptif adalah penelitian yang bertujuan untuk melukiskan tentang sesuatu hal di daerah tertentu dan pada saat tertentu. Biasanya dalam penelitian ini, peneliti sudah mendapatkan/mempunyai gambaran yang berupa data awal tentang permasalahan yang akan diteliti (Mezak, 2006). Ciri-ciri dari penelitian deskriptif menurut Kountur (2003), yaitu :

1. Berhubungan dengan keadaan yang terjadi saat itu.
2. Menguraikan satu variabel saja atau beberapa variabel namun diuraikan satu-persatu.
3. Variabel yang diteliti tidak dimanipulasi atau tidak ada perlakuan

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Sampel

Daun mangrove jenis *Excoecaria agallocha* sebanyak \pm 5 kg yang telah dipetik kemudian dimasukkan ke dalam *coolbox* dengan tujuan menjaga sampel agar tetap segar. Sampel segar selanjutnya dihaluskan menggunakan blender untuk memperluas permukaan kontak antara daun mangrove dengan larutan pengekstrak dan mempermudah proses ekstraksi, penggunaan sampel segar dimaksudkan untuk menghindari terjadinya penguapan senyawa bioaktif yang terkandung pada sampel yang disebabkan oleh proses pemanasan atau pengeringan.

3.3.2 Ekstraksi (Prihanto *et al.*, 2011 yang telah dimodifikasi)

Pembuatan ekstrak daun mangrove jenis *Excoecaria agallocha* dilakukan dengan menggunakan metode maserasi yang merupakan modifikasi dari penelitian terdahulu. Dimana sampel yang telah dihaluskan kemudian ditimbang sebanyak 1200 gram, lalu dimasukkan ke dalam *beaker glass* 1000 mL dan ditambahkan pelarut etanol pro analisis (PA) dengan perbandingan 1:3 (w/v). Kemudian larutan sampel dimaserasi pada suhu ruang 27°C selama 24 jam untuk melepaskan kandungan senyawa aktif yang terdapat pada sampel, selama perlakuan maserasi *beaker glass* ditutup dengan menggunakan alumunium foil untuk menghindari terjadinya penguapan larutan dan sampel. Maserat didapatkan dengan menyaring campuran ekstrak menggunakan kertas saring *Whattman* no.42 untuk memisahkan antara filtrat dan residu, filtrat yang

diperoleh kemudian dipekatkan pada *vacum rotary evaporator* pada suhu 45°C sampai tidak terjadi lagi pengembunan pelarut pada kondensor (menunjukkan semua pelarut telah menguap). Proses evaporasi dilakukan agar pelarut dapat terpisah tanpa merusak senyawa aktif yang terkandung pada sampel. Ekstrak kasar yang telah didapat selanjutnya diberi gas nitrogen untuk memaksimalkan penguapan pelarut. Lalu ekstrak disimpan pada suhu 4°C untuk analisa selanjutnya. Prosedur penelitian secara umum dapat dilihat pada lampiran 1.

3.3.3 Identifikaisi Senyawa Aktif (Harborne, 1987 yang telah dimodifikasi)

3.3.3.1 Uji Fitokimia

Analisa fitokimia yang dilakukan meliputi uji kandungan senyawa aktif alkaloid, steroid, flavonoid, tanin, terpenoid dan saponin. Analisa fitokimia ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* meliputi :

- Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram sampel ditambahkan 1 mL HCl 2 N. Kemudian ditambahkan aquades 9 mL, setelah itu dipanaskan dalam waterbath dengan suhu 100°C selama 2 menit. Kemudian disaring, setelah itu diambil 3 tetes filtrat. Dalam uji alkaloid menggunakan pereaksi wagner. Sebanyak 3 tetes pereaksi ditetaskan pada sampel, positif alkaloid ditandai dengan adanya endapan warna coklat pada pereaksi wagner.

- Uji Steroid

Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan asetat anhidrat 2 mL, lalu ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat (H₂SO₄). Perubahan warna dari violet menjadi biru atau hijau mengidentifikasi adanya steroid.

- Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram sampel ditambahkan 15 mL metanol. Setelah itu dipanaskan dalam waterbath dengan suhu 50°C selama 5 menit. Lalu disaring dan ditambahkan 5 tetes H₂SO₄ pekat. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan.

- Uji Tanin

Sebanyak 5 gram sampel ditambahkan 50 mL aquades. Lalu dipanaskan dalam waterbath dengan suhu 100°C selama 10 menit. Kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat yang dihasilkan ditambah 3 tetes FeCl₃. Reaksi positif ditandai dengan warna hitam kehijauan.

- Uji Terpenoid

Sebanyak 5 mL ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung eaksi dan ditambahkan 2 ml kloroform. Setelah itu ditambahkan asam sulfat pekat secara perlahan sebanyak 3 mL. Positif terpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah kecoklatan.

- Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gram sampel ditambahkan 20 mL aquades. Lalu dipanaskan dalam waterbath dengan suhu 80°C selama 5 menit. Kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat yang dihasilkan dikocok selama 10 menit, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya busa. Hasil dari uji fitokimia dapat dilihat pada lampiran 4.

3.3.3.2 Uji Kromatografi Kolom (Pangestuti, 2007 yang telah dimodifikasi)

Uji kromatografi kolom bertujuan untuk memisahkan fraksi-fraksi murni yang terkandung dalam ekstrak. Prosedur uji kolom yang dilakukan mengacu pada penelitian yang telah dimodifikasi. Fase gerak yang digunakan yakni pelarut n-heksan:etil asetat pro analisis yang bersifat non polar:polar. Teknik elusi yang digunakan adalah teknik elusi gradien dengan perbandingan eluen dimulai dari

8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, dan 2:8 (200 mL). Fase diam yang digunakan yaitu silica gel (SiO_2) berukuran 60 mesh, ditimbang sebanyak 30 gram dengan menggunakan timbangan digital. Setelah itu dilarutkan silica gel dalam fase gerak perbandingan 8:2 secukupnya dan distirer dengan kecepatan 150 rpm selama 1 jam.

Disiapkan tabung kromatografi kolom kemudian dipasang pada statif. Setelah itu tabung kolom diisi dengan sedikit fase gerak yang digunakan. Dimasukkan kapas yang telah dipotong bulat tipis pada kolom dengan menggunakan bantuan lidi. Kemudian ditambahkan fase gerak pada kolom hingga hampir penuh. Silica gel yang telah distirer dimasukkan ke dalam kolom perlahan-lahan melalui dinding bagian dalam kolom dan didiamkan selama ± 12 jam agar memadat sempurna. Setelah silica gel memadat dan permukaannya tidak retak/pecah, dimasukkan pasir laut (*sea sand*) sebanyak 2 gram secara perlahan melalui dinding bagian dalam kolom.

Ekstrak kasar dilarutkan dengan sebagian fase gerak yang digunakan pada perbandingan awal 8:2. Hal ini bertujuan untuk mempermudah proses pelarutan ekstrak saat di dalam kolom. Ekstrak yang sudah larut selanjutnya dimasukkan ke dalam kolom yang telah berisi fase gerak dan fase diam. Kran pada kolom dibuka perlahan dan fraksi yang keluar ditampung pada botol vial masing-masing 10 mL. Pada kolom sambil terus-menerus ditambahkan fase gerak sedikit demi sedikit untuk menghindari pecahnya silica gel. Setelah perbandingan fase gerak dengan perbandingan 8:2 habis, maka dilanjutkan dengan fase gerak perbandingan 7:3, 6:4 begitu seterusnya hingga pada perbandingan fase gerak terakhir yakni 2:8. Setiap terjadi perubahan warna pada fraksi yang menetes, maka warna yang berbeda tersebut harus ditampung pada botol vial yang berbeda. Selain itu perlu diamati dan dicatat tiap waktu pergantian fase gerak dan warna yang berbeda. Hasil dapat dilihat pada lampiran 5.

3.3.3.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Sari *et al.*, 2010 yang dimodifikasi)

Pengujian kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui senyawa aktif dari ekstrak murni daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*). Metode yang digunakan berdasarkan metode Nurcahyanti (2014). Plat yang digunakan adalah plat silika gel G-60 dengan ukuran panjang 5 cm dan lebar 1 cm. Plat diberi jarak tepi bawah 1 cm dan tepi atas 0,5 cm, sehingga didapat jarak tempuh 3,5 cm. Uji kemurnian ini menggunakan fase gerak n-heksan:etil asetat (8:2-2:8 v/v). Fraksi-fraksi yang diperoleh ditotolkan pada batas bawah menggunakan pipet kapiler dan diusahakan diameter totolan sekecil mungkin, karena totolan yang diameternya besar akan menyebabkan terjadinya penyebaran noda dan timbulnya noda berekor. Selanjutnya plat dicelupkan ke dalam bejana kromatografi yang berisi fase gerak. Proses ini dilakukan pada bejana yang tertutup rapat. Biarkan fase gerak bergerak naik pada silika gel, sampai batas plat. Kemudian ditentukan nilai *Retodansi factor* (Rf) (Lampiran 6).

3.3.4 Uji Pertumbuhan Bakteri Berdasarkan Kekeruhan (Nurcahyanti *et al.*, 2011, Yuswananda, 2015, Fatisa 2008, Ajizah, 2004, Werorilangi *et al.*, 2014)

3.3.4.1 Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri *Shigella flexneri* diremajakan dengan menggosokkan bakteri menggunakan jarum ose pada media agar miring *Mueller Hinton Agar* (MHA) (dapat dilihat pada lampiran 3) dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.

3.3.4.2 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang diremajakan adalah benar *Shigella flexneri* dan tidak terkontaminasi oleh jenis bakteri serta cendawan lain. Proses pewarnaan Gram yang dilakukan sesuai dengan penelitian yang telah dimodifikasi. Pertama diambil koloni dari media penanaman dengan jarum ose steril, kemudian ratakan pada kaca objek. Fiksasi

preparat dengan melewati di atas api bunsen sebanyak 8-10 kali atau hingga kering. Selanjutnya preparat ditetesi dengan larutan gentian violet didiamkan selama 3 menit kemudian dibilas dengan air yang mengalir. Lalu teteskan lugol dan diamkan selama 1 menit, kemudian bilas dengan air yang mengalir. Setelah itu teteskan alkohol 96% lalu dibilas dengan air yang mengalir. Teteskan safranin dan diamkan selama 45-60 detik dan bilas dengan air yang mengalir. Setelah selesai, kaca preparat dikeringkan dengan tisu. Selanjutnya teteskan minyak immersi sebanyak 1 tetes dan dilihat di mikroskop dengan perbesaran 100x. Hasil yang didapatkan merupakan *Shigella flexneri* dengan sifat Gram negatif yang ditandai dengan warna merah berbentuk batang.

3.3.4.3 Pembuatan Suspensi *Shigella flexneri*

Shigella flexneri 1215-U disuspensikan ke dalam tabung reaksi berisi larutan NaCl 0,9% steril 9 mL. Kemudian suspensi tersebut diukur kepadatannya berdasarkan standar *McFarland* mulai dari standar tabung nomor 1 hingga tabung nomor 10.

3.3.4.4 Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dengan melarutkan fraksi murni daun *Excoecaria agallocha* dengan DMSO 10%. Untuk penentuan aktivitas antimikroba, konsentrasi larutan uji yang digunakan adalah 5.000 ppm, 10.000 ppm, 15.000 ppm, dan 20.000 ppm. (lampiran 2)

3.3.4.5 Uji Kekeruhan Bakteri

Uji ini diawali dengan pembuatan media *Nutrien Broth* (NB) sebagai media pengujian pertumbuhan bakteri berdasarkan kekeruhannya. Sebanyak 2,08 gram NB dilarutkan dalam 160 mL aquades (Lampiran 3), kemudian media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm

selama 15 menit. Selanjutnya media steril dituangkan pada 20 tabung reaksi masing-masing sebanyak 8 mL. Lalu tabung reaksi berisi media NB tersebut selanjutnya ditambahkan 1 mL suspensi bakteri *Shigella flexneri* yang telah disesuaikan dengan standar *McFarland* dan 1 mL larutan ekstrak dengan berbagai konsentrasi yang telah dibuat sebelumnya. Kemudian diinkubasi dengan suhu 32°C selama 48 jam.

Setelah diinkubasi, selanjutnya dilakukan pengukuran kepadatan bakteri yang tumbuh pada media NB yang telah ditambah fraksi murni dengan membandingkan sampel dengan standar *McFarland* dari tabung nomor 1 hingga 10. Kemudian didapatkan hasil kepadatan pertumbuhan bakteri sebelum dan sesudah diberi penambahan fraksi murni daun *Excoecaria agallocha*. Diamati perubahan yang terjadi melalui kenaikan atau penurunan jumlah kepadatan bakteri dari masing-masing konsentrasi yang telah diujikan. Pengujian kepekaan bakteri *Shigella flexneri* terhadap ekstrak daun *Excoecaria agallocha* dengan teknik pengenceran tabung (*Tube Dilution Method*) yang telah dimodifikasi.

Perhitungan kepadatan bakteri berdasarkan metode Standar *McFarland*. *McFarland* adalah penyetaraan konsentrasi mikroba dengan menggunakan larutan BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1%. Standar kekeruhan *McFarland* ini dimaksudkan untuk menggantikan perhitungan bakteri satu per satu dan untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan pada prosedur pengujian antimikroba.

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

Pengujian spektrofotometer FT-IR dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya. Uji spektrofotometer FT-IR dilakukan untuk mengetahui gugus fungsional dari ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha*. Instrumen yang digunakan dalam pengujian ini yakni FT-IR 8400S merk Shimadzu. spektrofotometer FT-IR merupakan spektroskopi infrared yang

dilengkapi dengan transformasi fourier untuk mendeteksi dan menganalisis spektrumnya. Spektrum infrared yang diperoleh kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}). Analisis gugus fungsi sampel dilakukan dengan cara membandingkan pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum infrared menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding yang sudah diketahui.

3.3.6 Uji LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*)

Pengujian LC-MS dilakukan di Laboratorium Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong, Tangerang Selatan. Menurut Kazakevich dan Lubrutto (2007), pada uji LC-MS pemisahan sampel dimulai dari kromatografi (LC) berdasarkan sifat kepolaran sampel dengan kolom dan fase gerak dalam kolom. Komponen-komponen sampel yang telah terpisah mengalami ionisasi yang kemudian berat molekul sampel dapat diidentifikasi berdasarkan fragmentasi komponen oleh detektor pada spektrometer (MS). Secara umum prinsip dari spektrometer massa dalam menghasilkan spektrum massa melalui empat tahap, yakni pengenalan sampel, ionisasi molekul sampel untuk mengubah molekul netral menjadi ion dalam fase gerak, menganalisis massa (memisahkan ion yang dihasilkan oleh rasio massa ke muatan) dan mendeteksi ion yang telah dipisahkan tadi.

Spektrometer massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa sesuai rasio fragmentasi. Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion dan analisa massa (*mass analyzer*) yang menyeleksi ion (Agilent, 2001). *Mass Spectrometer* (MS) merupakan alat yang dapat memberikan informasi mengenai bobot molekul dari struktur senyawa organik.

Selain itu, alat ini juga dapat mengidentifikasi dan menentukan komponen-komponen suatu senyawa (Maryam, 2007).

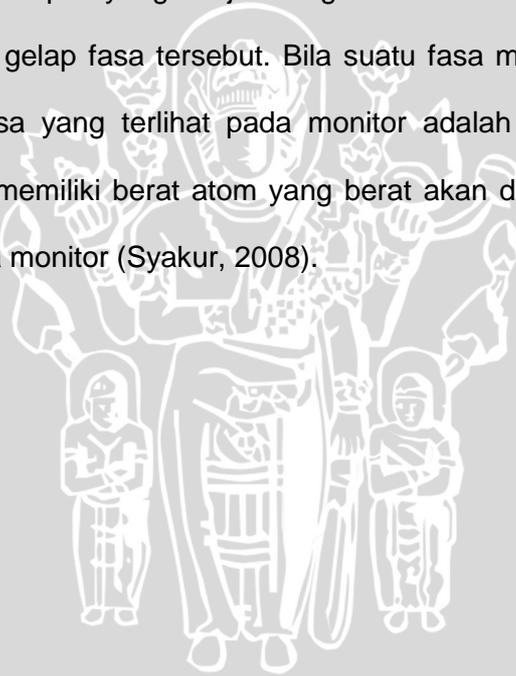
3.3.4 Uji SEM (*Scanning Electron Microscope*)

Uji SEM (*Scanning Electron Microscope*) digunakan untuk melakukan pengamatan struktur mikro. Pengujian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk proses preparasi SEM, sedangkan untuk pengujian SEM dilakukan di Laboratorium Universitas Negeri Malang. Prinsip pengujian ini adalah dengan menembakkan sampel menggunakan elektron, dan nantinya pantulan elektron dari tumbukan dengan sampel tadi akan ditangkap oleh detektor-detektor yang kemudian dapat menampilkan gambar struktur mikro pada monitor (Syakur, 2008).

Pada proses pengamatan morfologi bakteri melalui SEM diperlukan tahapan preparasi yang meliputi fiksasi kimiawi dalam larutan formaldehid 0,1 M pH 6,8 selama 30 menit. Dilanjutkan dengan proses dehidrasi oleh etanol bertingkat (20%, 50%, 70%, 96%, absolute) masing-masing selama 15 menit. Pengeringan dengan penetasan aseton bertingkat (20%, 50%, 70%, 99%) dan pelapisan emas. Selanjutnya preparat dimasukkan ke perangkat SEM dan dilakukan eksplorasi dan observasi terhadap sampel uji (Zubaidah dan Christine, 2013).

Cara kerja SEM adalah gelombang elektron yang dipancarkan elektron terkondensasi di lensa kondensor dan terfokus sebagai titik yang jelas oleh lensa objektif. Scanning coil yang diberi energi menyediakan medan magnetik bagi sinar elektron. Berkas sinar elektron yang mengenai cuplikan menghasilkan elektron sekunder dan kemudian dikumpulkan oleh detektor *backscatter*. Gambar yang dihasilkan terdiri dari ribuan titik berbagai intensitas di permukaan *Cathode Ray Tube* (CRT) sebagai topografi gambar (Kroschwitz, 1990).

Pertama permukaan sampel dilakukan *coating* menggunakan unsur Au sekitar satu jam agar tidak terjadi *charging* berlebih ketika ditembakkan dengan elektron dan untuk meningkatkan kontras warna pada gambar. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam alat pengujian SEM dan divakum selama kira-kira 10 menit. Selanjutnya sampel dapat ditembakkan elektron dengan probe level tertentu. Pantulan elektron setelah menumbuk sampel dapat ditangkap oleh detektor *secondary electron* (SE1) atau *backscattered electron* (QBSD). Detektor SE1 digunakan untuk mengamati topografi permukaan sampel yang diuji, sedangkan detektor QBSD digunakan untuk mengamati terbentuknya fasa-fasa yang terdapat pada sampel yang diuji. Pengamatan fasa didasarkan pada perbedaan terang dan gelap fasa tersebut. Bila suatu fasa memiliki berat atom yang ringan, maka fasa yang terlihat pada monitor adalah berwarna terang, sedangkan fasa yang memiliki berat atom yang berat akan ditunjukkan dengan warna yang gelap pada monitor (Syakur, 2008).



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisa Fitokimia

Uji fitokimia merupakan suatu uji kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder yang diduga terkandung didalam daun mangrove *Excoecaria agallocha*. Uji fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini meliputi uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, terpenoid dan steroid. Tahap ini akan menentukan perlakuan selanjutnya dalam menentukan metode isolasi dan pemurnian senyawa yang terkandung didalam daun *Excoecaria agallocha*.

Hasil uji fitokimia menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalam daun mangrove *Excoecaria agallocha*, senyawa-senyawa yang terdeteksi antara lain flavonoid, tanin, steroid dan alkaloid (Tabel 1). Hasil uji fitokimia dari penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Firdaus *et al.* (2013) yang berhasil mengisolasi senyawa bioaktif jenis alkaloid, steroid, flavonoid, tanin, terpenoid dan saponin.

Tabel 1. Uji fitokimia ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha*

Uji	Hasil	Reaksi
Alkaloid (Pereaksi Wagner)	+	Terdapat endapan coklat
Saponin	+	Terdapat busa/buih
Flavonoid	+	Terdapat endapan merah
Tanin	++	Terdapat endapan hitam kehijauan
Steroid/Triterpenoid	++	Terdapat endapan warna hijau
Terpenoid	-	Terbentuk endapan warna jingga

Ket : (-) = tidak ada
(+) = sedikit
(++) = banyak

Dari hasil tersebut terdapat perbedaan hasil dengan penelitian Prihanto *et al.* (2011) dimana hasil isolasi bioaktif senyawa terpenoid menunjukkan hasil positif pada daun mangrove *Excoecaria agallocha* yang diekstrak menggunakan pelarut metanol. Hasil ini diduga pengaruh perbedaan jenis pelarut yang digunakan pada

saat proses maserasi, dimana peneliti menggunakan pelarut etanol untuk proses maserasi dan didapat hasil negatif pada senyawa terpenoid. Senyawa aktif dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut yang sesuai dimana tingkat kepolaran pelarut dapat menentukan komponen senyawa aktif yang diisolasi (Widyawati, 2011). Hasil uji fitokimia pada penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 4.

4.2 Kromatografi Kolom

Dari kromatografi kolom yang dilakukan menghasilkan 71 botol fraksi (15 mL/botol). Kemudian fraksi-fraksi tersebut dikelompokkan ke dalam 4 kelompok fraksi besar yakni fraksi A, B, C, dan D. Pengelompokkan tersebut didasarkan pada perbedaan warna fraksi yang keluar selama proses kolom berlangsung, dimana kelompok fraksi A adalah seluruh larutan fraksi yang berwarna hijau terang kecoklatan, kelompok fraksi B berwarna hijau terang, kelompok fraksi C berwarna kuning kehijauan, dan fraksi D berwarna hijau kemerahan. Hasil pemisahan senyawa dari ekstrak kasar daun mangrove *Excoecaria Agallocha* dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2. Hasil pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom

No. Botol	Warna	Fraksi
1-4	Hijau terang kecoklatan	A
5-6	Hijau terang	B
7-9	Kuning kehijauan	C
10-13	Hijau kemerahan	D

Catatan : Pada botol ke-14 s/d 71 tidak terbentuk perubahan warna

Dari hasil diatas diduga penggunaan senyawa campuran polar pada penelitian ini mempengaruhi hasil fraksi yang keluar. Campuran senyawa polar akan tertahan lebih lama di dalam kolom dibandingkan senyawa non polar dan sebaliknya (Permata, 2012). Prinsip pemisahan pada kromatografi kolom didasarkan pada perbedaan polaritas dan kelarutan senyawa yang akan dipisahkan, penggunaan fase stasioner yang bersifat polar, maka fase gerak yang digunakan untuk melulusi sampel yaitu pelarut organik yang bersifat non polar (Handayani dan

Joko, 2008). Untuk lebih jelasnya, hasil uji kromatografi kolom dari ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada lampiran 5.

4.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil uji kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak kasar daun mangrove *Excoecaria Agallocha* menunjukkan bahwa nilai Rf yang diperoleh dari kelompok fraksi kolom menunjukkan adanya senyawa aktif, nilai Rf ekstrak kasar dan kelompok fraksi dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 3. Hasil uji kromatografi lapis tipis

Fraksi	Warna Total	Rf
Crude	Kuning kecoklatan	0,68
A	Hijau kecoklatan	0,714
B	Hijau kekuningan	0,65
C	Kuning terang	0,214
D	Kuning keabu-abuan	0,5

Hasil diatas menunjukkan bahwa hasil uji KLT pada *crude* menunjukkan nilai Rf sebesar 0,68 dimana hasil ini diduga terdapat senyawa aktif seperti tanin, steroid, flavonoid dan alkaloid. Hasil Rf fraksi A sebesar 0,714 dengan warna hijau kecoklatan, pada penelitian yang dilakukan oleh Sa'adah (2010) menunjukkan standar senyawa tanin memiliki nilai Rf sebesar 0,737. Diduga hasil Rf fraksi A tersebut merupakan senyawa tanin yang didasari oleh nilai Rf yang mendekati Rf standar tanin sebesar 0,737. Nilai Rf fraksi B sebesar 0,65 dengan warna hijau kekuningan, pada penelitian yang dilakukan oleh Hayati *et al.* (2012) menunjukkan standar senyawa steroid sebesar 0,06-0,82. Diduga hasil Rf fraksi B tersebut merupakan senyawa Steroid yang didasari oleh nilai Rf yang sama dengan Rf standar steroid sebesar 0,06-0,82.

Nilai Rf fraksi C sebesar 0,214 dengan warna kuning terang, pada penelitian yang dilakukan oleh Wijono (2003) menunjukkan standar senyawa flavonoid sebesar 0,22-0,60. Diduga hasil Rf fraksi C tersebut merupakan senyawa flavonoid yang didasari oleh nilai Rf yang sama dengan Rf standar

steroid sebesar 0,22-0,60. Nilai Rf fraksi D sebesar 0,5 dengan warna kuning keabu-abuan, pada penelitian yang dilakukan oleh Hayati *et al.*, (2012) menunjukkan standar senyawa flavonoid sebesar 0,56-0,8. Diduga hasil Rf fraksi D tersebut merupakan senyawa alkaloid yang didasari oleh nilai Rf yang mendekati Rf standar steroid sebesar 0,56-0,8. Dari hasil kromatografi lapis tipis yang diperoleh didapatkan 4 (empat) kelompok dugaan senyawa yang ada pada ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha*. Untuk lebih jelasnya, data perhitungan nilai Rf kromatografi lapis tipis (KLT) dari hasil fraksinasi ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada lampiran 6.

4.4 Uji Pertumbuhan Bakteri Berdasarkan Kekeruhan

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas bakteri berdasarkan kekeruhan. Metode yang digunakan yaitu dilusi cair, prinsip metode ini yaitu masing-masing konsentrasi senyawa antibiotik ditambah suspensi bakteri dalam media (Dianasari, 2009). Metode ini digunakan untuk mengetahui jenis senyawa bioaktif pada ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Dari kepadatan awal bakteri 10^8 dibandingkan dengan standar *McFarland*, jumlah bakteri sesuai standar *McFarland* dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 4. Standar *McFarland*

Skala <i>McFarland</i>	Jumlah Bakteri (x 10^6 /mL)
1	300
2	600
3	900
4	1.200
5	1.500
6	1.800
7	2.100
8	2.400
9	2.700
10	3.000

Sumber : Putri (2010)

Kepadatan awal bakteri didapatkan dari inokulan bakteri yang di encerkan pada Na fisiologi yang kemudian di bandingkan dengan standar *McFarland* yang diperoleh hasil bahwa kepadatan bakteri awal sama dengan *McFarland* tabung nomor 8 atau $2,4 \times 10^9/\text{mL}$. Setelah penambahan fraksi didapatkan hasil sebagai berikut.

Tabel 5. Hasil uji kekeruhan

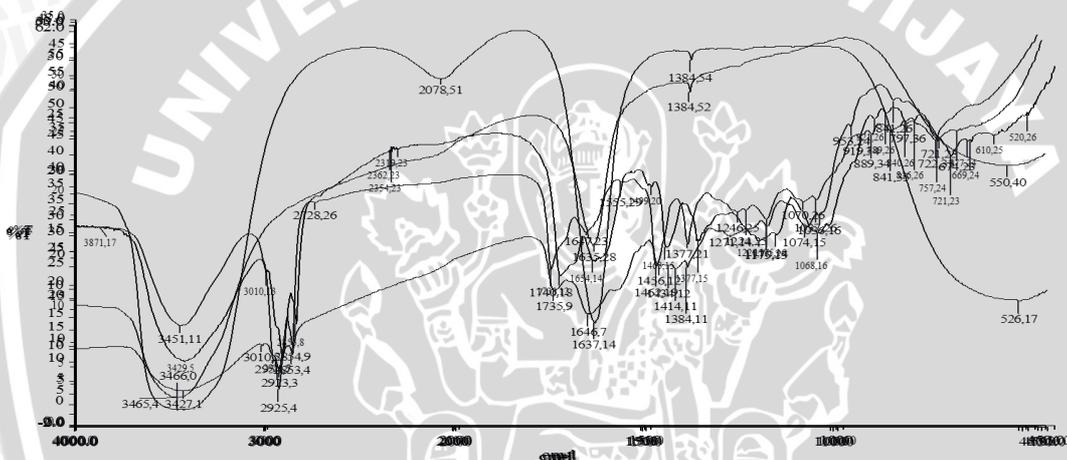
Konsentrasi (ppm)	Fraksi				
	A	B	C	D	Crude
5.000	6	5	6	5	5
10.000	6	5	5	5	4
15.000	5	4	4	4	3
20.000	5	3	4	4	3

Dari hasil diatas diketahui bahwa setiap fraksi mengalami penurunan, dimana penurunan yang paling efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* yaitu fraksi B dan *crude* daun *Excoecaria agallocha*, dimana penurunan jumlah bakteri dari $2,4 \times 10^9/\text{mL}$ menjadi $0,9 \times 10^9/\text{mL}$ pada fraksi B pada konsentrasi 20.000 ppm, sedangkan pada *crude* jumlah bakteri awal $2,4 \times 10^9/\text{mL}$ menjadi $0,9 \times 10^9/\text{mL}$ pada konsentrasi 15.000 dan 20.000 ppm. Semakin tinggi konsentrasi semakin kecil pula kerapatan optik, yang berarti semakin sedikit jumlah bakteri yang mampu bertahan hidup. Hal ini menunjukkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin besar kadar bahan aktif yang berfungsi sebagai antibakteri, sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Kemampuan suatu bahan antibakteri dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme tergantung pada konsentrasi bahan antimikroba yang diberikan (Ajizah, 2004). Dimana jumlah bahan antimikroba dalam suatu lingkungan bakteri sangat menentukan kehidupan bakteri yang terpapar. Hal ini terlihat pada hasil uji dengan konsentrasi ekstrak 15.000 dan 20.000 ppm yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*.

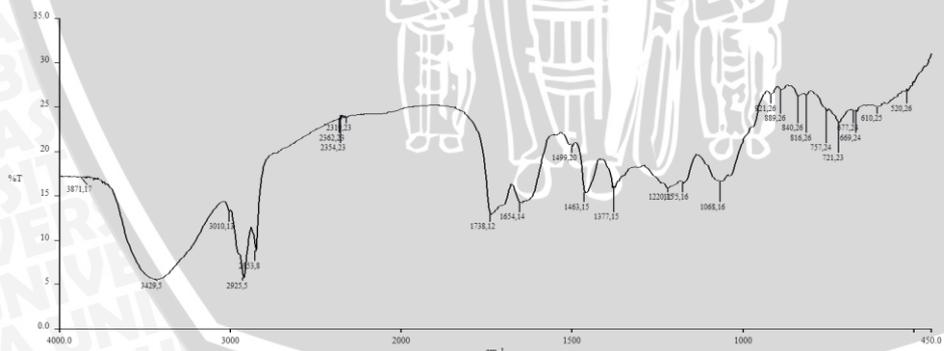
Untuk lebih jelasnya, data dan gambar hasil uji kekeruhan dapat dilihat pada lampiran 7.

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

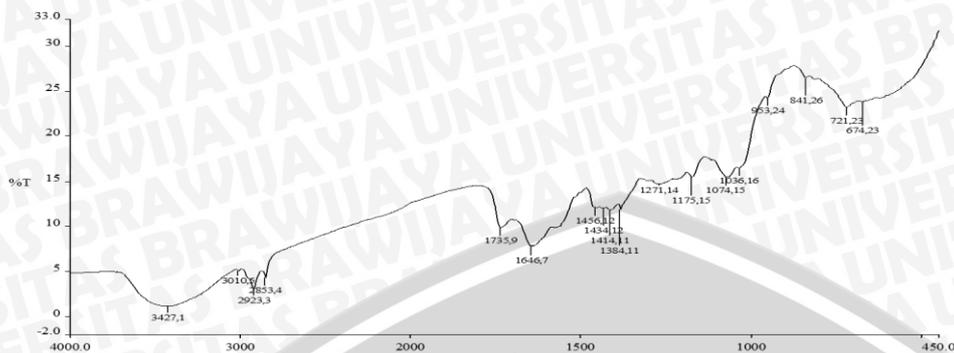
Hasil uji spektra inframerah pada penelitian ini digunakan untuk mengetahui gugus fungsi yang terkandung di dalam senyawa bioaktif ekstrak daun *Excoecaria agallocha* terfraksinasi. Pola spektra inframerah dan hasil identifikasi gugus fungsi yang terdapat pada senyawa bioaktif ekstrak daun *Excoecaria agallocha* terfraksinasi dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



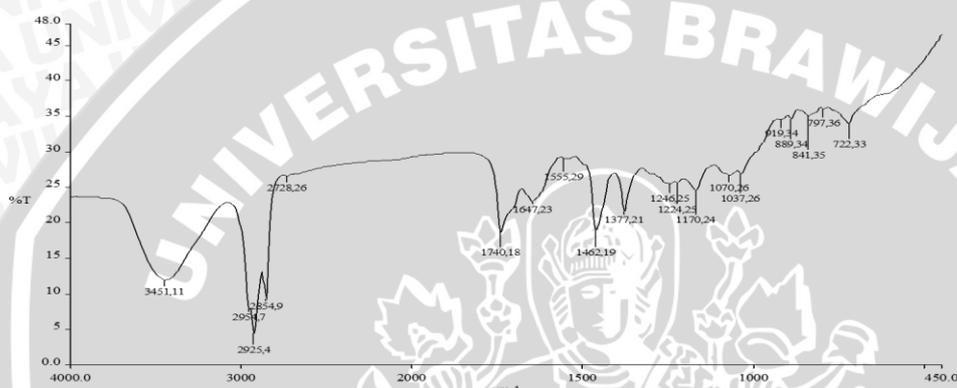
Gambar 3. Spektrum FT-IR daun *Excoecaria agallocha*



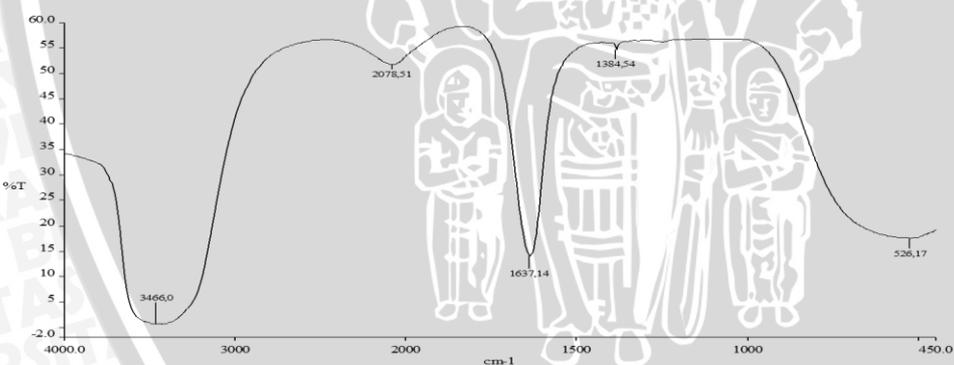
Gambar 4. Spektrum FT-IR *crude* daun mangrove *Excoecaria agallocha*



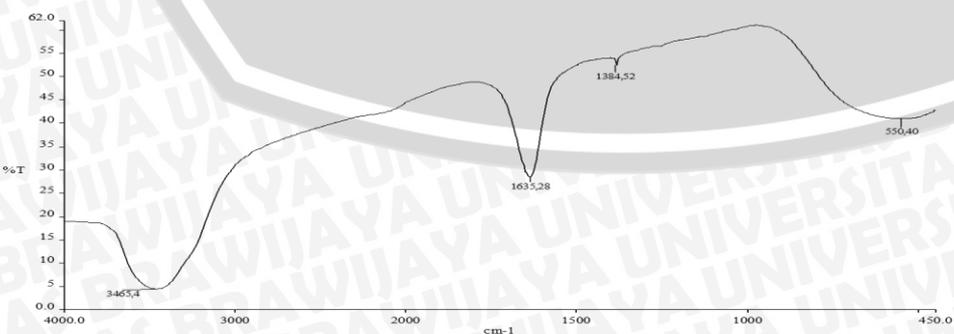
Gambar 5. Spektrum FT-IR fraksi A



Gambar 6. Spektrum FT-IR fraksi B



Gambar 7. Spektrum FT-IR fraksi C



Gambar 8. Spektrum FT-IR fraksi D

Tabel 6. Gugus fungsional pita serapan FT-IR

Sampel	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹) *	Finger Print	Gugus Dugaan	
Crude	3429	3300-3600	921	C-OH	Benzen, Orto
	3010	3010-3095	1463, 889	C-H	Alkana
	2853	2853-2962	1068	CH ₂	Alkana
	2925	2853-2962	1377	CH ₃	Alkena
Fraksi A	3427	3200-3650	1271, 1384	O-H	Alkohol
	3010	3000-3100	721, 841	C-H	
	2923	2800-2950	1384	CH ₃	
	2853	2800-2950		CH ₂	
Fraksi B		1375-1460	1456		Aromatik
	3451	3230-3550	1377	O-H	Alkohol
	2925	2850-2950		CH ₃	
Fraksi C	2854	2850-2950	1462	CH ₂	
	3466	3200-3550		OH	Alkohol
	1637	1400-1650		CH ₂	
Fraksi D		1300-1475	1384		Alkena
		500-750	526	CH ₃	Halogen
	3465	3200-3550		OH dan NH	Alkohol
Fraksi D	1635	1628-1650		CH ₂	Alkena
		1300-1475	1384	CH ₃	
		500-700	550		Halogen

Sumber : * Nur (1989), Pavia *et al.* (2001), Novadania *et al.* (2014), Asih *et al.* (2015), Lenny *et al.* (2010)

Hasil FT-IR pada crude dengan pita serapan pada daerah bilangan gelombang 3429,5 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi regang gugus C-OH yang menunjukkan pita serapan yang kuat dan lebar untuk gugus benzen, pita serapan tersebut diperkuat oleh serapan pada daerah bilangan 921,26 cm⁻¹ yang menunjukkan serapan C-OH lemah. Pada pita serapan 3010,13 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi ulur C-H yang menunjukkan pita serapan yang lemah pada gugus alkana, pita serapan tersebut diperkuat oleh serapan pada bilangan 1463,15 cm⁻¹, 1377,15 dan 889,26 cm⁻¹ yang menunjukkan serapan C-H. Pada pita serapan 2925,5 cm⁻¹ dan 2853,8 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi ulur CH₂ dan CH₃ yang menunjukkan pita serapan kuat pada gugus alkena, hasil

tersebut diperkuat oleh serapan pada bilangan $1068,16\text{ cm}^{-1}$ dan $1377,15\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan serapan CH_2 dan CH_3 .

Pada hasil uji FT-IR fraksi A diperoleh pita serapan pada daerah bilangan gelombang $3427,1\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi regang gugus O-H yang menunjukkan pita serapan yang kuat dan lebar untuk gugus alkohol, pita serapan tersebut diperkuat oleh serapan pada daerah bilangan $1271,14\text{ cm}^{-1}$ dan $1384,11\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan serapan O-H lemah. Pada pita serapan $3010,5\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi ulur C-H, pita serapan tersebut diperkuat oleh serapan pada bilangan $721,23\text{ cm}^{-1}$ dan $841,26\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan serapan C-H ulur lemah. Pada pita serapan $2853,4\text{ cm}^{-1}$ dan $2923,3\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi ulur CH_2 dan CH_3 yang menunjukkan pita serapan regang lemah, hasil tersebut diperkuat oleh serapan pada bilangan $1434,12\text{ cm}^{-1}$ dan $1384,11\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan serapan CH_2 dan CH_3 lemah.

Pada hasil uji FT-IR fraksi B diperoleh pita serapan pada daerah bilangan gelombang $3451,11\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi regang gugus O-H yang menunjukkan pita serapan yang kuat dan lebar untuk gugus alkohol, pita serapan tersebut diperkuat oleh serapan pada daerah bilangan $1377,21\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan serapan O-H kuat. Pada pita serapan $2925,4\text{ cm}^{-1}$ dan $2854,9\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi regang CH_2 dan CH_3 , pita serapan tersebut diperkuat oleh serapan pada bilangan $1462,19\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan serapan CH_2 regang tajam. Pada pita serapan $2954,4\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi ulur C-H yang menunjukkan pita serapan lemah.

Pada hasil uji FT-IR fraksi C diperoleh pita serapan pada daerah bilangan gelombang $3466,0\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi regang gugus O-H yang menunjukkan pita serapan yang kuat dan lebar untuk gugus alkohol. Pada pita serapan $1637,14\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi regang tajam CH_2 , pita serapan tersebut diperkuat oleh serapan pada bilangan $1384,54\text{ cm}^{-1}$ yang

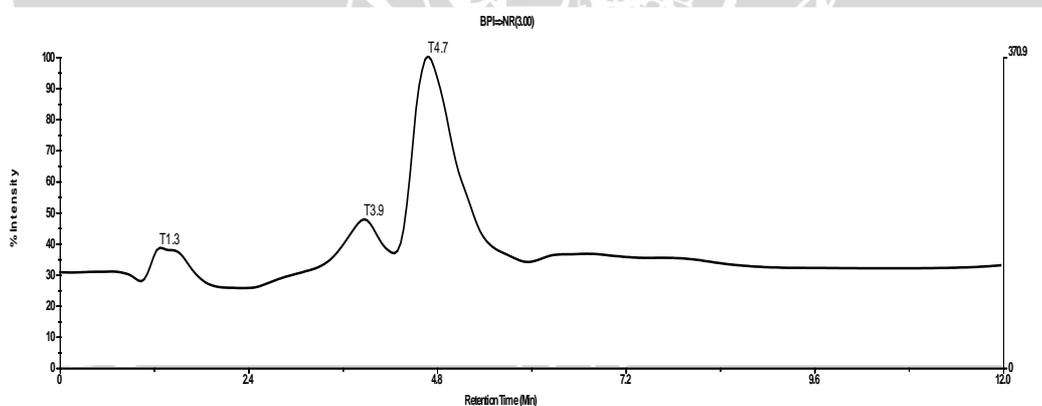
menunjukkan serapan C-CH₃ ulur lemah. Pada pita serapan 526,17 cm⁻¹ menunjukkan gugus halogen.

Pada hasil uji FT-IR fraksi D diperoleh Pita serapan pada daerah bilangan gelombang 3465,4 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi regang gugus O-H yang menunjukkan pita serapan yang kuat dan lebar untuk gugus alkohol. Pada pita serapan 1635,28 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi regang tajam gugus alkena. Pada pita serapan 1384 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi regang lemah C-(CH₃), dan pada pita serapan 550,40 menunjukkan adanya gugus halogen.

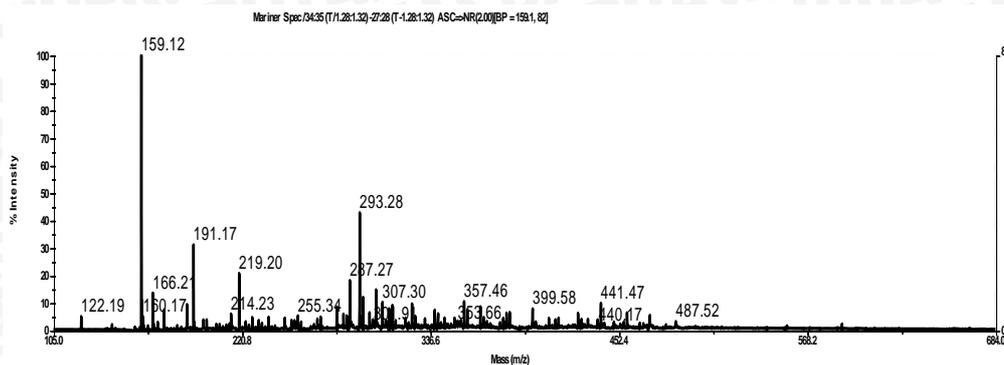
4.6 Uji *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry* (LC-MS)

Identifikasi senyawa aktif dilanjutkan dengan uji LC-MS untuk mengetahui struktur suatu senyawa dan berat molekul senyawa yang ada pada *crude* dan fraksi murni daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*).

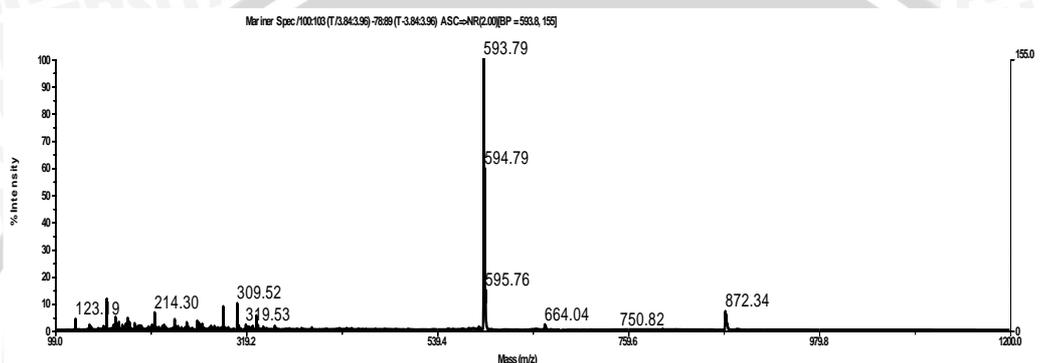
4.6.1 LC-MS *crude* daun mangrove *Excoecaria agallocha*



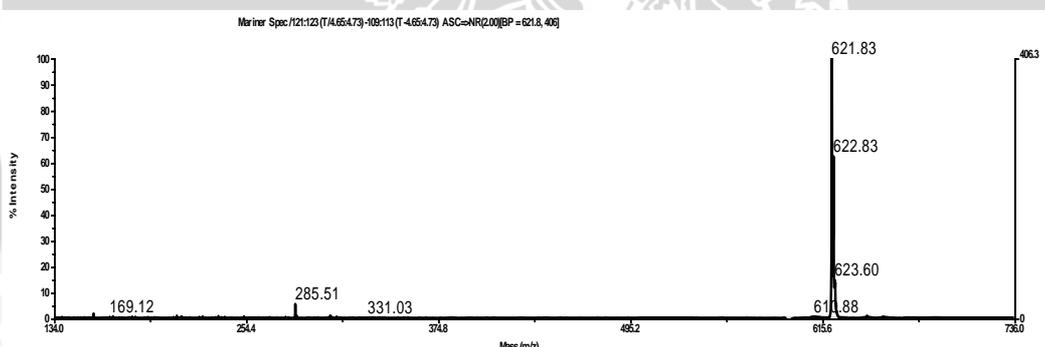
Gambar 8. Spektrum LC pada *crude* daun mangrove *Excoecaria agallocha*



Gambar 9. Spektrum MS Crude pada Rt 1,27



Gambar 10. Spektrum MS Crude Rt 3,9



Gambar 11. Spektrum MS Crude Rt 4,7

Hasil LC-MS menunjukkan terdapat spektrum fragmentasi senyawa dengan berat molekul 136 m/z yang diduga sebagai *base peak* dan diduga sebagai ion molekuler $[M+Na]^+$. Dari *peak* yang diduga sebagai ion molekuler tersebut menunjukkan fragmentasi senyawa dengan berat molekul 136 m/z (tabel 7). Berdasarkan berat molekul golongan alkaloid pada *massbank*, senyawa dengan berat molekul 136 m/z diduga adalah senyawa turunan dari alkaloid yaitu *Hypoxanthine* dengan rumus kimia $C_5H_4N_4O$. Senyawa tersebut juga memiliki

gugus gugus fungsional yang ditunjukkan oleh hasil FT-IR yang telah diuji sebelumnya.

Tabel 7. Massa ion dan dugaan pecahan molekul crude

Massa Ion (m/z)	Dugaan Pecahan Ion Molekul	Massa Senyawa Dugaan (m/z)
159.11	$C_5H_4N_4O-Na$	136
593.78	$C_5H_4N_4O-H$	
621.83	$2(C_5H_4N_4O)-Na$	

Untuk memastikan senyawa $C_5H_4N_4O$ memiliki berat molekul 136 m/z, maka dihitung berdasarkan berat tiap atom molekulnya dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\text{Ar C} = 12$$

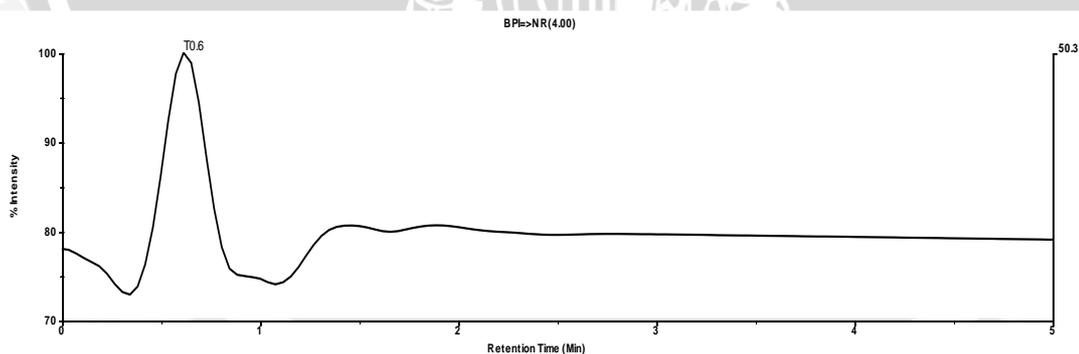
$$\text{Ar H} = 1$$

$$\text{Ar O} = 16$$

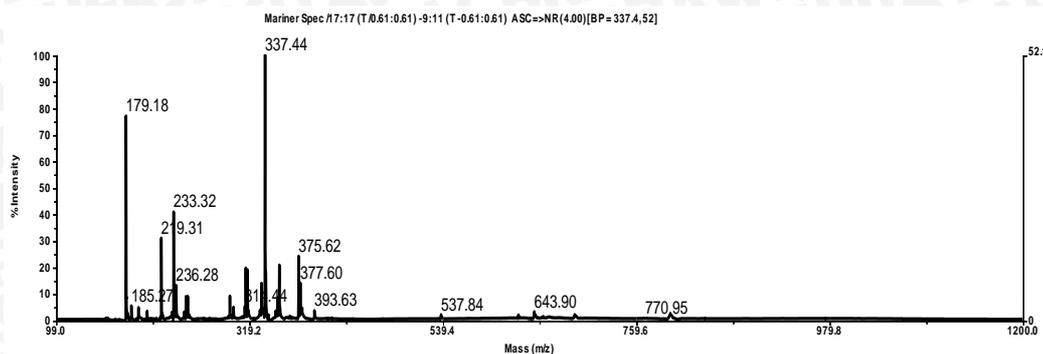
$$\text{Ar N} = 14$$

$$\begin{aligned} \text{Mr } C_5H_4N_4O &= (5 \times 12) + (4 \times 1) + (4 \times 14) + (1 \times 16) \\ &= 60 + 4 + 56 + 16 \\ &= 136 \text{ m/z} \end{aligned}$$

4.6.2 LC-MS fraksi A daun mangrove *Excoecaria agallocha*



Gambar 12. Spektrum LC pada Fraksi A



Gambar 13. Spektrum MS pada Fraksi A

Hasil LC-MS menunjukkan terdapat spektrum fragmentasi senyawa dengan berat molekul 314 m/z yang diduga sebagai *base peak* dan diduga sebagai ion molekuler $[M+Na]^+$. Dari *peak* yang diduga sebagai ion molekuler tersebut menunjukkan fragmentasi senyawa dengan berat molekul 314 m/z (tabel 8). Berdasarkan berat molekul golongan flavonoid pada *massbank*, senyawa dengan berat molekul 136 m/z diduga adalah senyawa turunan dari flavonoid yaitu 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone dengan rumus kimia $C_{17}H_{14}O_6$. Senyawa tersebut juga memiliki gugus gugus fungsional yang ditunjukkan oleh hasil FT-IR yang telah diuji sebelumnya.

Tabel 8. Massa ion dan dugaan pecahan molekul fraksi A

Massa Ion (m/z)	Dugaan Pecahan Ion Molekul	Massa Senyawa Dugaan (m/z)
337,44	$C_{17}H_{14}O_6-Na$	314

Untuk memastikan senyawa $C_{17}H_{14}O_6$ memiliki berat molekul 314 m/z, maka dihitung berdasarkan berat tiap atom molekulnya dengan perhitungan sebagai berikut.

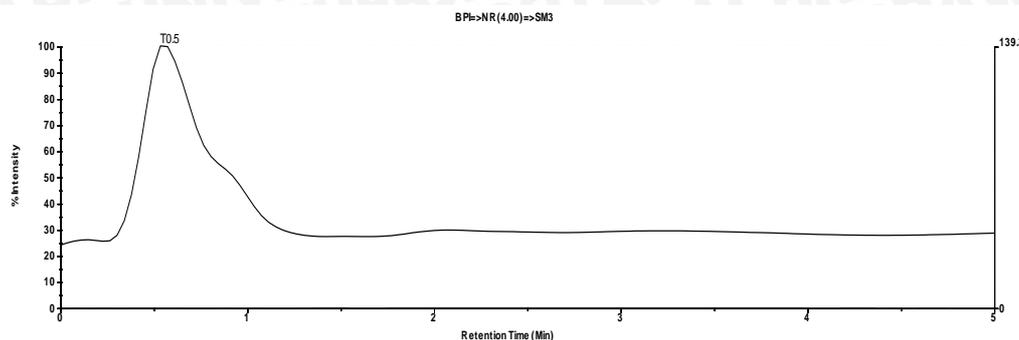
$$\text{Ar C} = 12$$

$$\text{Ar H} = 1$$

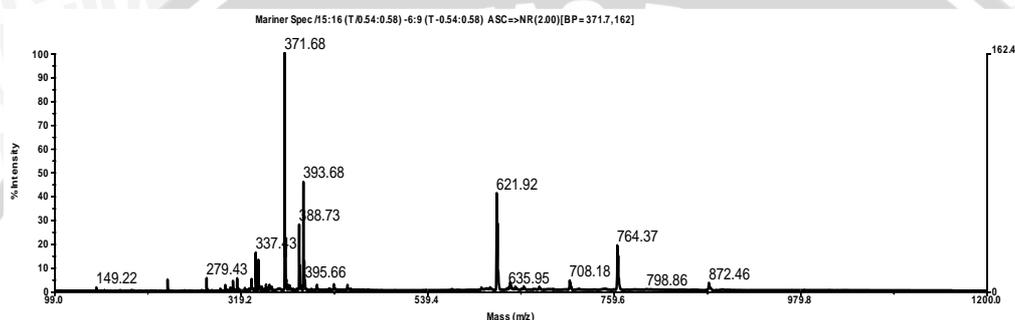
$$\text{Ar O} = 16$$

$$\begin{aligned} \text{Mr } C_{17}H_{14}O_6 &= (17 \times 12) + (14 \times 1) + (6 \times 16) \\ &= 204 + 14 + 96 \\ &= 314 \text{ m/z} \end{aligned}$$

4.6.3 LC-MS fraksi B daun mangrove *Excoecaria agallocha*



Gambar 14. Spektrum LC pada Fraksi B



Gambar 15. Spektrum MS pada Fraksi B

Hasil LC-MS menunjukkan terdapat spektrum fragmentasi senyawa dengan berat molekul 348 m/z yang diduga sebagai *base peak* dan diduga sebagai ion molekuler $[M+Na]^+$. Dari *peak* yang diduga sebagai ion molekuler tersebut menunjukkan fragmentasi senyawa dengan berat molekul 348 m/z (tabel 9). Berdasarkan berat molekul golongan flavonoid pada *massbank*, senyawa dengan berat molekul 348 m/z diduga adalah salah satu jenis senyawa kumarin yaitu 3(2'-Chlorophenyl)-7-hydroxy-4-phenylcoumarin dengan rumus kimia $C_{21}H_{13}ClO_3$. Senyawa tersebut juga memiliki gugus fungsional yang ditunjukkan oleh hasil FT-IR yang telah diuji sebelumnya.

Tabel 9. Massa ion dan dugaan pecahan molekul

Massa Ion (m/z)	Dugaan Pecahan Ion Molekul	Massa Senyawa Dugaan (m/z)
371,68	$C_{21}H_{13}ClO_3-Na$	348

Untuk memastikan senyawa $C_{21}H_{13}ClO_3$ memiliki berat molekul 348 m/z, maka dihitung berdasarkan berat tiap atom molekulnya dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\text{Ar C} = 12$$

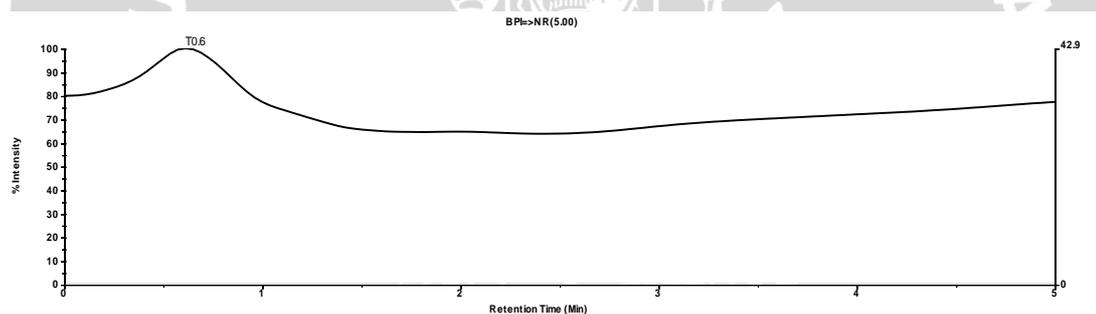
$$\text{Ar H} = 1$$

$$\text{Ar O} = 16$$

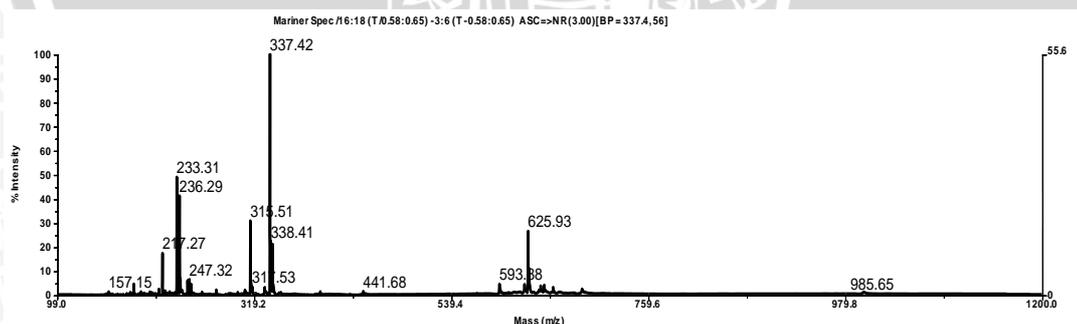
$$\text{Ar Cl} = 35,5$$

$$\begin{aligned} \text{Mr } C_{21}H_{13}ClO_3 &= (21 \times 12) + (13 \times 1) + (1 \times 35,5) + (3 \times 16) \\ &= 252 + 13 + 35,5 + 48 \\ &= 348,5 \text{ m/z} \end{aligned}$$

2.6.3 LC-MS fraksi C daun mangrove *Excoecaria agallocha*



Gambar 16. Spektrum LC Fraksi C



Gambar 17. Spektrum MS Fraksi C

Hasil LC-MS menunjukkan terdapat spektrum fragmentasi senyawa dengan berat molekul 314 m/z yang diduga sebagai *base peak* dan diduga sebagai ion molekuler $[M+Na]^+$. Dari *peak* yang diduga sebagai ion molekuler tersebut menunjukkan fragmentasi senyawa dengan berat molekul 314 m/z

(tabel 9). Berdasarkan berat molekul golongan flavonoid pada *massbank*, senyawa dengan berat molekul 314 m/z diduga senyawa turunan dari flavonoid yaitu 6-Bromo-3'-methylflavone dengan rumus kimia $C_{16}H_{11}BrO_2$. Senyawa tersebut juga memiliki gugus gugus fungsional yang ditunjukkan oleh hasil FT-IR yang telah diuji sebelumnya.

Tabel 10. Massa ion dan dugaan pecahan molekul fraksi C

Massa Ion (m/z)	Dugaan Pecahan Ion Molekul	Massa Senyawa Dugaan (m/z)
337,42	$C_{16}H_{11}BrO_2-Na$	314

Untuk memastikan senyawa $C_{16}H_{11}BrO_2$ memiliki berat molekul 314 m/z, maka dihitung berdasarkan berat tiap atom molekulnya dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\text{Ar C} = 12$$

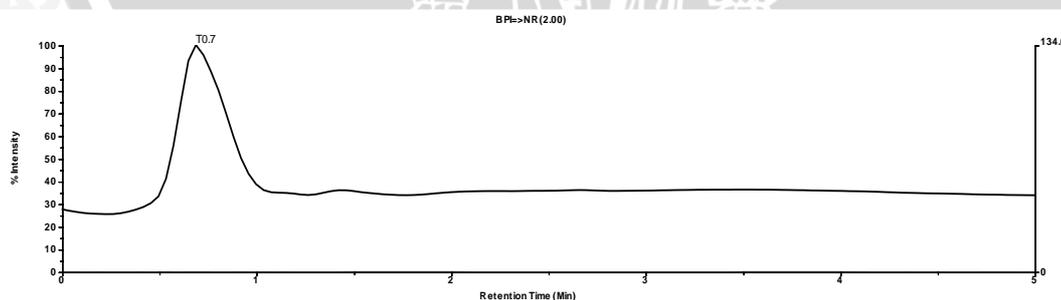
$$\text{Ar H} = 1$$

$$\text{Ar O} = 16$$

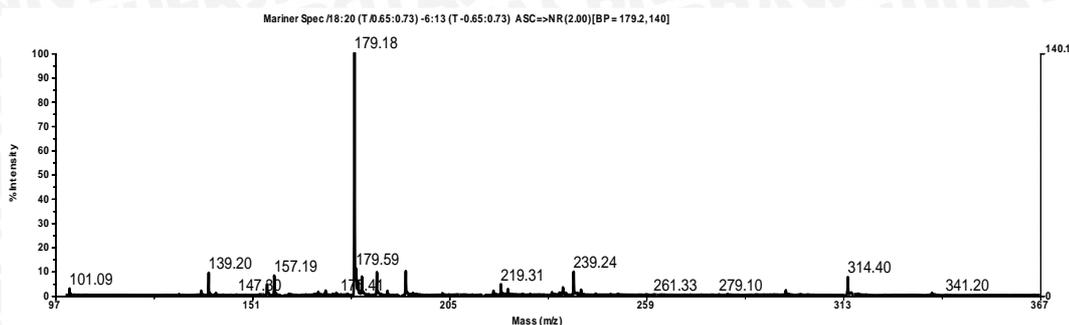
$$\text{Ar Br} = 80$$

$$\begin{aligned} \text{Mr } C_{16}H_{11}BrO_2 &= (16 \times 12) + (11 \times 1) + (1 \times 80) + (2 \times 16) \\ &= 192 + 11 + 80 + 32 \\ &= 315 \text{ m/z} \end{aligned}$$

2.6.3 LC-MS fraksi D daun mangrove *Excoecaria agallocha*



Gambar 18. Spektrum LC Fraksi D



Gambar 19. Spektrum MS Fraksi D

Hasil LC-MS menunjukkan terdapat spektrum fragmentasi senyawa dengan berat molekul 178 m/z yang diduga sebagai *base peak* dan diduga sebagai ion molekuler $[M+H]^+$. Dari *peak* yang diduga sebagai ion molekuler tersebut menunjukkan fragmentasi senyawa dengan berat molekul 178 m/z (tabel 11). Berdasarkan berat molekul golongan flavonoid pada *massbank*, senyawa dengan berat molekul 178 m/z diduga salah satu senyawa dari kumarin yaitu 6,7-Dihydroxycoumarin dengan rumus kimia $C_9H_6O_4$. Senyawa tersebut juga memiliki gugus gugus fungsional yang ditunjukkan oleh hasil FT-IR yang telah diuji sebelumnya.

Tabel 9. Massa ion dan dugaan pecahan molekul

Massa Ion (m/z)	Dugaan Pecahan Ion Molekul	Massa Senyawa Dugaan (m/z)
179,18	$C_9H_6O_4-H$	178

Untuk memastikan senyawa $C_9H_6O_4$ memiliki berat molekul 178 m/z, maka dihitung berdasarkan berat tiap atom molekulnya dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\text{Ar C} = 12$$

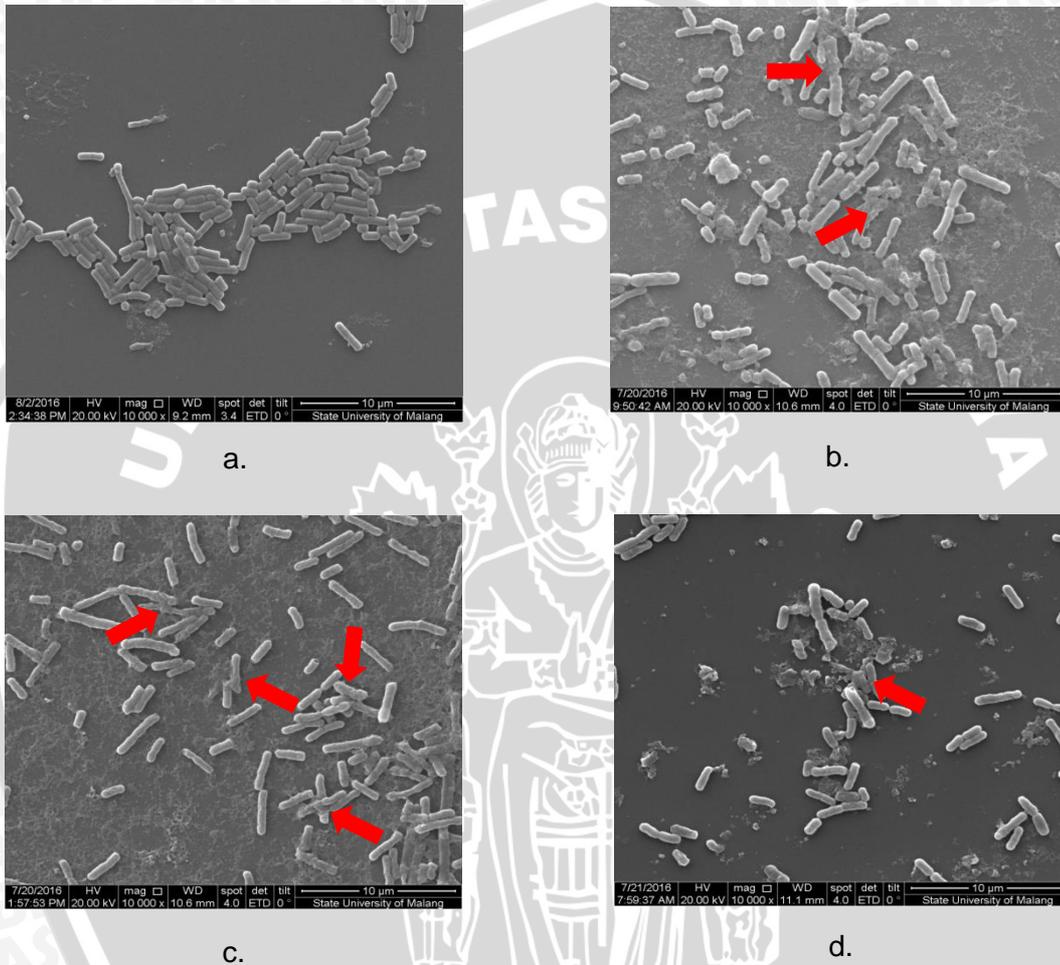
$$\text{Ar H} = 1$$

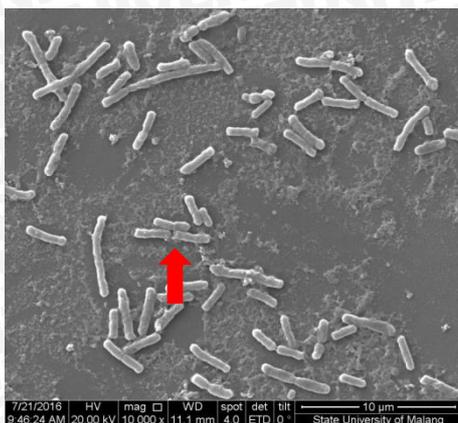
$$\text{Ar O} = 16$$

$$\begin{aligned} \text{Mr } C_9H_6O_4 &= (9 \times 12) + (6 \times 1) + (4 \times 16) \\ &= 108 + 6 + 64 \\ &= 178 \text{ m/z} \end{aligned}$$

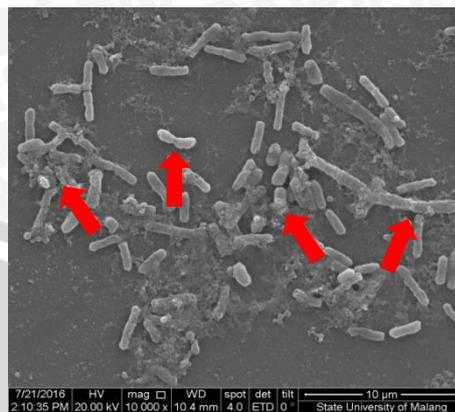
4.7 Hasil Scanning Electron Microscope (SEM)

Hasil uji SEM (*Scanning Electron Microscope*) pada bakteri *Shigella flexneri* yang telah ditambahkan *crude* dan hasil fraksinasi ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada gambar 20.





e.



f.

Gambar 20. Hasil Uji SEM (*Scanning Electron Microscope*), a. Kontrol *Higella flexneri*, b. penambahan fraksi A, c. penambahan fraksi B, d. penambahan fraksi C. e. penambahan fraksi D, e. penambahan *crude*.

Dari hasil uji SEM (*Scanning Electron Microscope*) di atas dapat dilihat kerusakan struktur bakteri yang diduga adalah reaksi senyawa bioaktif pada mangrove dengan bakteri *Shigella flexneri*, dimana penambahan *crude* dan hasil fraksinasi dari daun mangrove *Excoecaria agallocha* dengan konsentrasi 20.000 ppm efektif merusak dinding sel bakteri *Shigella flexneri*.

Pada penambahan *crude*, diduga senyawa yang berperan yaitu *hypoxanthine*, senyawa tersebut merupakan turunan dari purin dimana purin adalah turunan dari senyawa metabolit sekunder alkaloid (Suhartana, 2007). Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri diprediksi melalui penghambatan sintesis dinding sel yang akan menyebabkan lisis pada sel sehingga sel akan mati dan menghambat pertumbuhan bakteri (Amalia *et al.*, 2016).

Penambahan fraksi A dari ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* diduga merupakan senyawa 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone yang merupakan senyawa turunan dari flavonoid. Dimana senyawa jenis ini memiliki kemampuan menghambat bakteri dengan mekanisme perusakan membran sel dengan ion H⁺ dari senyawa flavonoid akan menyerang gugus polar sehingga

molekul fosfolipid akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dari asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipid tidak mampu mempertahankan bentuk membrane sel. Akibatnya membrane akan bocor dan pertumbuhan bakteri akan terhambat bahkan akan menyebabkan kematian pada bakteri (Sari dan Sari, 2011).

Pada penambahan fraksi B dari ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* diduga senyawa yang berperan dalam merusak bakteri yaitu 3(2'-Chlorophenyl)-7-hydroxy-4-phenylcoumarin yang merupakan salah satu jenis dari senyawa kumarin. Senyawa ini memiliki sifat sebagai antibakteri dengan mekanisme penghambatan dari senyawa ini yaitu masuk kedalam sel bakteri dengan cara memutuskan ikatan peptidoglikan pada dinding sel dan merusak ikatan hidrofobik dari membran sel. Sehingga terjadi perubahan permeabilitas dinding sel yang akan menghambat pertumbuhan sel bakteri (Pratiwi, 2014).

Penambahan fraksi C dari ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* diduga merupakan 6-Bromo-3'-methylflavone yang merupakan senyawa turunan dari flavonoid. Senyawa flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki sifat antibakteri dimana mekanisme kerjanya yaitu mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki kembali (Putri, 2010).

Penambahan fraksi D dari ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* diduga merupakan 6,7-Dihydroxycoumarin, senyawa tersebut merupakan salah satu jenis senyawa kumarin dimana senyawa ini menunjukkan aktivitas anti koagulasi darah, menghambat kerja enzim, anti mikroba, anti biotik, dan dapat mengganggu sintesa DNA/RNA (Adfa, 2006). Ditambahkan oleh Setiaji (2009) DNA, RNA dan protein memegang peranan sangat penting di dalam proses kehidupan normal sel. Hal tersebut berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi ada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada suatu sel.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi murni daun mangrove *Excoecaria agallocha* mampu menghambat pertumbuhan dan merusak sel bakteri *Shigella flexneri*. Penambahan hasil fraksinasi dari daun mangrove jenis ini secara keseluruhan dapat menurunkan tingkat pertumbuhan bakteri dan merusak sel bakteri *Shigella flexneri*.

- Dari hasil penelitian diketahui bahwa konsentrasi yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan dan merusak sel bakteri *Shigella flexneri* yaitu 20.000 ppm.
- Senyawa aktif yang teridentifikasi pada ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* setelah di uji menggunakan LC-MS dan didukung dengan gugus-gugus yang telah teridentifikasi dengan uji FT-IR diantaranya yaitu 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone ($C_{17}H_{14}O_6$) pada fraksi A, 3(2'-Chlorophenyl)-7-hydroxy-4-phenylcoumarin ($C_{21}H_{13}ClO_3$) pada fraksi B, 6-Bromo-3'-methylflavone ($C_{16}H_{11}BrO_2$) pada fraksi C, 6,7-Dihydroxycoumarin ($C_9H_6O_4$) pada fraksi D dan pada ekstrak crude teridentifikasi senyawa *Hypoxanthine* ($C_5H_4N_4O$)
- Kemampuan senyawa bioaktif dalam menghambat dan merusak sel bakteri *Shigella flexneri* dilihat dari hasil *Scanning Electron Microscope* (SEM), yang menunjukkan bahwa fraksi B dan ekstrak crude paling efektif merusak sel bakteri *Shigella flexneri*.

5.2 Saran

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut dengan metode cakram untuk mengetahui potensi bakteriostatik dan bakteriosidal pada daun mangrove *Excoecaria agallocha*. Pada identifikasi senyawa aktif disarankan melakukan analisa dengan uji NMR (*Nuclear Magnertic Resonance*) untuk mengukur banyaknya jumlah atom pada suatu senyawa yang terdapat pada ekstrak daun mangrove jenis *Excoecaria agallocha*.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR PUSTAKA

- Adfa M. 2006. 6-Metoksi, 7-Hidroksi Kumarin Dari Daun Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn.). Jurnal Gradien. Vol. 2. No. 2. Hal. 183-186.
- Ainurrochmah A., E. Ratnasari dan L. Lisdiana. 2013. Efektivitas Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) Terhadap Penghambatan Pertumbuhan Bakteri *Shigella flexneri* dengan Metode Sumuran. LenteraBio. Vol. 2. No. 3. 223-237.
- Ajizah. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* Terhadap Ekstraksi Daun *Psidium guajava* L. Bioscientiae. Volume 1. Nomor 1. Halaman 31-38.
- Aksara R., W. J. A. Musa, L. Alio. 2013. Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Mangga (*Mangifera indica* L.). Jurnal Entropi. Volume VIII. Nomor 1.
- Amalia S., S. Wahdaningsih, E. K. Untari. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi N-Heksan Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus* Britton & Rose) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Jurnal Fitofarmaka Indonesia. Vol. 1. No. 2. Hal. 61-64.
- Anam, C., Sirojudin dan K. Sofjan F. 2007. Analisa Gugus Fungsi Pada Sampel Uji Bensin dan Spirtus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR. Jurusan Fisika Fakultas MIPA. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Andriana, Rissa. 2009. Identifikasi kandungan Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Pucuk (*Solanum macrocarpon* L.) Skripsi. Program Studi Teknologi Hasil Pertanian. Jurusan Teknologi Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Sriwijaya. Sumatera Selatan.
- Armugam M., U. R. Pawar, M. Gomathinayagam, G. M. A. Lakshmanan dan R. Panneerselvam. 2012. Antibacterial And Antioxidant Activity Between Micropropagated And Field Grown Plants Of *Excoecaria agallocha* L. International Research Journal Of Pharmacy, 3 (3). ISSN 2230 – 8470. 3 (3). pp 235-240.
- Asih I. A. R. A., I. W. Sudiarta dan A. A. W. Suci. 2015. Aktivitas Antioksidan Senyawa Golongan Flavonoid Ekstrak Etanol Daging Buah terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.). Jurnal Kimia. Vol. 9. No. 1. 35-40.
- Azura S. L. N., R. Sutri dan Iriany. 2015. Pembuatan Etil Asetat Dari Hasil Hidrolisis, Fermentasi dan Esterifikasi Kulit Pisang Raja (*Musa paradisiaca* L.). Jurnal Teknik Kimia USU. Vol. 4. No. 1.
- Bandarayanake W. M. 2002. Bioactivities, Bioactive compounds and Chemical Constituents Of Mangrove Plants. Wetland Ecology and Management. 10. 421-452.
- Basak U. C., A. B. Das dan P. Das. 1996. Chlorophylls, Carotenoids, Proteins and Secondary Metabolites In Leaves Of 14 Species Of Mangrove. Bulletin Of Marine Science. 58(3). 654-659.

- Brinkmann V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch dan A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. Vol. 303. Pp 1532-1535.
- Channell, Richard J. P. 1998. *Natural Products Isolation*. Huwana Press. New Jersey
- Danarto. Y. C., S. A. Prihananto, Z. A. Pamungkas. 2011. Pemanfaatan Tanin Dari Kulit Bakau Sebagai Pengganti Gugus Fenol Pada Resin Fenol Formaldehid. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan". Pengembangan Teknologi Kimia Untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia. ISSN 1693-4393.
- Davies, K. 2004. Plant Pigments and Their Manipulation. *Annual Plant Reviews Volume 4*. Blackwell Publishing Ltd. United Kingdom. Hlm 59-166
- Desai N. M dan D. K. Galkward. 2015. Allelopathic Effects Of Leaf Litter Leachates mangrove *Excoecaria agallocha* L. On Rice Seedlings. *Allelopathy Journal*. 36 (2). 293-302.
- Firdaus M., A. A. Prihanto dan R. Nurdiani. 2013. Tanaman Bakau: Biologi dan Bioaktivitas. Universitas Brawijaya Press (UB Press). Hal. 51-146. Malang.
- Halim, C. N dan E. Zubaidah. 2013. Studi Kemampuan Probiotik Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Tinggi Asal Sawi Asin (*Brassica juncea*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 1 (1) : 129-137
- Harborne J. B. 1987. Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan Terbitan Kedua. Penerbit ITB. Bandung. Hlm 6-27.
- Haris, A., Arniati dan S. Werolangi. 2014. Uji Antibakteri Patogen Ekstrak Sponge Menggunakan Metode *High Throughput Screening* (HTS) dengan indikator MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Jurusan Ilmu Kelautan FIKP. UNHAS.
- Hayani, K. H., A. Ghanaim F., dan Lailis S. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi senyawa Tanin pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Hayati E. K., A. Jannah, R. Ningsih. 2012. Identifikasi Senyawa dan Aktivitas Antimalaria *In Vivo* Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting Anting (*Acalypha indica* L.). *Molekul*. Vol. 7. No. 1. 20-32.
- Ikawati R. 2005. Optimasi Kondisi Ekstraksi Karotenoid Wortel (*Daucus carota* L.) Menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM). *Jurnal Teknologi Pertanian* 1(1). 14-22.
- Ikeda I., M. Kobayashi, T. Hamada, K. Tsuda, H. Goto, K. Imaizumi, A. Nozawa, A. Sugimoto dan T. Kakuda. 2004. Heat-Epimerized Tea Catechins Rich In Gallocatechin Gallate and Catechin Gallate Are More Effective To Inhibit Cholesterol Absorption Than Tea Catechins Rich In Epigallocatechin Gallate and Epicatechin Gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Researchgate.

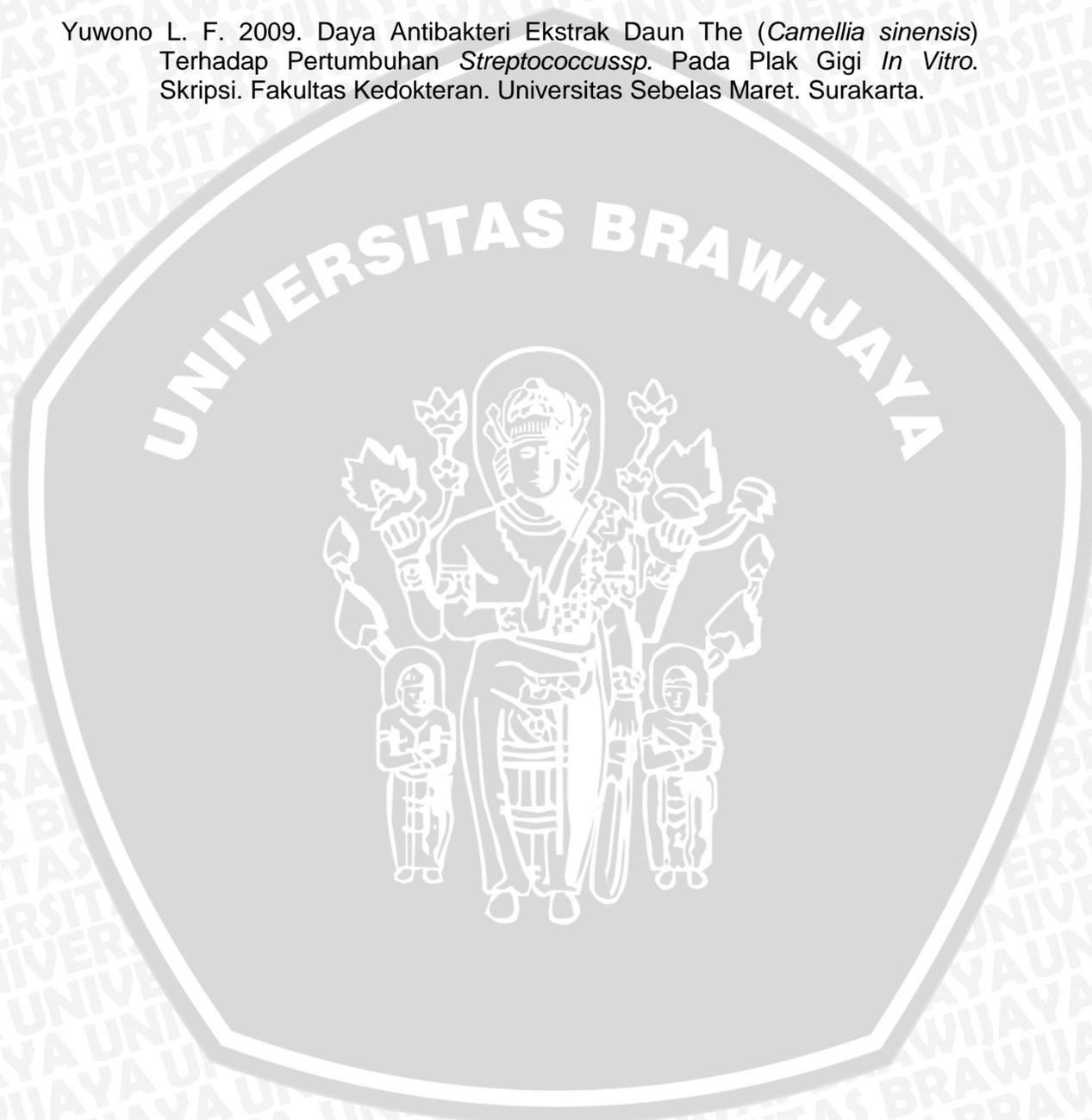
- Istiqomah. 2013. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (*Piperis retrofracti fructus*). Skripsi. Program Studi Farmasi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Jawetz F. C., Y. F. Chen, F. M. Lin dan K. H. Huang. 2005. Constituents From The Leave of *Lantana camara*. (IV). J. Chin. Med. 16 (2-3). 149-155.
- Kountur, R. 2003. Metode Penelitian Untuk Penulisan Skripsi dan Tesis. PPM. Jakarta. Hlm 105.
- Kroschwitz, J. 1990. Polymer Characterization and Analysis. John Wiley and Sons. Inc. Canada
- Lenny S., T. Barus dan E. Y. Sitopu. 2010. Isolasi Senyawa Alkaloid Dari Daun Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.). Jurnal Kimia Mulawarman. Volume 8. Nomor 1. 40-43.
- Lim H., K. H. Son, H. W. Chang, K. H. Bae, S. S. Kang dan H. P. Kim. Anti-inflammatory Activity of Pectolinarigenin and Pectolinarin Isolated From *Cirsium chanroenicum*. Biol. Pharm. Bull. Vo. 31. No. 11. pp. 2063-2067
- Lin W., S. Yu, D. Liu, P. Proksch dan Y. Li. 2012. Inhibitory Effects of Polyphenols Toward HCV From The Mangrove Plant *Excoecaria agallocha* L. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 22. 1099-1102
- Manickam A., U. P. Ramachandra, P. Rajaram. 2012. A Micropropagation Protocol For A Critically Endangered Mangrove *Excoecaria agallocha* L. International Journal Of Conservation Science. Volume 3. Issues 2. pp 119-126.
- Maryam. 2007. Metode Deteksi Mikotoksin. Jurnal Mikol Ked Indon 1 (2). 12-24.
- Moulana R., Juanda, S. Rohaya dan R. Rosika. 2012. Efektifitas Penggunaan Jenis Pelarut dan Asam Dalam Proses Ekstraksi Pigmen Antosianin Kelopak Bunga Rosella (*Hibicus sabdariffa* L.). Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia. Vol. (4). No. 3.
- Moningka K. C., N. S. Kojong dan S. Sudewi. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Ekor Kucing (*Acalypha hispida* Burm. F.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Secara *In Vitro*. Pharmacon Journal Ilmiah Farmasi. Vol. 4. No. 3. 193-202.
- Munawaroh S. dan P. A. Handayani. 2010. Ekstraksi Daun jeruk Purut (*Citrus hystrix* D. C.) Dengan Pelarut Etanol dan N-heksana. Jurnal Kompetensi Teknik. Vol. 2. No. 1.
- Murhadi. 2009. Senyawa dan Aktivitas Antimikroba Golongan Asam Lemak dan Esternya Dari Tanaman. Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian. Volume 14. No. 1. Hal. 97-105.
- Novadania A., Erwin, S. P. Pasaribu. 2014. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Kloroform Dari Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Kerehau (*Callicarpa longifolia* Lam.). Jurnal Kimia Mulawarman. ISSN 1695-5616. Volume 12. Nomor 1. 8-13.

- Nur, M. A. 1989. Spektroskopi. IPB : Bogor
- Nursidika P., O. Saptarini, N. Rafiqua. 2014. Aktivitas Antimikroba Fraksi Ekstrak Etanol Buah Pinang (*Areca catechu* L.) Pada Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. MKB. Volume 46. No. 2. 94-99.
- Oktaria R. dan S. Rahmanisa. 2016. Pengaruh *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG) Pada The Hijau Terhadap *Acne vulgaris*. Majority. Volume 5. Nomor 2. 101-105.
- Oku, H., Yamashiro, H., Onaga, K., Sakai, K dan Iwasaki, H. 2003. Seasonal Changes In The Content and Composition of Lipids In The Coral *Goniastrea aspera*. Coral Reefs 22: 83 -85.
- Pasaraeng E., J. Abidjulu, M. R. J. Runtuwene. 2013. Pemanfaatan Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica* Val) Dalam Upaya Mempertahankan Mutu Ikan Layang (*Decapterus* sp.). Jurnal MIPA UNSRAT. 2(2). 64-87.
- Patra J. K., A. D. Mohapatra, S. K. Rath, N. K. Dhal, H. Thatoi. 2009. Screening Of Antioxidant and Antifilarial Activity Of Leaf Extracts Of *Excoecria agallocha* L. International Journal Of Integrative Biology. ISSN 0973-8363. Vol. 7. No. 1. pp 9-15.
- Pelczar, M. J dan E. C. S. Chan. 1998. Dasar-Dasar Mikrobiologi 2. UI Press. Jakarta
- Permata, D. 2012. Optimasi Metode Identifikasi Antalgin dan Klorfeniramin Maleat Secara KCKT Photodiode Array Setelah Pemisahan dengan Solid Phase Extraction Pada Sediaan Serbuk Obat Tradisional. Skripsi. Program Ekstensi Departemen Farmasi FMIPA. Universitas Indonesia. Depok.
- Poeloengan M. dan Andriani. 2013. Kandungan Senyawa Aktif dan Daya Antibakteri Daun Sambung Darah. Jurnal Veteriner. ISSN 1411-8320. Vol. 14. No. 2. 145-152.
- Pratiwi D. A. N. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis* L.) Dan Bioautografi Terhadap *Bacillus subtilis* Dan *Shigella sonnei*. Naskah Publikasi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Prihanto, A. A., M. Firdaus dan Nurdiani R. 2011. Penapisan Fitokimia dan Antibakteri Ekstrak Metanol Mangrove (*Excoecaria agallocha*) dari Muara Sungai Porong. Berk Panel Hayati 17 : 69-72
- Prihantoro T., R. Indra, Sumarno. 2006. Efek Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum*) Terhadap *Shigella dysenteriae* Secara In Vitro. Jurnal Kedokteran Brawijaya. Vol. XXII. No. 3. Hal. 101-104.
- Purnobasuki H. 2004. Potensi Mangrove Sebagai Tanaman Obat. Biota. IX (2).
- Putri, Z. F. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper Bettle* L.) Terhadap *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus aureus* Multiresisten. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.

- Syakur, A. 2008. Pengaruh Unsur Besi Terhadap Fasa Intermetalik Secara Kualitatif dan Kuantitatif. Fakultas Teknik. Universitas Indonesia
- Rita I. 2011. Proses Emulsifikasi dan Analisis Biaya Produksi Minuman Emulsi Minyak Sawit Merah. Thesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Riyanto E. I., I. Widowati dan A. Sabdono. 2013. Skrining Aktivitas Antibakteri Pada Ekstrak *Sargassum polycystum* Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* dan *Micrococcus luteus* Di Pulau Panjang Jepara. Jurnal Of Marine Research. Halaman 115-121.
- Rosyidah K., S. A. Nurmuhaimina, N. Komari dan M. D. Astuti. 2010. Aktivitas Antibakteri Fraksi Saponin Dari Kulit Batang Tumbuhan Kasturi (*Mangifera casturi*). Alchemy. Vol. 1. No. 2. Hal. 53-103.
- Sa'adah L. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanin Dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Santosa C. M. dan I. Hertiani. 2005. Kandungan Senyawa Kimia dan Efek Ekstrak Air Daun Bangun-Bangun (*Coleus amboinicus*, L.) Pada Aktivitas Fagositosis Netrofil Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). Majalah Farmasi Indonesia. 16(3). 141-148.
- Saputra I., G. Prihandini, S. Zulaikah, M. Rachimoellah. 2013. Ekstraksi Senyawa *Bioactiv* Dari Daun *Moringa oleifera*. Jurnal Teknik Pomits. ISSN 2337-3539. Vol. 2. No. 1. Hal. 1-5.
- Sari C. Y. 2015. Penggunaan Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Untuk Menurunkan Tekanan Darah Tinggi. J. Majority. Volume 4. Nomor 3. 34-40.
- Sari F. P. dan S. M. Sari, 2011. Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba Dari Tanaman Yodium (*Jatropha Multifida* Linn) Sebagai Bahan Baku Alternatif Antibiotik Alami. Jurusan Teknik Kimia. Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Sastrohamidjojo, H. 2001. Kromatografi. Liberty. Yogyakarta. Hal 1-108.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. Sintesis Bahan Alami. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 1-243).
- Setiawan H., R. Faizal dan A. Amrullah. 2015. Penentuan Kondisi Optimum Modifikasi Konsentrasi *Plasticizer Sorbitol PVA* Pada Sintesa Plastik *Biodegradable* Berbahan Dasar Pati Sorgum dan *Chitosan* Limbah Kulit Udang. Saintekno. Vol. 13. No. 1. 29-38.
- Setiaji A. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat dan Etanol 70 % Rhizoma Binahong (*Anredera cordifolia* (Tanore) Steen) Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Eschericia coli* ATCC 11229 Serta Skrining Fitokimianya. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.

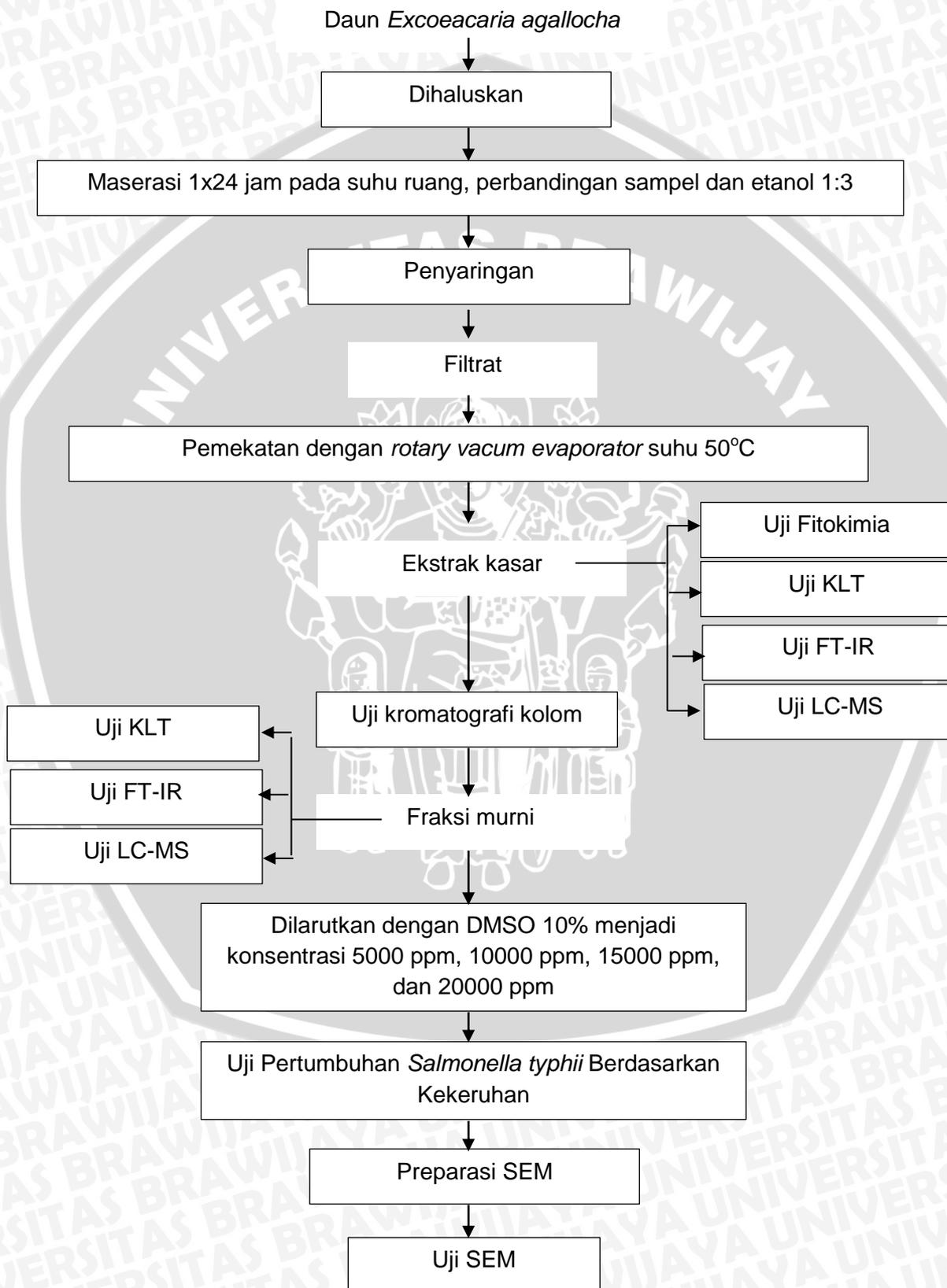
- Simanjuntak P. 2008. Identifikasi Senyawa Kimia Dalam Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*), Thymelaceae. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. ISSN 1693-1831. Hal. 23-28.
- Soeroyo. 1992. Sifat, Fungsi dan Peranan Hutan Mangrove. Bahan Kursus Pelatihan Dasar Metodologi Penelitian Sumberdaya Hayati Lingkungan Laut. Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi. LIPI. Jakarta.
- Suhartana. 2007. Kemampuan Ligan Hipoxantin dan Quinin Untuk Ekstraksi Kation Perak pada Fasa Air-Kloroform. Jurnal Sains & Matematika (JSM). Volume 15. Nomor 1. Hal. 25-32.
- Susanti A. D., D. Ardiana. G. P. Gumelar. Y. G. Bening. 2012. Polaritas Pelarut Sebagai Pertimbangan Dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak Bekatul Dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza sativa glatinosa*). Simposium Nasional RAPI XI FT. ISSN 1412-9612. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Trimulyono J. 2012. Aktivitas Anti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Ekstrak *Excoecaria agallocha*. Skripsi. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Vadiapudi V., V. Bobbarala, S. Panumajji, K. C. Naidu. 2009. *Excoecaria agallocha* L. Antimicrobial Properties Againsts Important Pathogenic Microorganisms. International Journal Of ChemTech Research. Vol. 1. No. 4. pp 865-867.
- Widodo, W. 2015. Tanaman Beracun Dalam Kehidupan Ternak.
- Wiguna A. S., L. kusmita dan O. K. Radjasa. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Pigmen Karotenoid Dari Bakteri Symbion Karang Lunak *Sarcophyton* sp. Terhadap Pertumbuhan Bakteri Patogen *Staphylococcus aureus* ATCC 25293. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Wijono S. H. S. 2003. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid Pada Daun Katu (*Sauropus androgynous* (L.) Merr). Makara. Sains. Vol. 7. No. 2. 51-54.
- Wiratmaja I. G., I. G. B. W. Kusuma dan I. N. S. Winaya. 2011. Pembuatan Etanol Generasi Kedua Dengan Memanfaatkan Limbah Rumput Laut *Euचेuma cottonii* Sebagai Bahan Baku. Jurnal Ilmiah Teknik Mesin Cakram. Vol. 5. No. 1.
- Wittstock U. dan J. Gershenzon. 2002. Constitutive Plant Toxins and Their Role In Defense Against Herbivores and Pathogens. Max Planck Institute for Chemical Ecology. Department of Biochemistry. Elsevier Science Ltd. Germany.
- Yudhaningtyas I. M. 2012. Uji Efektivitas Ekstrak Metanol Daun Pare (*Momordica carantia* L.) Sebagai Antimikroba terhadap Bakteri *Shigella flexneri* Secara *In Vitro*. Skripsi. Program Studi Pendidikan Dokter. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Malang.

- Yohrami Y. 2008. Penentuan Kandungan Flavonoid Dari Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* Scheff Boerl). Jurnal Penelitian & Pengabdian dppm.ui.ac.id. Hal. 1-16.
- Yunita E. A., N. H. Suprpti, J. W. Hidayat. 2009. Pengaruh Ekstrak Daun Teklan (*Eupatorium riparium*) Terhadap mortalitas dan Perkembangan Larva *Aedes aegypti*. Bioma. ISSN 1410-8801. Vol. 11. No. 1.
- Yuwono L. F. 2009. Daya Antibakteri Ekstrak Daun The (*Camellia sinensis*) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus* sp. Pada Plak Gigi *In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur penelitian secara umum



Lampiran 2. Pembuatan DMSO 10% dan Konsentrasi Fraksi

- Pembuatan DMSO 10%

$$\text{DMSO 10\%} \times 1 \text{ ml stok} = \text{DMSO 10\%} \times (x) \text{ ml}$$

$$(x) \text{ ml} = \text{DMSO 10\%} \times 1 \text{ ml} : \text{DMSO 10\%}$$

$$= 10 \text{ ml}$$

Jadi sebanyak 1 ml DMSO 10 % dilarutkan dalam aquades hingga volume 10 ml

- Pembuatan Konsentrasi**Stok fraksi 10000 ppm**

$$1 \text{ ppm} = 1 \text{ mg} : 1000 \text{ ml}$$

$$10000 \text{ ppm} = 10000 \text{ mg} : 1000 \text{ ml} > 100 \text{ mg} : 10 \text{ ml}$$

Jadi sebanyak 100 mg fraksi A dilarutkan dalam 10 ml DMSO 10%

➤ Pembuatan Konsentrasi 5000 ppm

$$10000 \text{ ppm} \times 1 \text{ ml stok} = 5000 \text{ ppm} \times (x) \text{ ml}$$

$$(x) \text{ ml} = \frac{10000 \text{ ppm} \times 1 \text{ ml}}{5000 \text{ ppm}}$$

$$(x) \text{ ml} = 2 \text{ ml}$$

Jadi sebanyak 1 ml stok fraksi 10000 ppm dilarutkan dengan DMSO 10 % hingga volume 2 ml

➤ **Pembuatan Konsentrasi 10000 ppm**

$$10000 \text{ ppm} \times 1 \text{ ml stok} = 10000 \text{ ppm} \times (x) \text{ ml}$$

$$(x) \text{ ml} = \frac{10000 \text{ ppm} \times 1 \text{ ml}}{10000 \text{ ppm}}$$

$$(x) \text{ ml} = 1 \text{ ml}$$

Jadi sebanyak 1 ml stok fraksi 10000 ppm dilarutkan dengan DMSO 10 %
hingga volume 1 ml

➤ **Pembuatan Konsentrasi 15000 ppm**

$$10000 \text{ ppm} \times 1 \text{ ml stok} = 15000 \text{ ppm} \times (x) \text{ ml}$$

$$(x) \text{ ml} = \frac{10000 \text{ ppm} \times 1 \text{ ml}}{15000 \text{ ppm}}$$

$$(x) \text{ ml} = 0,667 \text{ ml}$$

Jadi sebanyak 1 ml stok fraksi 10000 ppm dilarutkan dengan DMSO 10 %
hingga volume 0,667 ml

➤ **Pembuatan Konsentrasi 20000 ppm**

$$10000 \text{ ppm} \times 1 \text{ ml stok} = 20000 \text{ ppm} \times (x) \text{ ml}$$

$$(x) \text{ ml} = \frac{10000 \text{ ppm} \times 1 \text{ ml}}{20000 \text{ ppm}}$$

$$(x) \text{ ml} = 0,5 \text{ ml}$$

Jadi sebanyak 1 ml stok fraksi 10000 ppm dilarutkan dengan DMSO 10 %
hingga volume 0,5 ml

Lampiran 3. Pembuatan Media *Nutrient Broth* (NB) dan *Mueller Hinton Agar*

(MHA)

- Pembuatan Media NB (*Nutrient Broth*)

Komposisi	Jumlah (g)
Pepton	5
Aquades	1,85
Ekstrak daging	3

Cara pembuatan:

- Perhitungan

$$\text{Jumlah NB yang dibutuhkan} = \frac{13 \times \text{jumlah tabung} \times \text{isi tabung}}{1000}$$

- Yang harus dibuat adalah 1 tabung reaksi yang berisi 8 mL

$$\text{Jumlah NB yang dibutuhkan} = \frac{13 \times 20 \times 8}{1000}$$

$$= 2,08 \text{ g NB yang dibutuhkan untuk 1 tabung reaksi}$$

- Pembuatan Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Komposisi	Jumlah (g)
Casein Hydrolisate	17,5
Starch	1,6
Agar	13
Infusion From meeat	2,0

Cara pembuatan:

- Perhitungan

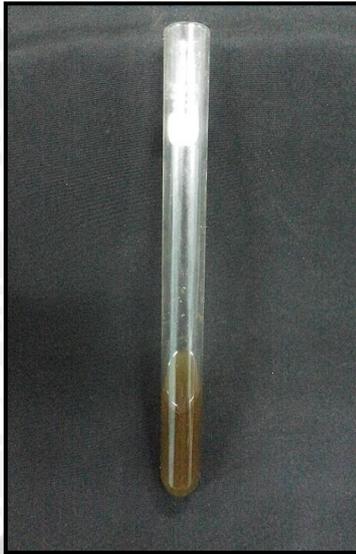
$$\text{Jumlah MHA yang dibutuhkan} = \frac{34 \times \text{jumlah tabung} \times \text{isi tabung}}{1000}$$

- Yang harus dibuat adalah 1 tabung reaksi yang berisi 10 mL

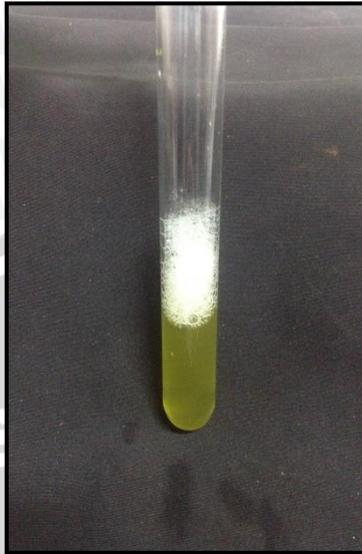
$$\text{Jumlah MHA yang dibutuhkan} = \frac{34 \times 5 \times 20}{1000}$$

$$= 3,4 \text{ g MHA yang dibutuhkan untuk 5 tabung reaksi}$$

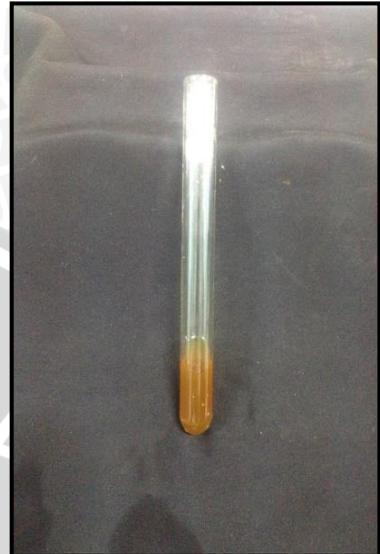
Lampiran 4. Uji Fitokimia



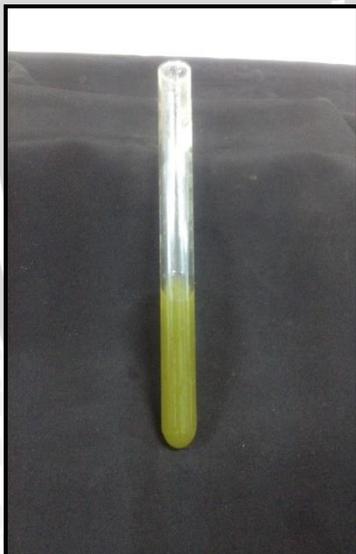
Senyawa Alkaloid (+)



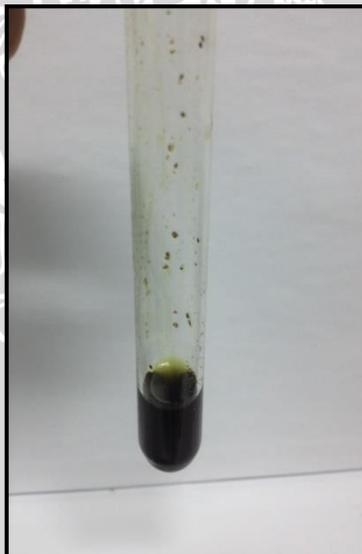
Senyawa Saponin (+)



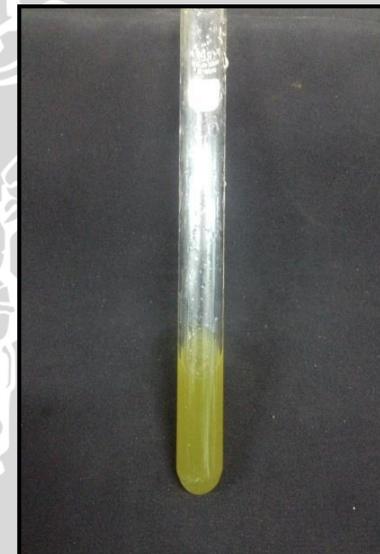
Senyawa Flavonoid (+)



Senyawa Steroid (++)



Senyawa Tanin (++)



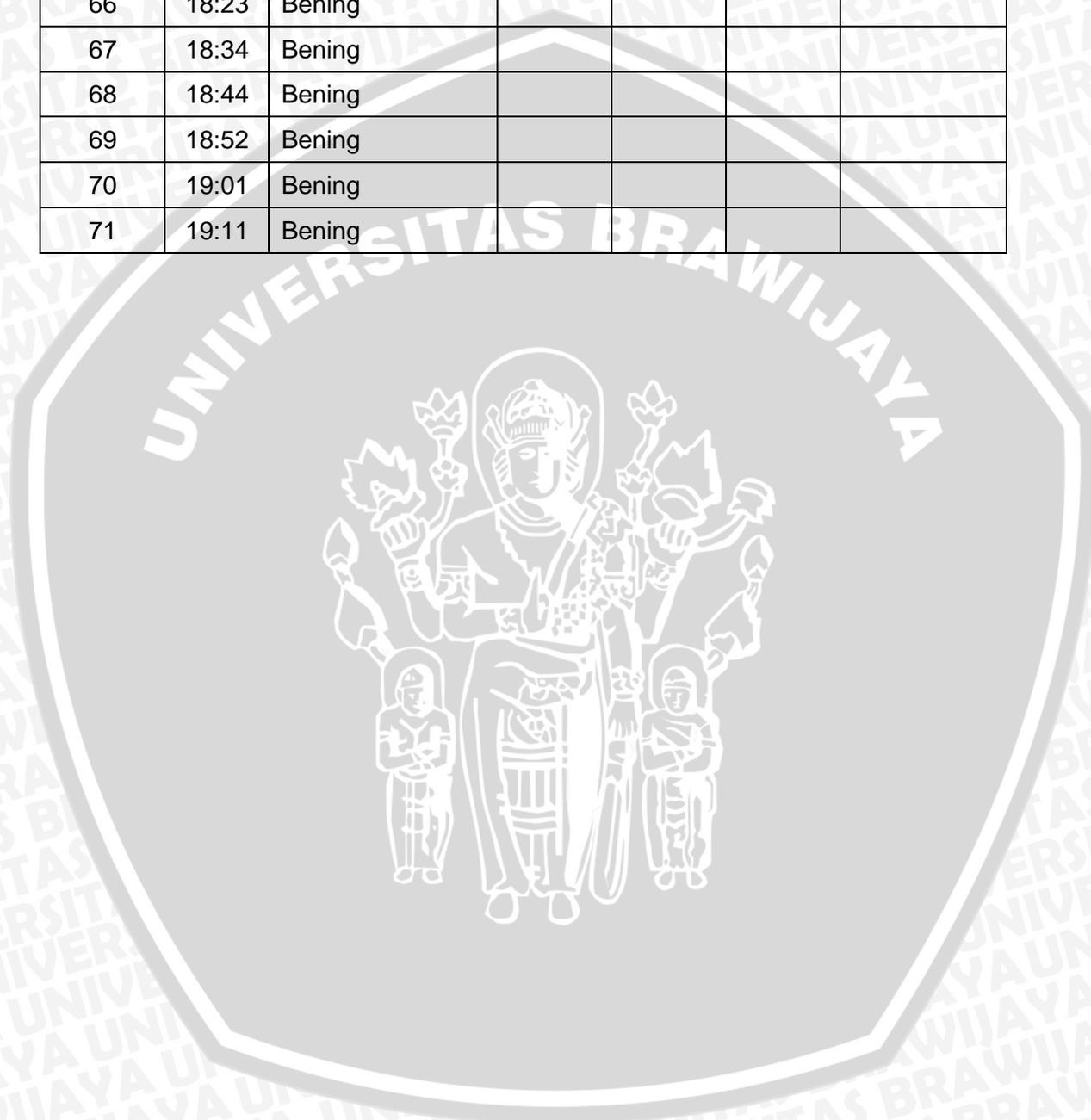
Senyawa Terpenoid (-)

Lampiran 5. Uji Kromatografi Kolom

Tabung Ke-	Menit	Warna	Pelarut (Heksan: Etilasetat)	mL Pelarut	Jumlah Pelarut Tiap Botol Vial	Keterangan
1	07:10	Bening	8:2	200 mL	20 mL	
2	07:19	Bening				
3	07:29	Hijau terang kecoklatan				Tanin
4	07:37	Hijau terang kecoklatan	7:3	200 mL		Tanin
5	07:47	Hijau terang				Steroid
6	07:55	Hijau terang				Steroid
7	08:03	Kuning kehijauan				Flavonoid
8	08:15	Kuning kehijauan				Flavonoid
9	08:23	Kuning kehijauan				Flavonoid
10	08:34	Hijau kemerahan				Alkaloid
11	08:43	Hijau kemerahan	6:4	200 mL	20 mL	Alkaloid
12	08:53	Hijau kemerahan				Alkaloid
13	09:03	Hijau kemerahan				Alkaloid
14	09:11	Bening				
15	09:21	Bening				
16	09:30	Bening				
17	09:39	Bening	5:5	200 mL	10 mL	
18	09:50	Bening				
19	10:00	Bening				
20	10:11	Bening				
21	10:20	Bening				
22	10:29	Bening				
23	10:39	Bening				
24	10:51	Bening				
25	11:01	Bening				
26	11:10	Bening				
27	11:22	Bening				
28	11:31	Bening	4:6	200 mL	10 mL	

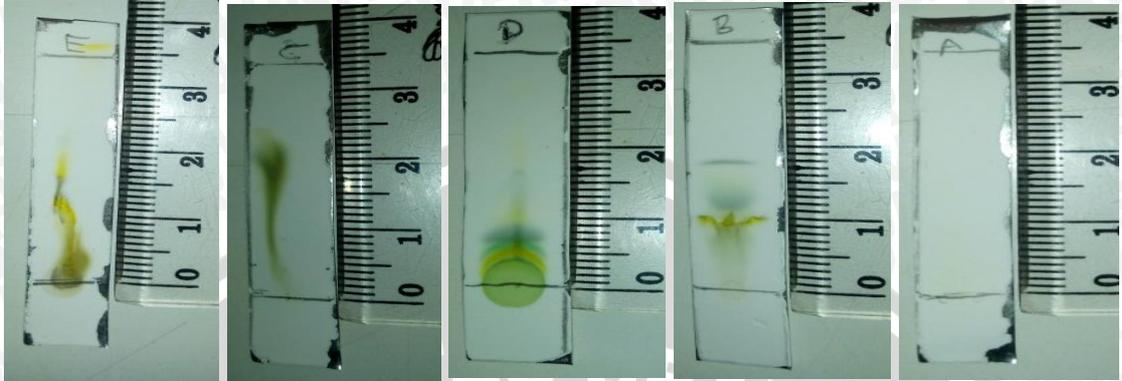
29	11:41	Bening				
30	11:50	Bening				
31	12:00	Bening				
32	12:09	Bening				
33	12:19	Bening				
34	12:32	Bening				
35	12:44	Bening				
36	12:53	Bening				
37	13:06	Bening				
38	13:19	Bening				
39	13:30	Bening				
40	13:40	Bening				
41	13:52	Bening				
42	14:02	Bening	3:7	200 mL	10 mL	
43	14:13	Bening				
44	14:26	Bening				
45	14:37	Bening				
46	14:48	Bening				
47	14:58	Bening				
48	15:09	Bening				
49	15:19	Bening				
50	15:30	Bening				
51	15:41	Bening				
52	15:51	Bening				
53	16:01	Bening				
54	16:11	Bening				
55	16:20	Bening				
56	16:31	Bening				
57	16:41	Bening				
58	16:52	Bening	2:8	200 mL	10 mL	
59	17:03	Bening				
60	17:13	Bening				
61	17:25	Bening				

62	17:37	Bening				
63	17:49	Bening				
64	18:02	Bening				
65	18:13	Bening				
66	18:23	Bening				
67	18:34	Bening				
68	18:44	Bening				
69	18:52	Bening				
70	19:01	Bening				
71	19:11	Bening				



Lampiran 6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

- Hasil Kromatografi Lapis Tipis



Gambar a.

Gambar b.

Gambar c

Gambar d.

Gambar e.

Ket: a. crude, b. fraksi A, c. fraksi B, d. fraksi C, e. fraksi D

- Perhitungan Nilai Rf KLT

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh noda sampel}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

- A. Fraksi A (diduga tanin)

$$R_f = \frac{2,5}{3,5} \\ = 0,715$$

- B. Fraksi B (diduga steroid)

$$R_f = \frac{2,3}{3,5} \\ = 0,65$$

- C. Fraksi C (diduga flavonoid)

$$R_f = \frac{0,75}{3,5} \\ = 0,214$$

- D. Fraksi D (diduga alkaloid)

$$R_f = \frac{1,75}{3,5} \\ = 0,5$$

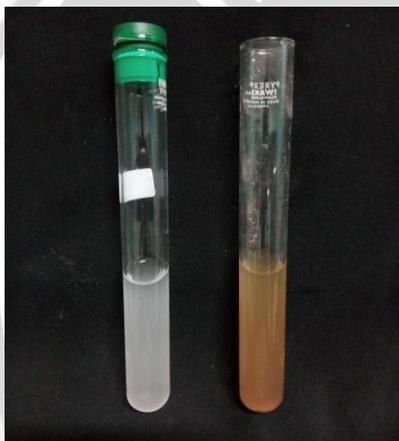
- E. Crude

$$R_f = \frac{2,4}{3,5} \\ = 0,68$$

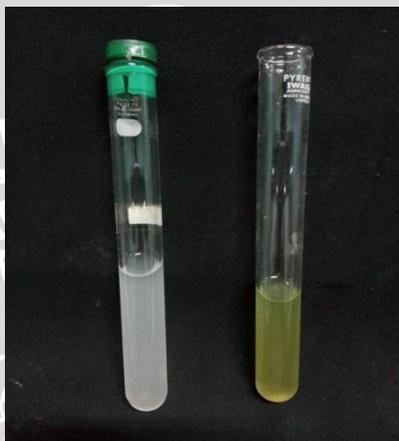
Lampiran 7. Hasil Uji Pertumbuhan Bakteri Berdasarkan Kekeruhan



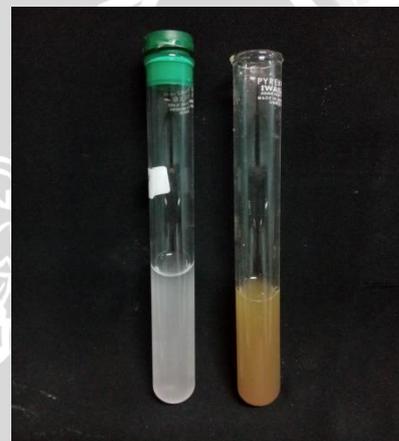
Kontrol = tabung nomor 8



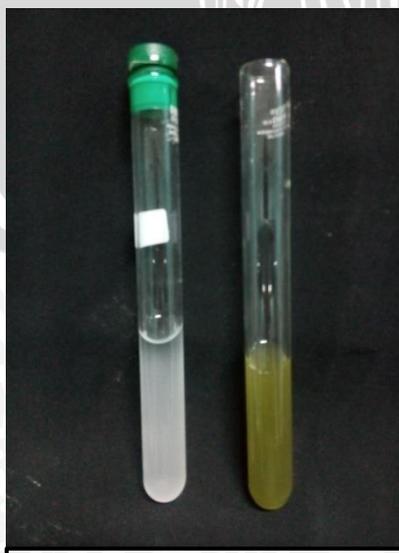
Fraksi A = tabung nomor 5



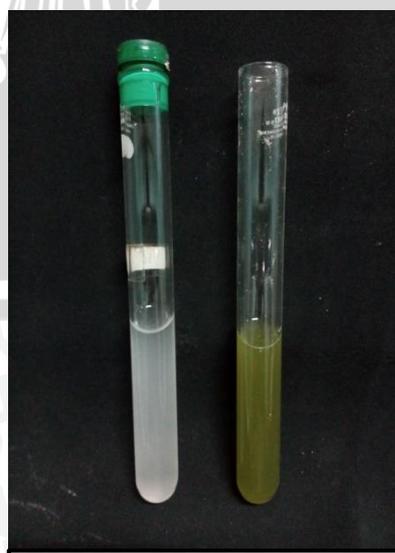
Fraksi B = tabung nomor 3



Fraksi C = tabung nomor 4

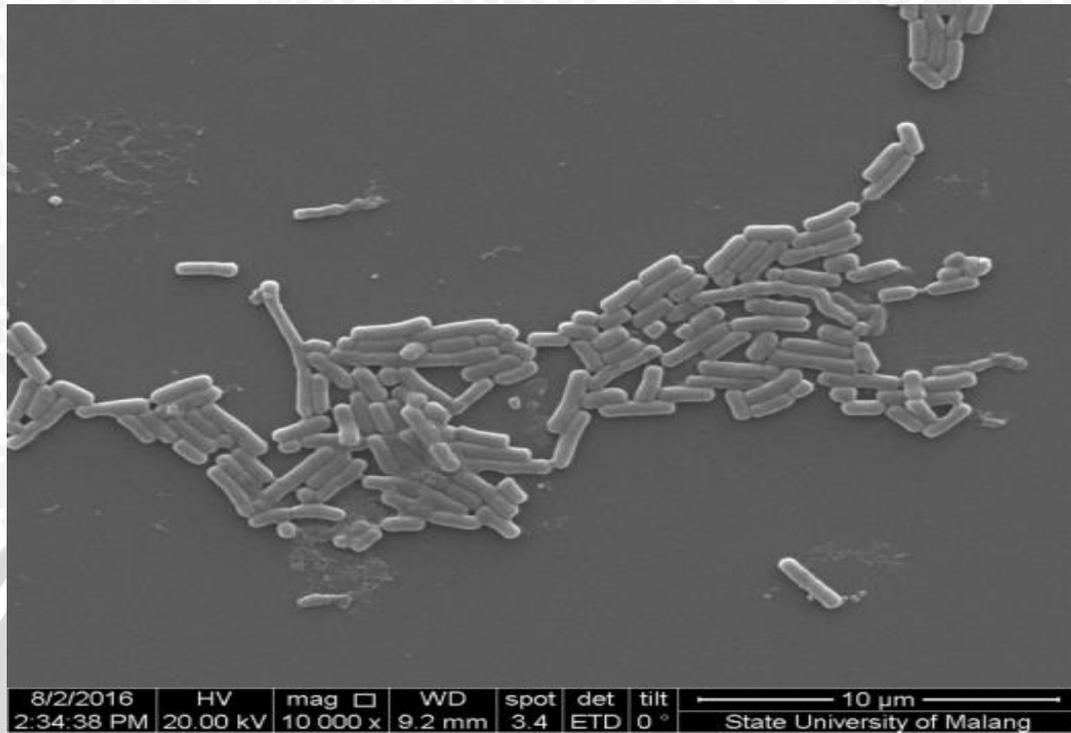


Fraksi D = tabung nomor 4

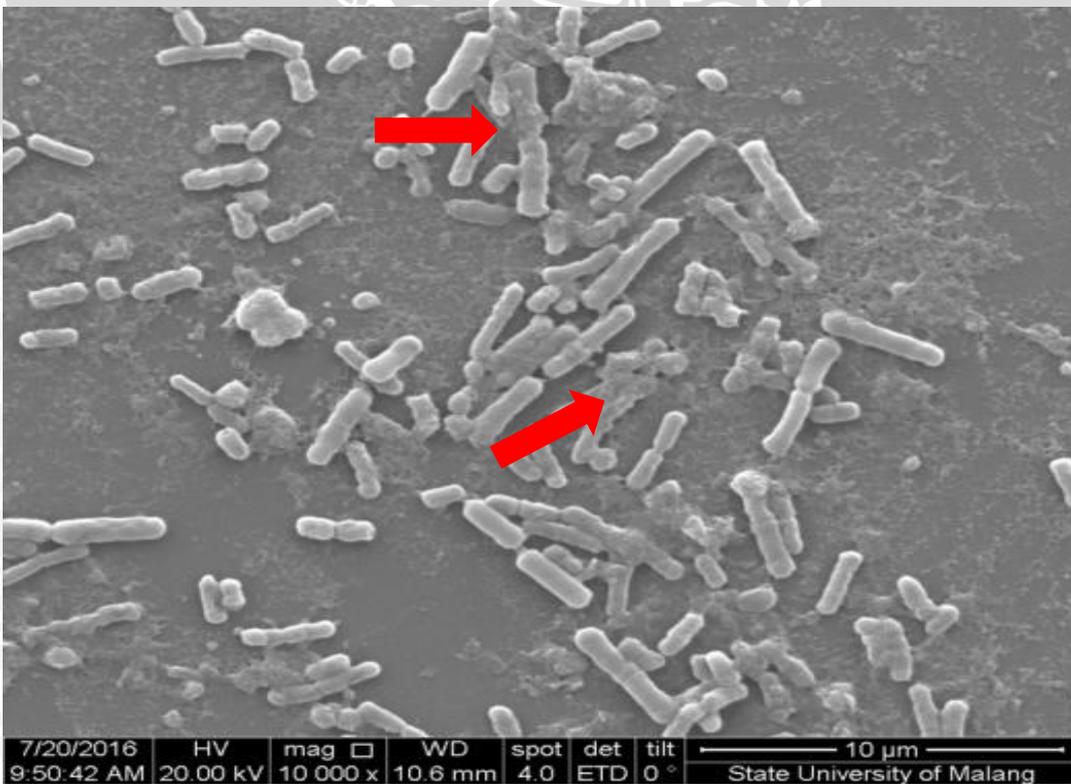


Crude = tabung nomor 3

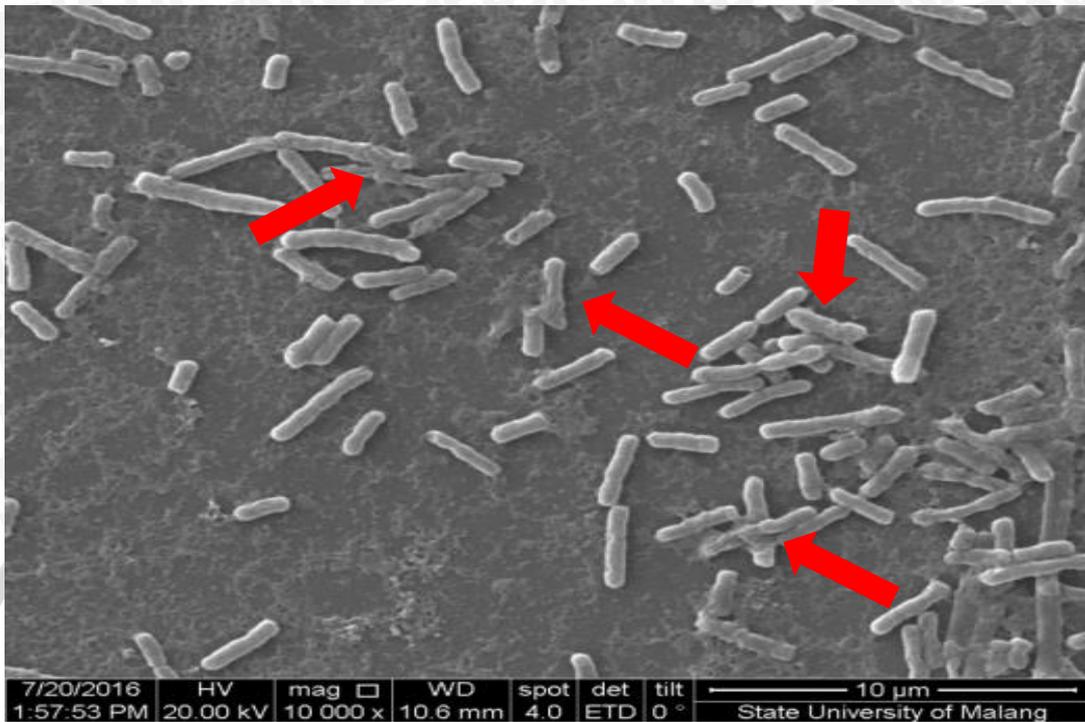
Lampiran 8. Hasil Uji SEM (Scanning Electron Microscope)



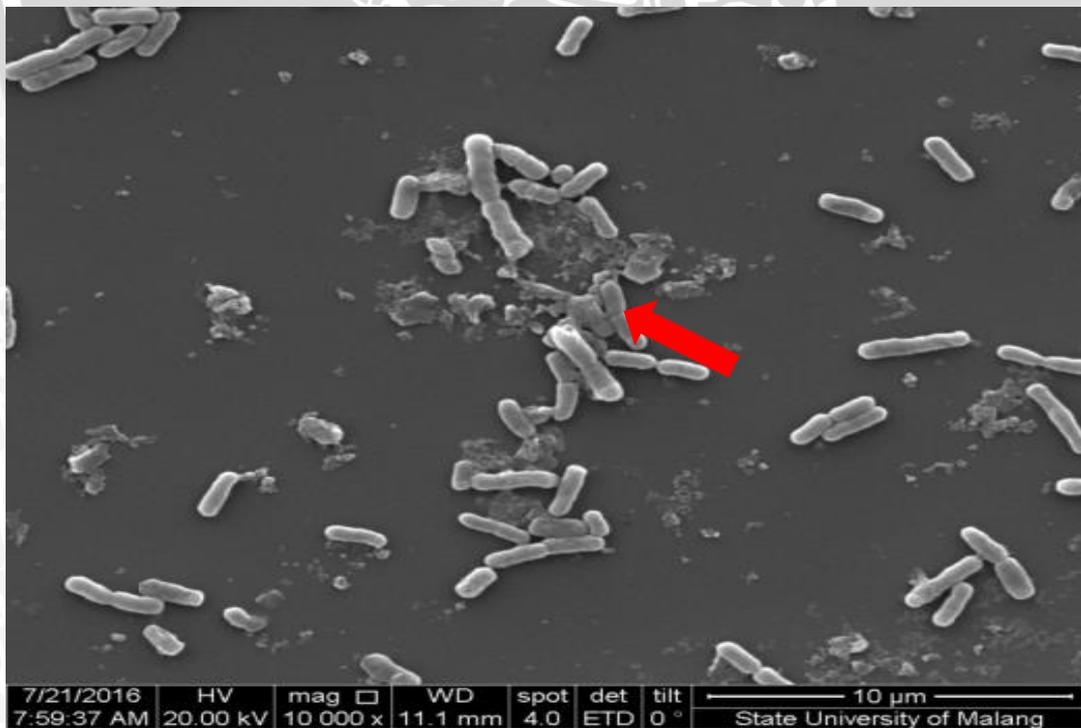
Gambar 1. *Shigella flexneri* kontrol



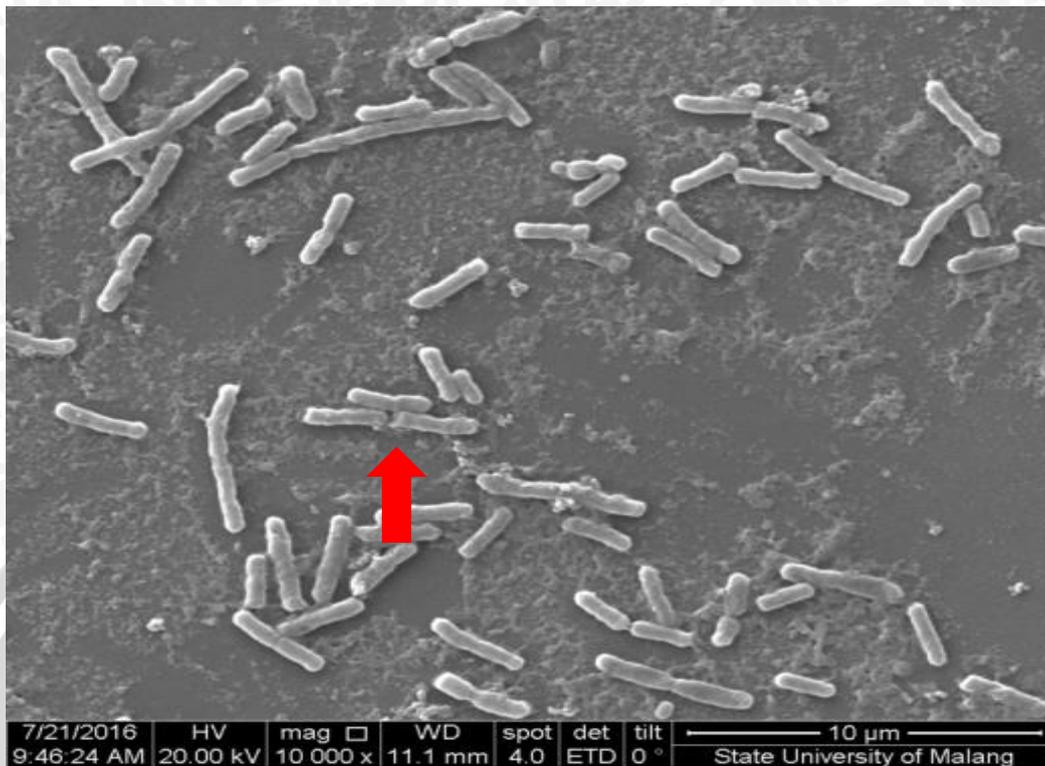
Gambar 2. *Shigella flexneri* dengan penambahan fraksi A



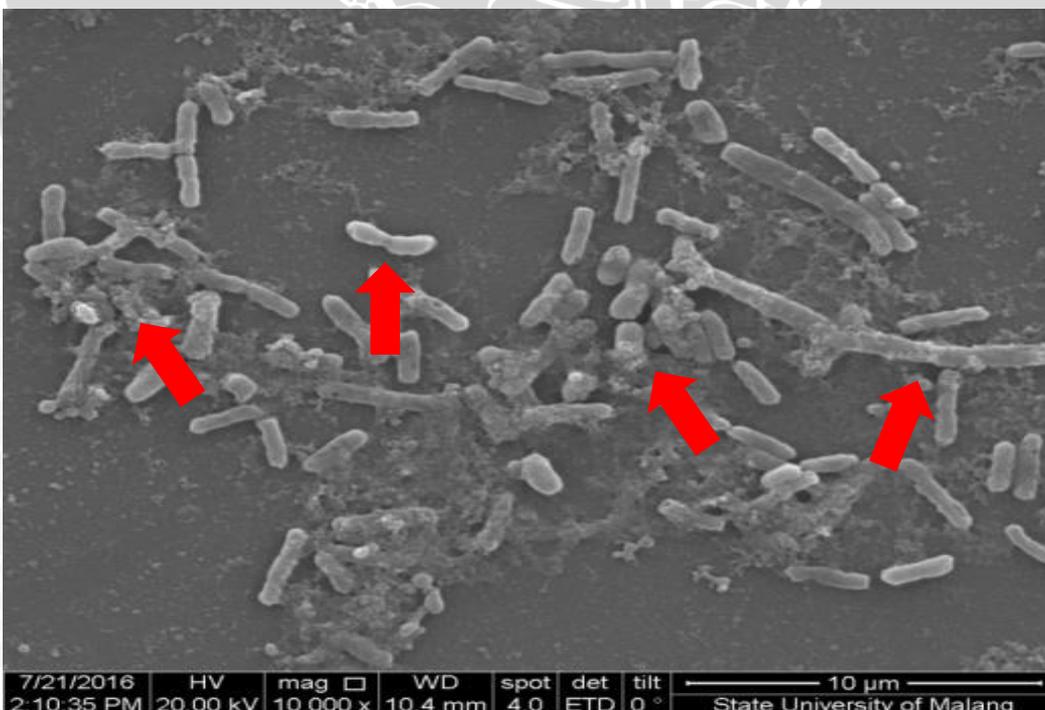
Gambar 3. *Shigella flexneri* dengan penambahan fraksi B



Gambar 4. *Shigella flexneri* dengan penambahan fraksi C



Gambar 5. *Shigella flexneri* dengan penambahan fraksi D



Gambar 6. *Shigella flexneri* dengan penambahan crude