

**UJI DAYA HAMBAT DAN ANALISIS
KLT BIOAUTOGRAFI EKSTRAK AKAR DAN BUAH
BAKAU (*Rhizophora stylosa* Griff.) TERHADAP
*Vibrio harveyi***

**AKHYAR
N111 05 033**



SKR-~~FD~~
AKH.
U

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

**UJI DAYA HAMBAT DAN ANALISIS
KLT BIOAUTOGRAFI EKSTRAK AKAR DAN BUAH
BAKAU (*Rhizophora stylosa* Griff.) TERHADAP
*Vibrio harveyi***

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**AKHYAR
N111 05 033**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

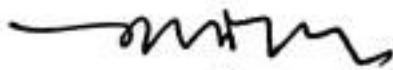
**UJI DAYA HAMBAT DAN ANALISIS
KLT BIOAUTOGRAFI EKSTRAK AKAR DAN BUAH
BAKAU (*Rhizophora stylosa* Griff.) TERHADAP
*Vibrio harveyi***

AKHYAR

N111 05 033

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



Prof. Dr. H. M. Natsir Djide, MS, Apt.
NIP. 19500817197903 1 003

Pembimbing Pertama,



Subehan, M. Pharm. Sc, Ph. D, Apt.
NIP. 19750925200112 1 002

Pada tanggal Juni 2010

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, hasbunallah wa nikmal wakil Puji syukur kepada Allah SWT tiada tuhan selain Dia Yang Maha mengetahui dan Maha perkasa, hanya kepada-Nyalah kami memohon pertolongan dan cukuplah Allah menjadi penolong kami. Hanya bekat limpahan rahmat dan rahim-Nyalah sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Skripsi ini sebagai salah satu syarat menyelesaikan studi S1 penulis di Fakultas Farmasi tercinta.

Allahummashalli ala Muhammad wa ala ali Muhammad, salawat dan salam senantiasa tercurah kepada baginda Rasulullah Muhammad SAW yang senantiasa menjadi teladan dan sumber inspirasi penulis.

Banyak kendala yang penulis hadapi dalam penyusunan skripsi ini. Namun adanya bantuan dan dukungan banyak pihak sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik. Oleh karena itu, penulis dengan sepenuh hati menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Pembimbing utama Prof. Dr. H. M. Natsir Djide, MS., Apt., dan pembimbing pertama Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. yang telah menyumbangkan waktu, pikiran dan tenaganya dalam membimbing penulis.
2. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt., Pembantu Dekan I Prof. Dr.rer.nat Marianti A.

- Manggau, Apt., Pembantu Dekan II Drs. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt. dan Pembantu Dekan III Drs. Abd. Muzakkir Rewa, M.Si., Apt.
3. Ketua Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi UNHAS Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
 4. Drs. A. Ilham Makhmud Dip.Sc, Apt. selaku Penasehat Akademik.
 5. Seluruh dosen dan staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
 6. Ayahanda Anwar dan Ibunda Nurasia serta saudaraku Anas, Subhan, dan Ashar yang selalu memberikan doa dan dukungan.

Terkhusus kepada teman-teman Galenica 05, kakanda senior dan adinda-adinda seperjuangan yang senantiasa berbagi di saat suka maupun duka. Serta kepada semua pihak yang telah membantu penulis yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih sangat jauh dari kesempurnaan, namun besar harapan penulis kiranya karya ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Semoga apa yang telah kita lakukan bernilai ibadah di sisi Allah SWT dan kita senantiasa mendapatkan ridha-Nya. Amin.

Makassar, 2010

Penulis

ABSTRAK

Penelitian uji daya hambat dan analisis KLT bioautografi ekstrak akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) terhadap *Vibrio harveyi* telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi* dan membandingkan daya hambatnya pada ekstrak dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu pada ekstrak n-heksan, ekstrak n-butanol dan ekstrak air berdasarkan pada pengukuran diameter daerah hambatan yang terbentuk dengan metode difusi agar. Akar dan buah tanaman bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) diekstraksi dengan metanol menggunakan metode refluks pada akar dan soxhletasi pada buah, lalu dipartisi dengan pelarut n-heksan, n-butanol dan air. Ekstrak akar dan buah bakau dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi* dan ekstrak n-butanol akar dan buah memiliki rata-rata diameter daerah hambatan terbesar yaitu berturut-turut 15,5 mm dan 15,4 mm. Penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) yaitu keduanya memiliki nilai KHM yang sama yaitu 0,15%. Pengujian KLT bioautografi dengan pengelusi n-butanol : Asam asetat : Air (4 : 1 : 5) diperoleh daerah hambatan pada noda dengan Rf 0,13 pada akar dan 0,11 pada buah. Hasil identifikasi menunjukkan noda tersebut merupakan senyawa fenolik.

ABSTRACT

A research about antibacterial activity and TLC bioautography analyse of root and fruit extract of mangrove (*Rhizophora stylosa* Griff.) to *Vibrio harveyi* had been done. This research aim to know whether root and fruit extract of mangrove (*Rhizophora stylosa* Griff.) can inhibit growth *Vibrio harveyi* and compared their inhibitory in different polarity, that are n-heksan extract, n-butanol extract, and water extract base on measurement of inhibitory zone diameters which formed with agar diffution method. Root and fruit of mangrove (*Rhizophora stylosa* Griff.) were extracted with methanol using refluks method for root and soxhlet method for fruit, then partitioned with n-heksan, n-butanol and water. Root and fruit extract can inhibit growth of *Vibrio haveyi* and n-butanol extract of root and fruit had the biggest average inhibitory zone diameter that are 15,5 mm and 15,4 mm. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) determinate are 0,15% for both of them. TLC bioautografi assay with eluen n-butanol : asetat acid : water (4 : 1 : 5) is obtained inhibitory zone at spot with Rf 0,13 for root and 0,11 for fruit. Result of identification shown that the spots are phenolic.

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
II.1 Uraian Tumbuhan.....	5
II.1.1 Klasifikasi Tumbuhan.....	5
II.1.2 Nama Daerah.....	5
II.1.3 Morfologi Tumbuhan.....	6
II.1.4 Kegunaan Tumbuhan.....	7
II.1.5 Kandungan Kimia.....	7
II.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam.....	7
II.2.1 Definisi Ekstrak.....	7
II.2.2 Definisi Ekstraksi.....	7
II.2.3 Tujuan Ekstraksi.....	7
II.2.4 Jenis-Jenis Ekstraksi.....	8
II.2.5 Ekstraksi secara Refluks.....	8

II.2.6 Ekstraksi secara Soxhletasi	9
II.3 Tinjauan Umum Vibriosis	10
II.4 Tinjauan Umum Antimikroba	11
II.4.1 Antimikroba	11
II.4.2 Mekanisme Antimikroba	13
II.5 Uraian Bakteri	19
II.5.1 Klasifikasi	19
II.5.2 Sifat dan Morfologi	19
II.6 Pengujian Secara Mikrobiologi	20
II.7 Metode Pemisahan	21
II.7.1 Kromatografi Lapis Tipis	21
II.7.2 KLT Bioautografi	26
BAB III. PELAKSANAAN PENELITIAN	31
III.1 Penyiapan Alat dan Bahan	31
III.2 Pengambilan dan Penyiapan Sampel Penelitian	31
III.2.1 Pengambilan Sampel	31
III.2.2 Pengolahan Sampel	32
III.2.3 Ekstraksi Sampel	32
III.2.4 Partisi Ekstrak Metanol	33
III.2.5 Pembuatan Larutan Ekstrak	33
III.3 Sterilisasi Alat	34
III.4 Penyiapan Bahan Penelitian	34
III.4.1 Pembuatan Medium	34

III.4.2	Penyiapan Bakteri Uji.....	35
III.4.2.1	Peremajaan Bakteri.....	35
III.4.2.2	Pembuatan Suspensi Bakteri	35
III.5	Pengujian Daya Hambat	35
III.6	Penentuan Nilai KHM.....	35
III.7	Pemisahan Senyawa secara KLT	36
III.8	Pengujian KLT Bioautografi	36
III.9	Identifikasi Senyawa Kimia.....	37
III.10	Pengolahan dan Analisis Data	37
III.11	Pengambilan Kesimpulan.....	37
BAB	IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	38
IV.1	Hasil Penelitian.....	38
IV.2	Pembahasan	39
BAB	V. KESIMPULAN DAN SARAN	43
V.1	Kesimpulan.....	43
V.2	Saran.....	43
	DAFTAR PUSTAKA.....	44
	LAMPIRAN	48

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Hasil pengukuran diameter daerah hambatan ekstrak metanol (ekstrak awal) akar dan buah bakau (<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.) terhadap <i>Vibrio harveyi</i>	51
2. Hasil pengukuran diameter daerah hambatan ekstrak akar dan buah bakau (<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.) terhadap <i>Vibrio harveyi</i>	51
3. Hasil penentuan nilai Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak akar dan buah bakau (<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.) terhadap <i>Vibrio harveyi</i>	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Hasil uji daya hambat ekstrak metanol bakau (<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.) terhadap <i>Vibrio harveyi</i>	56
2. Hasil uji daya hambat ekstrak n-heksan, ekstrak n-butanol dan ekstrak air bakau (<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.) terhadap <i>Vibrio harveyi</i>	56
3. Hasil penentuan nilai KHM ekstrak n-butanol akar dan buah bakau (<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.) terhadap <i>Vibrio harveyi</i>	57
4. Hasil KLT ekstrak n-butanol akar bakau (<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.)	57
5. Hasil KLT ekstrak n-butanol buah bakau (<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.)	58
6. Hasil KLT Bioautografi ekstrak n-butanol akar dan buah bakau (<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.)	58
7. Tanaman bakau (<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.)	59
8. Akar bakau (<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.).....	59
9. Buah bakau (<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.).....	59

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema kerja ekstraksi dan pengujian ekstrak	48
2. Skema kerja penentuan KHM.....	49
3. Komposisi medium	50
4. Tabel data	51
5. Perhitungan nilai Rf	52
6. Foto hasil penelitian.....	54
7. Hasil Determinasi	60

BAB I PENDAHULUAN

Indonesia memiliki ribuan jenis tumbuhan yang tersebar di berbagai daerah, di mana keanekaragaman hayati yang ada tersebut dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat modern dan tradisional. Masyarakat Indonesia telah lama mengenal dan memakai obat tradisional untuk mengobati berbagai macam penyakit. Semakin mahalnya harga obat modern dipasaran merupakan salah satu alasan untuk menggali kembali penggunaan obat tradisional. Banyak jenis tanaman obat di Indonesia yang telah dimanfaatkan sebagai bahan baku obat, sebagian spesies tanaman tersebut bahkan telah diuji secara klinis kandungan fitokimia, khasiat dan keamanan penggunaannya (1).

Tanaman bakau di Indonesia merupakan yang terbanyak di dunia, baik dari segi kuantitas area ($\pm 42.550 \text{ km}^2$) maupun jumlah spesies (± 45 spesies). Tanaman bakau mempunyai banyak manfaat, mulai dari manfaat ekologi sampai dengan sebagai sumber pangan dan obat (2). Sejumlah spesies tanaman bakau secara turun-temurun digunakan sebagai obat dan saat ini ekstraknya telah terbukti menyembuhkan penyakit pada manusia dan hewan termasuk penyakit yang disebabkan oleh bakteri, fungi dan virus (3). Tanaman bakau banyak digunakan masyarakat sebagai astrigen, obat angina, hemorrhagin, diare, diabetes, dan disentri (4).

Genus *Vibrio* merupakan bakteri penyebab beberapa penyakit, seperti vibriosis dan cholera (5). Salah satu spesies bakteri *Vibrio* adalah *Vibrio harveyi*. *Vibrio harveyi* merupakan bakteri patogen yang menyebabkan penyakit vibriosis pada udang, ikan dan kerang-kerangan (6).

Udang windu (*Panaeus monodon* Fab.) merupakan salah satu produk unggulan perikanan Indonesia. Permintaan pasar terhadap udang windu sangat tinggi, baik di dalam negeri maupun dari luar negeri. Hal ini disebabkan banyaknya keistimewaan yang dimiliki oleh udang windu dibandingkan dengan produk perikanan lainnya (7).

Pada saat permintaan udang dunia terus meningkat, terjadi penurunan produksi udang di Indonesia mulai tahun 2003 hingga sekarang. Penurunan tersebut terutama disebabkan oleh serangan infeksi bakteri akibat buruknya kondisi perairan sehingga terjadi kegagalan panen (8).

Penyakit pada udang windu yang mulai meresahkan masyarakat pembudidaya udang windu adalah penyakit vibriosis. Dampak yang ditimbulkan oleh penyakit tersebut adalah kematian udang secara massal yang mengakibatkan kerugian bagi pembudidaya udang windu (9).

Vibriosis biasanya ditanggulangi menggunakan senyawa kimia sintetik seperti antibiotik. Penggunaan antibiotik dalam waktu lama akan menimbulkan sejumlah masalah, utamanya resistensi bakterial dan residu yang dapat mencemari lingkungan. Oleh karena itu, pencarian senyawa-

senyawa antibakteri dari bahan alam yang efek sampingnya kurang saat ini menjadi perhatian utama (9). Sebuah penelitian melaporkan bahwa pemberian ekstrak buah tanaman bakau dapat menekan tingkat kematian udang windu (*Panaeus monodon* Fab.) yang telah diinfeksi *Vibrio harveyi* (8). Meskipun tanaman bakau memiliki banyak potensi, akan tetapi masih terbatas penelitian untuk mengidentifikasi senyawa bioaktifnya (3).

Berdasarkan uraian di atas, maka telah dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah ekstrak tanaman bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi* dan membandingkan daya hambatnya pada ekstrak dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu pada ekstrak n-heksan, ekstrak n-butanol dan ekstrak air serta mengetahui senyawa apa yang dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi*.

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode difusi agar dengan pemberian ekstrak sampel pada medium yang telah ditumbuhkan *Vibrio harveyi* dengan hipotesis bahwa pemberian ekstrak akar atau buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) pada konsentrasi tertentu akan menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi*. Kemudian untuk mengetahui senyawa aktif yang bersifat sebagai antibakteri digunakan metode KLT bioautografi.

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) terhadap *Vibrio harveyi*. Tujuannya untuk membandingkan daya hambat

ekstrak n-heksan, ekstrak n-butanol dan ekstrak air dari akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) serta mengidentifikasi senyawa yang dapat menghambat *Vibrio harveyi*. Penelitian ini diharapkan menjadi acuan penggunaan bahan alam dalam penanggulangan penyakit vibriosis pada budidaya udang windu.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II. 1 Uraian Tumbuhan

II.1.1 Klasifikasi Tumbuhan (10,11)

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Subkelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Myrtales
Suku	: Rhizophoraceae
Marga	: Rhizophora
Jenis	: <i>Rhizophora stylosa</i> Griff.

II.1.2 Nama Daerah (12,13)

Jawa	: tancang, tanjang
Madura	: tinjang
Bugis	: bangko
Seram	: abat
Aru	: kailau
Aceh	: bangka

II.1.3 Morfologi Tumbuhan (12,13,14)

Pohon besar, dengan akar tunjang yang menyolok dan bercabang-cabang. Tinggi 4-8 m, dengan tinggi akar mencapai 0,5-1 m di atas tanah. Diameter batang mencapai 20 cm.

Daun tunggal, terletak berhadapan, terkumpul di ujung ranting, dengan kuncup tertutup daun penumpu yang menggulung runcing. Helai daun elips, tebal, licin seperti kulit, hijau atau hijau muda kekuningan, berujung runcing, bertangkai, lebar 3,5-7 cm, panjang 13-23 cm. Daun penumpu cepat rontok, meninggalkan bekas serupa cincin pada buku-buku yang menggebung.

Bunga berkelompok dalam payung tambahan yang bertangkai dan menggarpu di ketiak, 8-16 kuntum, kecil-kecil, tabung kelopak bertaju sekitar 1,5 cm, putih, melengkung. Daun mahkota putih, berambut panjang hingga 8 mm. Perbungaan terjadi sepanjang tahun.

Buah hijau kecoklatan, panjang sampai dengan 4 cm. Hipokotil berbintil agak halus, 20-35 cm, leher kotiledon kuning kehijauan ketika matang, hipokotilnya berwarna hijau memanjang. Buah berbentuk telur memanjang sampai mirip buah pir yang kecil.

II.1.4 Kegunaan Tumbuhan (15,16)

Digunakan masyarakat sebagai astrigen, obat angina, menghentikan perdarahan (hemorrhagin), diare, demam, malaria, lepra, diabetes, disentri, antimuntah, antiseptik, hepatitis, bisul dan typhoid.

II.1.5 Kandungan Kimia (15,17)

Tanaman bakau mengandung tannin, saponin, steroid, alkaloid, flavonoid, benzoquinon, naphthoquinon, naphthofurans, polifenol, sesquiterpen, diterpen, triterpen, sterol, karbohidrat, o-metil-inositol, glikosida, asam amino bebas, feromon, gibberellin, senyawa sulfur, alkohol alifatik rantai panjang, lemak jenuh, dan asam lemak bebas.

II.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam

II.2.1 Definisi Ekstrak (18)

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, diluar pengaruh cahaya matahari langsung.

II.2.2 Definisi Ekstraksi (18,19)

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan dan termasuk biota laut. Zat-zat aktif tersebut berada di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya.

Umumnya, zat aktif yang terkandung dalam tanaman maupun hewan lebih larut dalam pelarut organik. Proses terekstraksinya zat aktif dalam tanaman adalah pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan terlarut sehingga terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di

dalam sel dan pelarut organik diluar sel. Maka larutan terpekat akan berdifusi ke luar sel, dan proses ini berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi zat aktif di dalam sel dan di luar sel.

II.2.3 Tujuan Ekstraksi (19)

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan, hewan dan biota laut dengan pelarut organik tertentu. Proses ekstraksi ini berdasarkan pada kemampuan pelarut organik untuk menembus dinding sel dan masuk dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dalam pelarut organik dan karena adanya perbedaan antara konsentrasi di dalam dan konsentrasi diluar sel, mengakibatkan terjadinya difusi pelarut organik yang mengandung zat aktif keluar sel. Proses ini berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel.

II.2.4 Jenis-jenis Ekstraksi (20)

Proses ekstraksi dapat dilakukan secara panas dan secara kering. Ekstraksi secara panas yaitu dengan metode refluks dan destilasi uap air, sedangkan ekstraksi dingin yaitu dengan maserasi, perkolasi dan soxhletasi.

II.2.5 Ekstraksi secara Refluks (20)

Prinsip kerja pada metode refluks yaitu penarikan komponen kimia yang dilakukan dengan cara sampel dimasukkan ke dalam labu alas bulat

bersama-sama dengan cairan penyari lalu dipanaskan, uap-uap cairan penyari terkondensasi pada kondensor bola menjadi molekul-molekul cairan penyari yang akan turun kembali menuju labu alas bulat, akan menyari kembali sampel yang berada pada labu alas bulat, demikian seterusnya berlangsung secara berkesinambungan sampai penyarian sempurna, penggantian pelarut dilakukan sebanyak 3 kali setiap 3-4 jam. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan.

II.2.6 Ekstraksi secara Soxhletasi (20)

Soxhletasi merupakan penyarian simplisia secara berkesinambungan, cairan penyari dipanaskan sehingga menguap, uap cairan penyari terkondensasi menjadi molekul-molekul air oleh pendingin balik dan turun menyari simplisia dalam klongsong dan selanjutnya masuk kembali ke dalam labu alas bulat setelah melewati pipa sifon. Proses ini berlangsung hingga penyarian zat aktif sempurna yang ditandai dengan beningnya cairan penyari yang melalui pipa sifon atau jika diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis tidak memberikan noda lagi.

Metode soxhletasi bila dilihat secara keseluruhan termasuk cara panas, namun proses ekstraksinya secara dingin, sehingga metode soxhletasi digolongkan dalam cara dingin.

Sample atau bahan yang akan diekstraksi terlebih dahulu diserbukkan dan ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam klongsong yang telah dilapisi dengan kertas saring sedemikian rupa (tinggi sample dalam klongsong tidak boleh melebihi pipa sifon). Selanjutnya labu alas

bersama-sama dengan cairan penyari lalu dipanaskan, uap- uap cairan penyari terkondensasi pada kondensor bola menjadi molekul-molekul cairan penyari yang akan turun kembali menuju labu alas bulat, akan menyari kembali sampel yang berada pada labu alas bulat, demikian seterusnya berlangsung secara berkesinambungan sampai penyarian sempurna, penggantian pelarut dilakukan sebanyak 3 kali setiap 3-4 jam. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan.

II.2.6 Ekstraksi secara Soxhletasi (20)

Soxhletasi merupakan penyarian simplisia secara berkesinambungan, cairan penyari dipanaskan sehingga menguap, uap cairan penyari terkondensasi menjadi molekul-molekul air oleh pendingin balik dan turun menyari simplisia dalam klongsong dan selanjutnya masuk kembali ke dalam labu alas bulat setelah melewati pipa sifon. Proses ini berlangsung hingga penyarian zat aktif sempurna yang ditandai dengan beningnya cairan penyari yang melalui pipa sifon atau jika diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis tidak memberikan noda lagi.

Metode soxhletasi bila dilihat secara keseluruhan termasuk cara panas, namun proses ekstraksinya secara dingin, sehingga metode soxhletasi digolongkan dalam cara dingin.

Sample atau bahan yang akan diekstraksi terlebih dahulu diserbukkan dan ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam klongsong yang telah dilapisi dengan kertas saring sedemikian rupa (tinggi sample dalam klongsong tidak boleh melebihi pipa sifon). Selanjutnya labu alas

bulat diisi dengan cairan penyari yang sesuai kemudian ditempatkan di atas *water bath* atau *heating* mantel dan diklem dengan kuat kemudian klongsong yang telah diisi sampel dipasang pada labu alas bulat yang dikuatkan dengan klem dan cairan penyari ditambahkan untuk membasahkan sampel yang ada dalam klongsong. Setelah itu kondensor dipasang tegak lurus dan diklem pada statif dengan kuat. Aliran air dan pemanas dijalankan hingga terjadi proses ekstraksi zat aktif sampai sempurna (biasanya 20-25 kali sirkulasi). Ekstrak yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan dengan rotavapor.

II.3 Vibriosis (21)

Vibrio merupakan penyebab utama penyakit vibriosis pada udang atau penyakit udang menyala dan dapat berperan sebagai patogen primer ataupun patogen sekunder. Sebagai patogen primer, *vibrio* masuk melalui kontak langsung dengan organisme, sedangkan sebagai patogen sekunder, *vibrio* menginfeksi organisme yang telah terlebih dahulu terinfeksi penyakit lain. *Vibrio* menyerang dengan merusak lapisan kutikula yang mengandung khitin dikarenakan *Vibrio* memiliki khitinase, lipase, dan protease. Vibriosis ini pada umumnya menyerang udang pada stadia mysis sampai awal pasca larva.

Ciri-ciri udang yang terserang vibriosis antara lain kondisi tubuh lemah, berenang lambat, nafsu makan hilang, badan mempunyai bercak merah-merah (*red discoloration*) pada *pleopod* dan abdominal serta pada malam hari terlihat menyala. Udang yang terkena vibriosis akan

menunjukkan gejala nekrosis. Bagian mulut kehitaman karena kolonisasi bakteri pada esophagus dan mulut.

Penanganan yang paling umum dilakukan untuk mengatasi vibriosis akibat infeksi *Vibrio harveyi* adalah dengan menggunakan bahan-bahan kimia seperti : Chloramphenicol 1,9 ppm, Oxytetracycline 2 ppm, Furazalidon 2-4 ppm, dan Prefuran 1,5-2,0 ppm. Akan tetapi sebagian besar obat-obatan yang digunakan tersebut pada akhirnya tidak efektif dan dapat mengakibatkan kelainan (deformities) pada larva udang serta dapat juga berakibat berkembangnya resistensi bakteri terhadap obat.

II.4 Tinjauan Umum Antimikroba

II.4.1 Antimikroba (22,23)

Antimikroba ialah obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang merugikan manusia. Dalam pembicaraan disini, yang dimaksud dengan mikroba terbatas pada jasad renik yang tidak termasuk kelompok parasit. Obat yang digunakan untuk membasmi mikroba, penyebab infeksi pada manusia, ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Artinya, obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes. Sifat toksisitas selektif yang absolut belum atau mungkin tidak akan diperoleh.

Antibiotika adalah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba, terutama fungi, yang dapat menghambat atau membasmi mikroba jenis lain. Berdasarkan atas struktur kimianya antibiotika dibagi menjadi 10

kelompok yaitu : antibiotika β -laktam (turunan penisilin, sefalosporin), turunan amfenikol, turunan tetrasiklin, aminoglikosida, antibiotika makrolida, polipeptida, antibiotika linkosamida, antibiotika polien, ansamisin, dan antrasiklin.

Antiseptika adalah senyawa kimia yang digunakan untuk menghambat atau mematikan mikroorganisme pada jaringan hidup, yang mempunyai efek membatasi dan mencegah infeksi agar tidak menjadi lebih parah. Sedangkan desinfektansia adalah senyawa kimia yang digunakan untuk menghambat atau mematikan mikroorganisme, yang digunakan pada benda mati dan dengan cepat menghasilkan efek letal yang tidak terpulihkan.

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antimikroba yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakteristatik; dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimal (KHM) atau kadar bunuh minimal (KBM). Antimikroba tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteristatik menjadi bakterisid bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM. Sifat antimikroba dapat berbeda satu dengan lainnya. Umpamanya, penisilin G bersifat aktif terhadap bakteri gram positif, sedangkan bakteri Gram-negatif pada umumnya tidak peka (resisten) terhadap penisilin G; streptomisin memiliki sifat yang sebaliknya; tetrasiklin aktif terhadap

beberapa bakteri gram-positif maupun bakteri gram negatif. Berdasarkan perbedaan ini antimikroba dibagi menjadi dua kelompok, yaitu berspektrum sempit, umpamanya bensil penisilin dan streptomisin, dan berspektrum luas umpamanya tetrasiklin dan kloramfenikol. Batas antara kedua jenis spektrum ini kadang tidak jelas.

II.4.2 Mekanisme Antimikroba (22,23)

Pemusnahan mikroba dengan antimikroba yang bersifat bakteristatik masih tergantung dari kesanggupan reaksi daya tahan tubuh hospes. Peranan lamanya kontak antara mikroba dan antimikroba dalam kadar efektif juga sangat menentukan untuk mendapatkan efek; khususnya pada tuberkulostatik.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok:

1. Antimikroba yang menghambat metabolisme sel mikroba.

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini ialah sulfonamid, trimetoprim, asam p-aminosalisilat (PAS) dan sulfon. Dengan mekanisme kerja ini diperoleh bakteristatik.

Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan mamalia yang mendapatkan asam folat dari luar, kuman patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam amino benzoat (PABA). Apabila sulfonamid dan sulfon menang bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Akibatnya,

kehidupan mikroba akan terganggu. Berdasarkan sifat kompetisi, efek sulfonamid dapat diatasi dengan meningkatkan kadar PABA.

Untuk dapat bekerja, dihidrofolat harus diubah menjadi bentuk aktifnya yaitu asam tetrahidrofolat. Enzim dihidrofolat reduktase yang berperan disini dihambat oleh trimetoprim, sehingga asam dihidrofolat tidak dapat direduksi menjadi asam tetrahidrofolat yang fungsional.

2. Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel mikroba.

Obat yang termasuk dalam kelompok ini ialah penisilin, sefalosporin, basitrasin, vankomisin, dan sikloserin. Dinding sel bakteri, terdiri dari polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Sikloserin menghambat reaksi yang paling dini dalam proses sintesis dinding sel; diikuti berturut-turut oleh basitrasin, vankomisin, dan diakhiri oleh penisilin dan sefalosporin, yang menghambat reaksi terakhir (transpeptidase) dalam rangkaian reaksi tersebut. Oleh karena tekanan osmotik dalam sel kuman lebih tinggi daripada di luar sel maka kerusakan dinding sel kuman akan menyebabkan terjadinya lisis, yang merupakan dasar efek bakterisidal pada kuman yang peka.

3. Antimikroba yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba.

Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah polimiksin, golongan polien serta berbagai antimikroba kemoterapeutik, umpamanya antiseptik *surface active agents*. Polimiksin sebagai senyawa amonium-kuatener dapat merusak membran sel setelah

bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel mikroba. Polimiksin tidak efektif terhadap kuman Gram-positif karena jumlah fosfor bakteri ini rendah. Kuman Gram-negatif yang menjadi resisten terhadap polimiksin, ternyata jumlah fosfornya menurun. Antibiotik polien bereaksi dengan struktur sterol yang terdapat pada membran sel fungi sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran tersebut. Bakteri tidak sensitif terhadap antibiotik polien, karena tidak memiliki struktur sterol pada membran selnya. Antiseptik yang mengubah tegangan permukaan (*surface active agents*), dapat merusak permeabilitas selektif dari membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain.

4. Antimikroba yang menghambat sintesis protein sel mikroba.

Obat yang termasuk kelompok ini ialah golongan aminoglikosid, makrolid, linkomisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol. Untuk kehidupannya, sel mikroba perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Penghambatan sintesis protein terjadi dengan berbagai cara.

Streptomisin berikatan dengan komponen ribosom 30S dan menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel mikroba. Antibiotik aminoglikosid lainnya yaitu gentamisin, kanamisin, dan neomisin memiliki mekanisme kerja yang sama, namun potensinya berbeda.

Eritromisin berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Akibatnya, rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru.

Linkomisin juga berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat sintesis protein.

Tetrasiklin berikatan dengan ribosom 30S dan menghalangi masuknya kompleks tRNA- asam amino pada lokasi asam amino.

Kloramfenikol berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat pengikatan asam amino baru pada rantai polipeptida oleh enzim peptidil transferase.

5. Antimikroba yang menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba.

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini ialah rifampisin, dan golongan kuinolon. Yang lainnya walaupun bersifat antimikroba, karena sifat sitotoksitasnya, pada umumnya hanya digunakan sebagai

obat antikanker; tetapi beberapa obat dalam kelompok terakhir ini dapat pula digunakan sebagai antivirus.

Rifampisin, salah satu derivat rifamisin, berikatan dengan enzim polimerase-RNA (pada sub unit) sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Golongan kuinolon menghambat enzim DNA girase pada kuman yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral sehingga bisa muat dalam sel kuman yang kecil.

Mekanisme kerja suatu antiseptika dan desinfektansia dapat dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu :

1. Penginaktifan enzim tertentu

Seperti turunan aldehida, etilen-oksida, dan halogen. Aldehida dan etilen oksida bekerja dengan mengalkilasi secara langsung gugus nukleofil, seperti gugus amino, karboksil, fenol dan tiol dari protein sel bakteri. Reaksi alkilasi tersebut menyebabkan pemblokiran sisi aktif dan perubahan konformasi enzim sehingga terjadi hambatan pertumbuhan sel bakteri.

2. Denaturasi Protein

Turunan alkohol, halogen, senyawa merkuri dan perak, turunan fenol dan senyawa amonium kuarterner. Seperti turunan fenol, senyawa ini berinteraksi dengan sel bakteri melalui adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami

peruraian, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan presipitasi, serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein sel dan membran sitoplasma mengalami lisis.

3. Mengubah permeabilitas membran sitoplasma bakteri

Cara ini model kerja dari turunan amin dan guanidin, turunan fenol dan senyawa amonium kuarterner. Dengan mengubah permeabilitas membran sitoplasma bakteri, senyawa-senyawa tersebut dapat menyebabkan bocornya konstituen sel yang essential sehingga bakteri mengalami kematian.

4. Intekalasi ke dalam DNA

Turunan trifenilmetan (zat warna) seperti akridin bekerja sebagai antibakteri dengan mengikat secara kuat asam nukleat, menghambat sintesis DNA dan menyebabkan perubahan kerangka mutasi pada sintesis protein.

5. Pembentukan khelat

Beberapa turunan fenol, seperti heksoklorofen dan oksikuinolin dapat membentuk khelat dengan ion Fe dan Cu, kemudian bentuk khelat tersebut masuk ke dalam sel bakteri. Kadar yang tinggi dari ion-ion logam di dalam sel menyebabkan gangguan fungsi enzim-enzim, sehingga mikroorganismenya mengalami kematian.

II.5 Uraian Bakteri (24,25)

II.5.1 Klasifikasi

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Enterobacteriaceae
Marga	: Vibrio
Jenis	: <i>Vibrio harveyi</i>

II.5.2 Sifat dan Morfologi

Dinding sel kaku, sel tunggal, bentuk koma atau batang terpilin, motil, flagela kutub tunggal (monotoric flagel), Gram negatif, habitat pada lingkungan akuatik, organ-organ reproduktif, saluran pencernaan, dan rongga mulut hewan (termasuk manusia), patogenetik bagi binatang (termasuk manusia). ukuran sel 1-4 μm , tidak membentuk spora, oksidase positif, katalase positif, serta proses fermentasi karbohidratnya tidak membentuk gas.

II.6 Pengujian Secara Mikrobiologi (26, 27)

Dikenal beberapa cara pemeriksaan dan pengujian secara mikrobiologis terhadap kemampuan antimikroba dari bahan-bahan kemoterapeutika seperti antibiotika. Walaupun pada umumnya pengujian dilakukan terhadap kebanyakan antibiotika, namun ada juga bahan-bahan

lain yang diduga mempunyai daya hambat atau membunuh mikroba. Secara umum dapat dilakukan dengan dua cara:

1. Metode difusi (penyerapan)

Pada metode ini kemampuan antimikroba ditentukan berdasarkan hambatan yang terjadi. Beberapa modifikasi metode ini adalah:

a. Metode difusi dengan silinder pipih

Cara ini didasarkan atas perbandingan antara luas daerah hambatan yang dibentuk larutan contoh terhadap pertumbuhan mikroba dengan daerah hambatan yang dibentuk oleh larutan pembanding. Pada cara ini digunakan plat silinder yang diletakkan pada media, kemudian larutan contoh dimasukkan ke dalamnya.

b. Metode difusi dengan mangkuk pipih

Cara ini sama dengan silinder pipih, namun perbedaannya disini menggunakan lubang yang dibuat langsung pada medium.

c. Metode difusi dengan kertas saring

Cara ini menggunakan kertas saring yang dibuat dengan bentuk dan ukuran tertentu, biasanya dengan garis tengah 0,7 – 1 cm, yang nantinya akan dicelupkan ke dalam larutan contoh dan larutan pembanding. Pengamatan dilakukan setelah masa inkubasi dengan melihat daerah hambatan yang terbentuk.

Cara difusi ini telah direkomendasikan oleh NCCLS dan *International Collaborative Study (ICL) and Regulation*, yang

dimodifikasi oleh Bauer, Kirby, Shenis, dan Turch. Keuntungan dari cara ini adalah prosedurnya sederhana (mudah dan praktis), dapat menggunakan beberapa jenis antibiotika untuk satu jenis strain patogen yang dites. Hanya saja konsentrasi obat telah ditentukan masing-masing oleh pabriknya, pada setiap kertas cakram (*paper disc*).

2. Metode dilusi (pengenceran)

Pada cara ini, yang biasa juga disebut penetapan dengan cara turbidimetri atau tabung, menggunakan pengenceran secara seri dari antimikroba dalam media broth dengan konsentrasi yang berbeda-beda, kemudian ditanami dengan bakteri uji.

Potensi antimikroba dapat diketahui dengan melihat kekeruhan yang terjadi akibat dari pertumbuhan bakteri uji pada konsentrasi tertentu, dan kekeruhan yang terjadi diukur dengan alat foto elektrik kolorimeter serta dapat diketahui konsentrasi terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji tersebut (*MIC=Minimum Inhibitory Concentration*). Kekurangan dari cara ini adalah prosedurnya lebih panjang dan jenis antibiotik yang digunakan terbatas.

II.7 Metode Pemisahan

II.7.1 Kromatografi Lapis Tipis (28, 29, 30)

Kromatografi lapis tipis adalah salah satu analisis yang digunakan untuk memisahkan senyawa secara cepat berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi. Adsorben berupa serbuk halus yang dilapiskan secara merata

dan tipis (0,1- 2 ml) di atas lempeng kaca sebagai fase diam dan pelarut pengembang sebagai fase gerak.

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal esensi dan resolusinya.

Karena adanya perbedaan daya serap adsorben terhadap senyawa, maka senyawa akan bergerak dengan kecepatan berbeda. Hal ini yang menyebabkan terjadinya pemisahan. Memilih pelarut untuk kromatografi lapis tipis dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering kita mencoba-coba saja karena waktu yang diperlukan sebentar. Sistem yang paling sederhana adalah campuran pelarut organik yang dipakai untuk memisahkan molekul yang mempunyai satu atau dua gugus fungsi.

Berikut beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak:

- a. Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif
- b. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga R_f terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
- c. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solut yang berarti juga menentukan nilai R_f . Penambahan pelarut yang

bersifat sedikit polar seperti dietil eter ke dalam pelarut non polar seperti metil benzen akan meningkatkan harga Rf secara signifikan.

- d. Solut-solut ionik dan solut-solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya, seperti campuran air dan metanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau amonia masing-masing akan meningkatkan solut-solut yang bersifat basa dan asam.

Pemisahan pada kromatografi Lapis tipis yang optimal akan diperoleh hanya jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil mungkin. Sebagaimana dalam prosedur kromatografi yang lain, jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penotolan sampel secara otomatis lebih dipilih daripada penotolan secara manual terutama jika sampel yang akan ditotolkan lebih dari 15 μ l. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak menyebar dan puncak ganda.

Bila sampel telah ditotolkan maka tahap selanjutnya adalah mengembangkan sampel tersebut dalam suatu bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhi dengan uap fase gerak. Tepi bagian bawah lempeng lapis tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan ke dalam fase gerak kurang lebih 0,5-1 cm. Tinggi fase gerak dalam bejana harus di bawah lempeng yang telah berisi totolan sampel.

Bejana kromatografi harus tertutup rapat dan sedapat mungkin volume fase gerak sedikit mungkin (akan tetapi mampu mengelusi

lempeng sampai ketinggian lempeng yang telah ditentukan). Untuk melakukan penjenahan fase gerak, biasanya bejana dilapisi dengan kertas saring. Jika fase gerak telah mencapai ujung atas kertas saring, maka dapat dikatakan bahwa fase gerak telah jenuh. Selama proses elusi, bejana kromatografi harus ditutup rapat, misalkan dengan lembar aluminium dan sebagainya.

Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk penentuannya dapat dilakukan secara kimia dan fisika. Cara kimia yang biasa digunakan adalah mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet. Fluoresensi sinar ultraviolet terutama untuk senyawa yang dapat berfluoresensi, membuat bercak akan terlihat jelas. Jika senyawa tidak dapat berfluoresensi maka bahan penjerapnya akan diberi indikator yang berfluoresensi, dengan demikian bercak akan kelihatan hitam sedangkan latar belakangnya akan kelihatan berfluoresensi. Berikut adalah cara-cara kimiawi untuk mendeteksi bercak:

- a. Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan seluruh solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna. Kadang-kadang lempeng dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan intensitas warna bercak.

- b. Mengamati lempeng di bawah lampu ultraviolet yang dipasang panjang gelombang emisi 254 nm atau 366 nm untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam.
- c. Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat lalu dipanaskan untuk mengoksidasi solut-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam sampai kecoklat-coklatan.
- d. Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam chamber tertutup
- e. Melakukan scanning pada permukaan lempeng dengan densitometer, suatu instrumen yang dapat mengukur intensitas radiasi yang direfleksikan dari permukaan lempeng ketika disinari dengan lampu UV atau lampu sinar tampak. Solut-solut yang mampu menyerap sinar akan dicatat sebagai puncak (*peak*) dalam pencatat (*recorder*)

Reagen yang digunakan sebagai penampak bercak dalam KLT dapat dibedakan menjadi 2, yaitu reagen umum (yang berlaku untuk hampir semua senyawa organik) dan reagen selektif yang hanya mendeteksi jenis atau golongan senyawa tertentu.

Nilai R_f (*Retention factor*) merupakan parameter karakteristik kromatografi lapis tipis. Nilai ini merupakan ukuran kecepatan migrasi suatu senyawa pada kromatogram. Nilai R_f ini didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak yang ditempuh senyawa dengan jarak yang ditempuh pelarut pengembang.

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut pengembang}}$$

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi nilai Rf adalah:

- a. Struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan
- b. Sifat dari penyerap (adsorben) dan derajat aktivitasnya
- c. Pelarut sebagai fase gerak dan derajat kemurniannya
- d. Kejenuhan dari uap dalam chamber
- e. Jumlah cuplikan yang digunakan.

II.7.2 KLT Bioautografi (26, 31)

Menurut Betina (1972) bioautografi adalah suatu metode pendeteksian untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisir aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Metode ini memanfaatkan pengerjaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada bioautografi ini didasarkan atas efek biologi berupa antibakteri, antiprotozoa, antitumor dan lain-lain dari substansi yang diteliti. Ciri khas dari prosedur bioautografi adalah didasarkan atas teknik difusi agar, dimana senyawa antimikrobanya dipindahkan dari lapisan KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan dengan merata bakteri uji yang peka. Dari hasil inkubasi pada suhu dan waktu tertentu akan terlihat zona hambatan di sekeliling spot dari KLT yang telah ditempelkan pada media agar. Zona hambatan ditampakkan oleh aktivitas senyawa aktif yang terdapat di dalam bahan yang diperiksa terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji.

Biautografi dapat dipertimbangkan karena paling efisien untuk mendeteksi komponen antimikroba, sebab dapat melokalisasi aktivitas meskipun dalam senyawa aktif tersebut terdapat dalam bentuk senyawa kompleks dan dapat pula diisolasi langsung dari komponen yang aktif.

Biautografi dapat dibagi atas tiga kelompok, yaitu:

1. Bioautografi Langsung

Bioautografi langsung, yaitu dimana mikroorganismenya tumbuh secara langsung di atas lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Prinsip kerja dari metode ini adalah suspensi mikroorganisme uji yang peka dalam medium cair disemprotkan pada permukaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang telah dihilangkan sisa-sisa eluen yang menempel pada lempeng kromatogram. Setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

Pengeringan Kromatogram dilakukan secara hati-hati dengan menggunakan *hair dryer* untuk menghiangkan sisa eluen. Senyawa dalam lempeng kromatogram dideteksi dengan menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Setelah diketahui letak dan jumlah senyawa aktif yang terpisah atau terisolasi, dengan timbulnya noda (spot) pada lempeng KLT, selanjutnya disemprotkan suspensi bakteri uji sebanyak 5-6 ml di atas permukaan lempeng KLT tadi secara merata. Besarnya lempeng KLT yang sering digunakan adalah 20x20 cm dan untuk meratakan suspensi bakteri yang telah disemprotkan dapat menggunakan alat putar atau *roller* yang dilapisi

dengan kertas kromatogram (Whatman, Clijton). Lempeng KLT diinkubasi semalam (1x24 jam) dalam *box* plastik dan dilapisi dengan kertas, kemudian disemprot dengan 5 ml larutan TTC (20 mg/ml) atau INT (5 mg/ml), INTB (5 mg/ml) serta MTT (2,5 mg/ml) dan selanjutnya diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37°C.

2. Bioautografi kontak

Bioautografi kontak, dimana senyawa antimikroba dipindahkan dari lempeng KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan bakteri uji yang peka secara merata dan melakukan kontak langsung.

Metode ini didasarkan atas difusi dari senyawa yang telah dipisahkan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) atau kromatografi kertas. Lempeng kromatografi tersebut ditempatkan di atas permukaan Nutrien Agar yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme yang sensitif terhadap senyawa antimikroba yang dianalisis. Setelah 15-30 menit, lempeng kromatografi tersebut dipindahkan dari permukaan medium. Senyawa antimikroba yang telah berdifusi dari lempeng kromatogram ke dalam media agar akan menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi pada waktu dan suhu yang tepat sampai noda yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji tampak pada permukaan membentuk zona yang jernih. Untuk memperjelas digunakan indikator aktivitas dehidrogenase.

3. Bioautografi pencelupan

Bioautografi pencelupan, dimana medium agar telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri dituang di atas lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada prakteknya metode ini dilakukan sebagai berikut yaitu bahwa lempeng kromatografi yang telah dielusi diletakkan dalam cawan petri, sehingga permukaan tertutup oleh medium agar yang berfungsi sebagai *base layer*. Setelah *base layer*nya memadat, dituangkan medium yang telah disuspensikan mikroba uji yang berfungsi sebagai *seed layer*. Kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai.

Beberapa modifikasi metode KLT Bioautografi telah ditemukan. Nicolous dkk. menuangkan medium agar berisi 2,3,5 trifeniltetrazoliumklorida (TTC) dan ditanami dengan organism yang diuji di atas kromatogram. Sedangkan kline dan Goalb menyemprotkan medium agar secukupnya pada lempeng KLT dan segera dipadatkan. Medium agar yang lain didinginkan pada suhu 48⁰C dan diinokulasi dengan organism yang diuji, dituangkan langsung pada permukaan lempeng yang telah disiapkan. Zona inhibisi diidentifikasi setelah diinkubasi, dengan melihat langsung pada lempeng KLT yang tidak tembus cahaya. Bickel dkk, menindihkan lempeng kromatografi pada medium agar pembedahan.

Beberapa prosedur yang dikemukakan di atas masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Menurut Horman dan Fuchs,

3. Bioautografi pencelupan

Bioautografi pencelupan, dimana medium agar telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri dituang di atas lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada prakteknya metode ini dilakukan sebagai berikut yaitu bahwa lempeng kromatografi yang telah dielusi diletakkan dalam cawan petri, sehingga permukaan tertutup oleh medium agar yang berfungsi sebagai *base layer*. Setelah *base layer*nya memadat, dituangkan medium yang telah disuspensikan mikroba uji yang berfungsi sebagai *seed layer*. Kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai.

Beberapa modifikasi metode KLT Bioautografi telah ditemukan. Nicolous dkk. menuangkan medium agar berisi 2,3,5 trifeniltetrazoliumklorida (TTC) dan ditanami dengan organism yang diuji di atas kromatogram. Sedangkan Kline dan Goalb menyemprotkan medium agar secukupnya pada lempeng KLT dan segera dipadatkan. Medium agar yang lain didinginkan pada suhu 48⁰C dan diinokulasi dengan organism yang diuji, dituangkan langsung pada permukaan lempeng yang telah disiapkan. Zona inhibisi diidentifikasi setelah diinkubasi, dengan melihat langsung pada lempeng KLT yang tidak tembus cahaya. Bickel dkk, menindihkan lempeng kromatografi pada medium agar pembedahan.

Beberapa prosedur yang dikemukakan di atas masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Menurut Horman dan Fuchs,

bioautografi kontak merupakan tipe yang paling sering digunakan. Masalah perbedaan difusi dari senyawa-senyawa dari kromatogram ke plat agar dipermudah dengan deteksi bioautografi secara langsung, tetapi metode ini membutuhkan peralatan mikrobiologi yang cukup rumit. Sedangkan Land dan Lyon, menyatakan bioautografi secara langsung, untuk aktivitas antibakteri sangat sensitif dan melokalisir senyawa-senyawa yang aktif, tetapi mempunyai kekurangan karena keterbatasan mikroorganisme yang dapat tumbuh secara langsung di atas lapisan kromatografi. Ketersebaran bakteri pada lempeng dan memungkinkan terjadi kontaminasi. Sedang metode bioautografi pencelupan merupakan metode yang paling tepat sebab tidak dipengaruhi oleh kemungkinan adanya kontaminasi.

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Penyiapan Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat soxhletasi, alat refluks, labu ukur 10 ml (*Pirex*), inkubator (Mettler), lampu spiritus, Erlenmeyer (*Pirex*), corong pisah, timbangan analitik (*Sartorius*), eksikator, oven (Mettler), *Laminar air flow*, autoklaf (Mettler), cawan petri, *paper disc* (*Oxoid*), rotavapor (*Buchii*), pipet mikron (*Socorex*), timbangan kasar (*O'haus*), chamber, jangka sorong.

Bahan-bahan yang digunakan adalah akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.), air suling, metanol, n-butanol, n-heksan, dimetil sulfoksida (DMSO) (*E.Merck*®), lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ (*E.Merck*®), biakan murni *Vibrio harveyi* (koleksi Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Unhas), kapas, aluminium foil, medium Muller Hinton agar (MHA), medium triptycasein soy agar (TSA), medium nutrien broth (NB), natrium klorida 0,9% (*Otsuka*).

III.2 Pengambilan dan Penyiapan Sampel Penelitian

III.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan berupa akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) diperoleh dari desa Tongke-tongke, Kecamatan Sinjai Timur, Kabupaten Sinjai, Propinsi Sulawesi Selatan.

III.2.2 Pengolahan Sampel

Sampel akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) yang telah dikumpulkan, dibersihkan dan dicuci dengan air. Setelah itu, sampel diangin-anginkan tanpa sinar matahari langsung, kemudian dirajang dan dihaluskan dengan derajat halus 4/18, selanjutnya sampel siap diekstraksi (19,32).

III.2.3 Ekstraksi Sampel

Sampel akar bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) yang telah diolah, diekstraksi dengan cara refluks menggunakan cairan penyari metanol. Sebanyak 100 gram sampel dimasukkan ke dalam labu alas bulat lalu ditambahkan metanol hingga seluruh bagian sampel terendam (± 500 mL). Labu alas bulat dirangkai dengan alat refluks dan dipanaskan dengan bantuan penangas air hingga penyari mendidih (suhu $\pm 70^{\circ}\text{C}$). Ekstraksi dilakukan selama 4 jam. Ekstrak metanol cair yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotavapor kemudian diuapkan hingga diperoleh ekstrak metanol kental.

Sampel buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) yang telah diolah diekstraksi dengan cara soxhletasi menggunakan cairan penyari metanol. Sebanyak 70 gram sampel dimasukkan dalam pipa klonsong, kemudian dibasahkan dengan penyari. Labu alas bulat diisi dengan 500 ml penyari. Labu dipanaskan dengan bantuan penangas air hingga penyari mendidih (suhu $\pm 70^{\circ}\text{C}$). Ekstraksi dilakukan hingga 25 siklus, Ekstrak metanol cair

yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotavapor kemudian diuapkan hingga diperoleh ekstrak metanol kental (19).

III.2.4 Partisi Ekstrak Metanol

Kedua ekstrak metanol dipartisi dengan cara ekstraksi cair-cair. Pertama-tama ekstrak metanol dilarutkan dengan air kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut n-heksan kemudian digojog, lalu didiamkan hingga lapisan air dan n-heksan terpisah. Kedua lapisan pelarut dipisahkan sehingga diperoleh ekstrak larut n-heksan dan ekstrak larut air. Ekstrak larut n-heksan diuapkan pelarutnya hingga diperoleh ekstrak kering.

Ekstrak air dimasukkan kembali ke corong pisah dan ditambah pelarut n-butanol yang telah dijenuhkan dengan air kemudian digojog, lalu didiamkan hingga lapisan air dan n-butanol terpisah. Kedua lapisan pelarut dipisahkan sehingga diperoleh ekstrak larut n-butanol dan ekstrak larut air. Ekstrak larut n-butanol dan ekstrak larut air diuapkan pelarutnya hingga diperoleh ekstrak kering.

III.2.5 Pembuatan Larutan Ekstrak n-Heksan, Ekstrak n-Butanol dan Ekstrak Air

Dibuat larutan masing-masing ekstrak dengan konsentrasi 20% b/v, dengan menimbang masing-masing 2 gram ekstrak n-heksan, ekstrak n-butanol dan ekstrak air akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.),

kemudian dilarutkan dengan DMSO dan dicukupkan volumenya hingga 10 ml.

III.3 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dicuci dengan detergen, kemudian dibilas dengan air suling. Alat-alat gelas disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Alat-alat plastik (tidak tahan terhadap pemanasan tinggi) dan alat gelas berskala disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 2 atm. Alat-alat logam disterilkan dengan pemanasan langsung pada lampu spiritus hingga memijar (33).

III.4 Penyiapan Bahan Penelitian

III.4.1 Pembuatan Medium

Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan medium ditimbang dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, kemudian dilarutkan dengan air suling hingga 800 ml, lalu dicek dan ditetapkan pH dengan indikator universal pada pH 7,0, lalu dicukupkan volumenya dengan air suling hingga 1000 ml. Setelah itu, disterilkan pada autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit (34).

III.4.2 Penyiapan Bakteri

III.4.2.1 Peremajaan Bakteri

Vibrio harveyi yang berasal dari biakan murni diambil satu ose lalu diinokulasikan dengan cara digoreskan dengan medium TSA miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

III.4.2.2 Pembuatan Suspensi Bakteri

Vibrio harveyi yang telah diremajakan disuspensikkan dengan larutan NaCl 0,9% steril kemudian diukur transmittannya pada 25% dengan spektrofotometer, sebagai blanko digunakan larutan NaCl 0,9% steril.

III.5 Pengujian Daya Hambat

Suspensi *Vibrio harveyi* sebanyak 0,2 ml dimasukkan kedalam cawan petri kemudian medium MHA steril pada suhu sekitar 40-45°C dituang secara aseptis ke dalam cawan petri sebanyak 15 ml dan dihomogenkan, kemudian dibiarkan memadat. *Paper disc* ditetesi 20 µl larutan masing-masing ekstrak dan larutan DMSO sebagai control negatif lalu diletakkan di atas medium, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lalu diukur diameter daerah hambatan yang terbentuk.

III.6 Penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM)

Medium NB steril dituang secara aseptis ke dalam 8 buah tabung reaksi steril masing-masing sebanyak 5 ml dan ditambahkan ekstrak dengan konsentrasi 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,62%, 0,31%, dan

III.4.2 Penyiapan Bakteri

III.4.2.1 Peremajaan Bakteri

Vibrio harveyi yang berasal dari biakan murni diambil satu ose lalu diinokulasikan dengan cara digoreskan dengan medium TSA miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

III.4.2.2 Pembuatan Suspensi Bakteri

Vibrio harveyi yang telah diremajakan disuspensikkan dengan larutan NaCl 0,9% steril kemudian diukur transmittannya pada 25% dengan spektrofotometer, sebagai blanko digunakan larutan NaCl 0,9% steril.

III.5 Pengujian Daya Hambat

Suspensi *Vibrio harveyi* sebanyak 0,2 ml dimasukkan kedalam cawan petri kemudian medium MHA steril pada suhu sekitar 40-45°C dituang secara aseptis ke dalam cawan petri sebanyak 15 ml dan dihomogenkan, kemudian dibiarkan memadat. *Paper disc* ditetesi 20 µl larutan masing-masing ekstrak dan larutan DMSO sebagai control negatif lalu diletakkan di atas medium, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lalu diukur diameter daerah hambatan yang terbentuk.

III.6 Penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM)

Medium NB steril dituang secara aseptis ke dalam 8 buah tabung reaksi steril masing-masing sebanyak 5 ml dan ditambahkan ekstrak dengan konsentrasi 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,62%, 0,31%, dan

0,15% sebanyak 5 ml ke dalam tabung kesatu sampai tabung kedelapan. Ditambahkan 0,2 ml suspensi *Vibrio harveyi* ke dalam masing-masing tabung, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati kekeruhan yang terbentuk untuk penentuan nilai KHM-nya (lampiran 3).

III.7 Pemisahan Senyawa secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak sampel yang memiliki zona hambatan kemudian dipisahkan secara KLT, dengan cara lempeng KLT diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 110°C selama 30 menit sebelum digunakan. Sampel tersebut ditotolkan pada KLT ukuran 8 x 3 cm, kemudian dielusi di dalam chamber yang sudah jenuh dengan cairan pengelusi hingga batas 1 cm dari tepi atas lempeng. Lempeng dikeluarkan dari chamber dan dikeringkan dengan *hair dryer* hingga cairan pengelusi menguap. Selanjutnya diamati di bawah sinar UV 254 dan 366 dan dihitung nilai Rf nodanya.

III.8 Pengujian KLT Bioautografi

Medium MHA sebanyak 15 ml yang telah dicampur dengan 0,2 ml suspensi *Vibrio harveyi* dituang ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Setelah media memadat, lempeng KLT yang telah dielusi diletakkan di atas permukaan media agar. Setelah 30 menit lempeng tersebut diangkat dan dipindahkan, kemudian medium yang telah menempati lempeng KLT diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, diamati daerah hambatan (zona bening) yang terbentuk.

III.9 Identifikasi Senyawa Kimia

Noda yang membentuk daerah hambatan pada lempeng KLT disemprot dengan pereaksi semprot untuk menentukan jenis senyawa yang menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi*

III.10 Pengumpulan dan Analisis Data

Data dikumpulkan dengan mengukur diameter daerah hambatan, menentukan nilai KHM, Rf noda dan jenis senyawa yang menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi*.

III.11 Pengambilan Kesimpulan

Kesimpulan diambil berdasarkan analisis data dan pembahasan hasil.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

1. Hasil ekstraksi 600 gram akar dan 420 gram buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) dengan cairan penyari metanol diperoleh 73,08 gram ekstrak metanol akar (rendamen 12,18%) dan 50,90 gram ekstrak metanol buah (rendamen 12,12%).
2. Hasil partisi 30 gram ekstrak metanol diperoleh 5,03 gram ekstrak n-heksan, 13,12 gram ekstrak n-butanol, dan 6,68 gram ekstrak air pada partisi ekstrak metanol akar, sedangkan pada buah diperoleh 4,55 gram ekstrak n-heksan, 7,58 gram ekstrak n-butanol, dan 10,71 gram ekstrak air.
3. Hasil pengukuran diameter daerah hambatan ekstrak metanol (ekstrak awal) akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) diperoleh rata-rata diameter daerah hambatan adalah 10,4 mm pada ekstrak metanol akar dan 10,5 mm pada ekstrak metanol buah (lihat tabel 1).
4. Hasil pengukuran diameter daerah hambatan ekstrak n-heksan, ekstrak n-butanol dan ekstrak air dari akar bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) diperoleh rata-rata yaitu berturut-turut 7,4 mm, 15,5 mm, dan 8,7 mm. Sedangkan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) 6,9 mm, 15,4 mm, dan 8,4 mm (lihat tabel 2).

5. Hasil penentuan nilai KHM ekstrak n-butanol akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) diperoleh nilai KHM untuk keduanya adalah 0,15% (lihat tabel 3 dan gambar 3).
6. Hasil pemisahan komponen kimia ekstrak n-butanol akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) menggunakan KLT dengan eluen n-butanol:asam asetat:air (4:1:5) diperoleh jumlah noda yang sama, yaitu pada sinar UV 254 nm diperoleh 1 noda dengan Rf 0,13 pada akar dan 0,11 pada buah, serta pada sinar UV 366 nm terdapat 4 noda dengan Rf 0,49, 0,72, 0,84, dan 0,94 pada akar dan 0,47, 0,70, 0,80 dan 0,98 pada buah (lihat gambar 4 dan 5).
7. Hasil pengujian KLT bioautografi diperoleh 1 noda yang menghambat yaitu noda dengan Rf 0,13 pada akar dan 0,11 pada buah (lihat gambar 6).
8. Hasil identifikasi menunjukkan senyawa tersebut termasuk senyawa fenolik.

IV.2 Pembahasan

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.). Akar bakau berupa akar tunjang yaitu akar yang keluar dari batang dan tumbuh ke arah tanah, akar tersebut merupakan bentuk adaptasi bakau untuk dapat tumbuh pada lingkungan yang berlumpur dengan kadar oksigen rendah. Buah bakau merupakan buah hipokotil (berkecambah) yang tumbuh sejak buah masih berada di pohonnya (13).

Akar bakau diekstraksi dengan metode refluks karena memiliki tekstur yang keras sehingga untuk proses ekstraksi yang maksimal dibutuhkan bantuan pemanasan (19), sedangkan buah yang memiliki tekstur lebih lunak diekstraksi dengan metode soxhletasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi*, ini ditandai dengan terbentuknya daerah bening di sekitar *paper disc*. Nilai rata-rata diameter daya hambat diantara keduanya relatif sama yaitu 10,4 mm pada akar dan 10,5 mm pada buah. Terbentuknya daerah hambatan di sekitar *paper disc* menunjukkan bahwa di dalam ekstrak akar dan buah bakau terdapat senyawa yang bersifat sebagai antibakteri terhadap *Vibrio harveyi*. Bahan aktif yang bersifat sebagai antibakteri dapat mengganggu proses fisiologis dan menghalangi terbentuknya komponen sel bakteri seperti sintesis dinding sel, membran sitoplasma, sintesis protein dan sintesis asam nukleat (35).

Partisi dilakukan terhadap ekstrak metanol akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) dilakukan untuk membandingkan daya hambat ekstrak berdasarkan kelarutannya pada cairan penyari dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Hasil partisi menunjukkan bahwa senyawa pada bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) banyak larut pada penyari yang bersifat polar. Bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) mengandung tannin, saponin, alkaloid, dan flavonoid yang bersifat polar (17).

Hasil uji daya hambat ekstrak hasil partisi dengan konsentrasi 20% menunjukkan bahwa ekstrak n-butanol akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) memiliki rata-rata diameter daerah hambat yang paling besar, kemudian ekstrak air, dan ekstrak n-heksan memiliki rata-rata daerah hambatan paling kecil. Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa yang paling aktif menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi* bersifat polar. Bahan aktif yang memiliki daya larut yang lebih tinggi pada pelarut polar, akan lebih mudah menembus lapisan fosfolipid membran sel sehingga lebih cepat mengganggu fungsi fisiologis bakteri dan pada akhirnya sel akan mengalami kematian (36).

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terkecil ekstrak n-butanol akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) yang masih dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi* dengan menggunakan metode dilusi pada medium Nutrien Broth (NB). Konsentrasi terendah dari tabung yang tidak tampak keruh menunjukkan penghambatan pertumbuhan bakteri, dan konsentrasi ini disebut Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) (37). Hasil uji KHM menunjukkan bahwa nilai KHM kedua ekstrak tersebut adalah 0,15%. Suksesnya pengobatan yang menggunakan antimikroba tergantung aktivitasnya mencapai efek penghambatan atau pemusnahan pada tempat infeksi tanpa menyebabkan efek toksik yang bermakna terhadap hospes. Kadar antimikroba minimal yang dicapai di tempat infeksi

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi* dengan kekuatan yang relatif sama.
2. Ekstrak n-butanol akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) memiliki daya hambat terhadap *Vibrio harveyi* yang lebih kuat dibanding ekstrak n-heksan dan ekstrak air.
3. Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak n-butanol akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) adalah 0,15%.
4. Komponen kimia pada akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) yang bersifat sebagai antibakteri merupakan senyawa fenolik.

V.2 Saran

Perlu dilakukan isolasi senyawa kimia yang bersifat sebagai antibakteri pada akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.).

DAFTAR PUSTAKA

1. Trubus. *Umbu-umbi berkhasiat Obat*. Trubus No 302 th XXVI. hal. 1-15
2. Spalding MD, C Ravilious, EP Green. *World Atlas of Coral Reefs*. University of California Press. Berkeley. USA. 2001
3. Bandaranayake WM. *Bioactivities, Bioactive Compounds and Chemical Constituents of Mangrove Plants*. AIMS Research. 2002.
4. Mastaller M. *Mangroves: The Forgotten Forest Between Land and Sea*. Tropical Press. 1997. hal. 28-30, 34-35,97
5. Rowland BM. *Encyclopedia of Medicine: Vibriosis*. HCl[serial on the internet]. 1999 [dikutip 1 oktober 2009]. Available from: http://findarticles.com/p/articles/mi_g2601/is_0014/ai_2601001453/
6. Muliani, Suwanto, A., Hala, Y. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asal Laut Sulawesi untuk Biokontrol Penyakit Vibriosis*. Jurnal Mikrobiologi Indonesia Vol (10) 1. 2003. Hal. 6-11.
7. Arifin Z dkk. Penerapan Best Manajement Practices (BMP) pada Budidaya Udang Windu (*Panaeus monodon* Fabricius) Intensif. Departemen Kelautan dan Perikanan Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau. Jepara 2007. Hal. li
8. Agung MUK. *Penelusuran Efektifitas Beberapa Bahan Alam Sebagai Kandidat Antibakteri dalam Mengatasi Penyakit Vibriosis pada Udang Windu*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Padjadjaran. Jatinangor. 2007. Hal. 17-23
9. Suryati, E., A Parenrengi, Rosmiati, T Ahmad. Hydrozoan *Lytocarpus philippinus* Bioactive for Bactericide. Proceeding, UNESCO Sub-Regional Seminar on the Chemistry of Natural Products. Ujung Pandang. 1997
10. Yayasan Keanekaragaman Hayati Sulawesi. Hasil Identifikasi/determinasi Tumbuhan. Makassar. 12 Nopember 2009.
11. Tjitrosoepomo, G. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 1998.

12. Noor YR, M. Khazali, INN Suryadiputra. *Panduan Pengenalan Mangrove di Indonesia*. PKAWI-IP. Bogor. 1999.
13. Duke NC. *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*. The University of Queensland, St Lucia. 2006. hal. 15,16. Available as PDF file
14. Tomlinson, PB. *The Botany of Mangroves*. Cambridge University Press. USA. 1986. Hal. 419. Available as PDF file.
15. Purnobasuki H. *Potensi Mangrove Sebagai Tanaman Obat*. Biota IX (2). 2004. Hal. 125.
16. Bandaranayake, W.M. *Traditional and Medical Uses of Mangroves. Mangroves and Salt Marshes* 2.1998. Hal. 133-148.
17. Correll D.S., B.G.Schubert, H.S. Gentry, W.D. Hawley. *The Search for Plant Precursors of Cortisone*. *Economic Botany* 52. 1995. Hal. 307-375.
18. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Farmakope Indonesia*. Edisi III. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1979. hal. 9.
19. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1986. Hal. 2,7, 10, 32.
20. Tobo F, *Buku Pegangan Laboratorium Fitokimia I Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi Unhas, Makassar*, 2001, Hal.20-21.
21. Division of Environmental Health. *Office of Shellfish and Water Protection: Vibriosis*. Washington State Department of Health. Washington. 2004. Available as HTML file
22. Setiabudi R. *Farmakologi dan Terapi: Pengantar Antimikroba*. edisi 5. Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Jakarta. 2007. Hal.588
23. Djide N, Sartini, *Mikrobiologi Farmasi Dasar*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Unhas. Makassar. 2006. Hal. 242-271

12. Noor YR, M. Khazali, INN Suryadiputra. *Panduan Pengenalan Mangrove di Indonesia*. PKAWI-IP. Bogor. 1999.
13. Duke NC. *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*. The University of Queensland. St Lucia. 2006. hal. 15,16. Available as PDF file
14. Tomlinson, PB. *The Botany of Mangroves*. Cambridge University Press. USA. 1986. Hal. 419. Available as PDF file.
15. Purnobasuki H. *Potensi Mangrove Sebagai Tanaman Obat*. Biota IX (2). 2004. Hal. 125.
16. Bandaranayake, W.M. *Traditional and Medical Uses of Mangroves. Mangroves and Salt Marshes* 2.1998. Hal. 133-148.
17. Correll D.S., B.G.Schubert, H.S. Gentry, W.D. Hawley. *The Search for Plant Precursors of Cortisone*. *Economic Botany* 52. 1995. Hal. 307-375.
18. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Farmakope Indonesia*. Edisi III. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1979. hal. 9.
19. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1986. Hal. 2,7, 10, 32.
20. Tobo F, *Buku Pegangan Laboratorium Fitokimia I Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi Unhas, Makassar*, 2001, Hal.20-21.
21. Division of Environmental Health. *Office of Shellfish and Water Protection: Vibriosis*. Washington State Department of Health. Washington. 2004. Available as HTML file
22. Setiabudi R. *Farmakologi dan Terapi: Pengantar Antimikroba*. edisi 5. Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Jakarta. 2007. Hal.588
23. Djide N, Sartini, *Mikrobiologi Farmasi Dasar*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Unhas. Makassar. 2006. Hal. 242-271

12. Noor YR, M. Khazali, INN Suryadiputra. *Panduan Pengenalan Mangrove di Indonesia*. PKAWI-IP. Bogor. 1999.
13. Duke NC. *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*. The University of Queensland. St Lucia. 2006. hal. 15,16. Available as PDF file
14. Tomlinson, PB. *The Botany of Mangroves*. Cambridge University Press. USA. 1986. Hal. 419. Available as PDF file.
15. Purnobasuki H. *Potensi Mangrove Sebagai Tanaman Obat*. Biota IX (2). 2004. Hal. 125.
16. Bandaranayake, W.M. *Traditional and Medical Uses of Mangroves. Mangroves and Salt Marshes* 2.1998. Hal. 133-148.
17. Correll D.S., B.G.Schubert, H.S. Gentry, W.D. Hawley. *The Search for Plant Precursors of Cortisone*. *Economic Botany* 52. 1995. Hal. 307-375.
18. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Farmakope Indonesia*. Edisi III. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1979. hal. 9.
19. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1986. Hal. 2,7, 10, 32.
20. Tobo F, *Buku Pegangan Laboratorium Fitokimia I Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi Unhas, Makassar, 2001, Hal.20-21.*
21. Division of Environmental Health. *Office of Shellfish and Water Protection: Vibriosis*. Washington State Department of Health. Washington. 2004. Available as HTML file
22. Setiabudi R. *Farmakologi dan Terapi: Pengantar Antimikroba*. edisi 5. Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Jakarta. 2007. Hal.588
23. Djide N, Sartini, *Mikrobiologi Farmasi Dasar*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Unhas. Makassar. 2006. Hal. 242-271

24. Buchanan RE, NE Gibbons. *Bergey's Manual of Determinatif Bacteriology*. The Williams and Walkins Company, Baltimore, USA. Hal. 293-295.
25. Pelczar MJ, ECS Chan. Penerjemah: Ratna Siri Hadioetomo dkk. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 2007. hal. 166
26. Djide N, Sartini, Kadir S. *Analisi Mikrobiologi Farmasi*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Unhas. Makassar. 2009. Hal. 258-288, 299-502.
27. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. Hal. 891-899.
28. Deinstrop EH. *Applied Thin Layer Chromatography*. Translated by RG Leach. Wiley VCH. Eckental, Germany. 2007. Hal. 1-5.
29. Ganjar IG, A Rohman. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta. 2008. Hal. 46-50, 353-364
30. Gritter RJ, JM Bobbit. *Pengantar Kromatografi*. Terbitan kedua. Institut Teknologi Bandung. Bandung. Hal. 1991. 8, 99-101, 108-109, 115.
31. Betina V. *Pharmaceutical Application of Thin Layer and Paper Chromatography*. Amsterdam. 1972. hal. 503-507.
32. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Materia Medika Indonesia*. Jilid IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1989. hal. xviii, 95
33. Hadioetomo RS. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. PT Gramedia. Jakarta. 1990. hal. 56-57.
34. Difco. *Culture Media Handbook*. E. Merck Darmastand. Federal Republic of Germany. 1988. hal. 45.
35. Soebandrio WK. *Kemoterapi Antimikroba*. FMIPA Universitas Indonesia. 1995.
36. Knobloch K, A. Pauli, B. Iberl, H. Weigland dan N. Wei. *Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components*. J. Essential Oil Res. 1989.

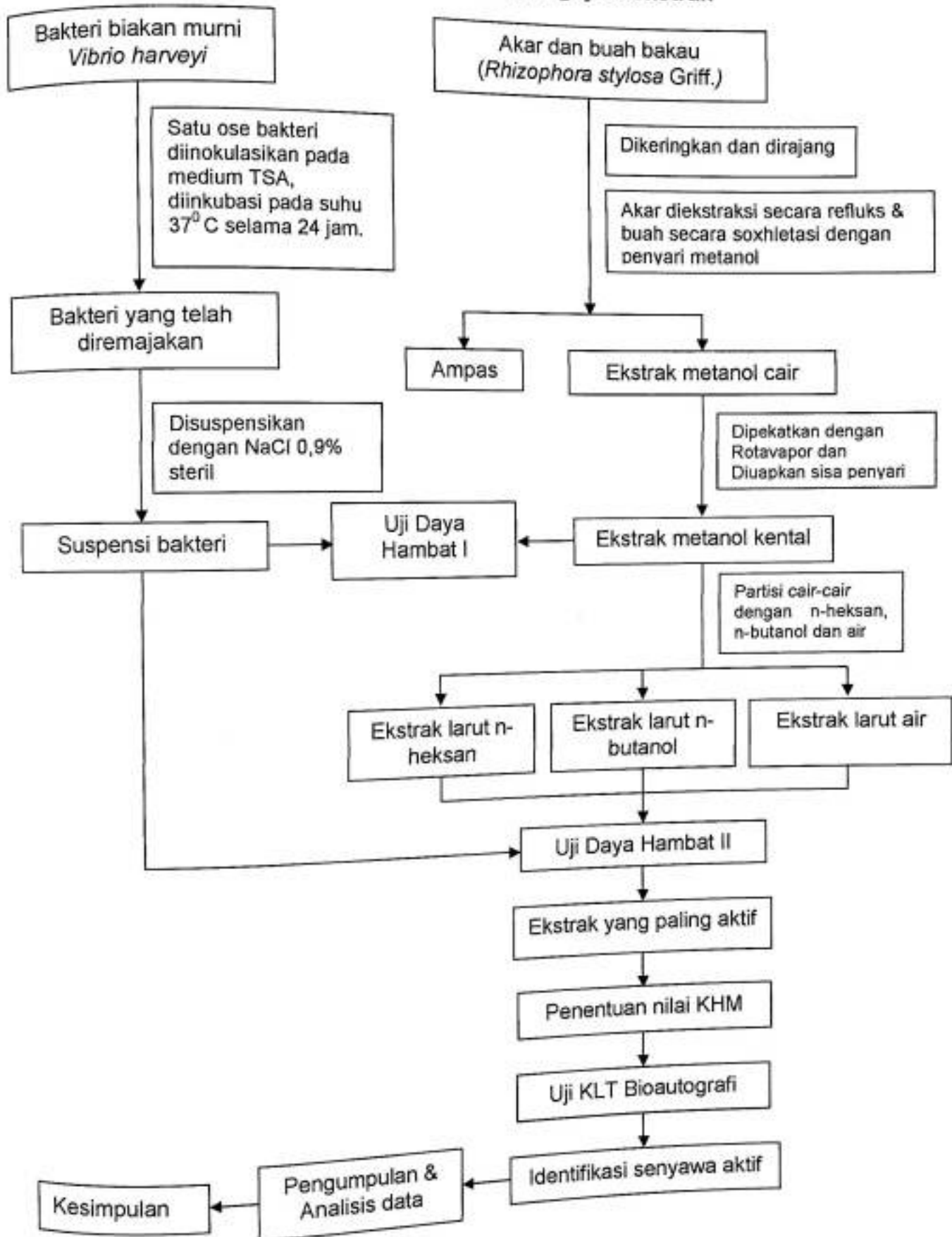
24. Buchanan RE, NE Gibbons. *Bergey's Manual of Determinatif Bacteriology*. The Williams and Walkins Company. Baltimore, USA. Hal. 293-295.
25. Pelczar MJ, ECS Chan. Penerjemah: Ratna Siri Hadioetomo dkk. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 2007. hal. 166
26. Djide N, Sartini, Kadir S. *Analisi Mikrobiologi Farmasi*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Unhas. Makassar. 2009. Hal. 258-288, 299-502.
27. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. Hal. 891-899.
28. Deinstrop EH. *Applied Thin Layer Chromatography*. Translated by RG Leach. Wiley VCH. Eckental, Germany. 2007. Hal. 1-5.
29. Ganjar IG, A Rohman. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta. 2008. Hal. 46-50, 353-364
30. Gritter RJ, JM Bobbit. *Pengantar Kromatografi*. Terbitan kedua. Institut Teknologi Bandung. Bandung. Hal. 1991. 8, 99-101, 108-109, 115.
31. Betina V. *Pharmaceutical Application of Thin Layer and Paper Chromatography*. Amsterdam. 1972. hal. 503-507.
32. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Materia Medika Indonesia*. Jilid IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1989. hal. xviii, 95
33. Hadioetomo RS. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. PT Gramedia. Jakarta. 1990. hal. 56-57.
34. Difco. *Culture Media Handbook*. E. Merck Darmastand. Federal Republic of Germany. 1988. hal. 45.
35. Soebandrio WK. *Kemoterapi Antimikroba*. FMIPA Universitas Indonesia. 1995.
36. Knobloch K, A. Pauli, B. Iberl, H. Weigland dan N. Wei. *Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components*. J. Essential Oil Res. 1989.

24. Buchanan RE, NE Gibbons. *Bergey's Manual of Determinatif Bacteriology*. The Williams and Walkins Company. Baltimore, USA. Hal. 293-295.
25. Pelczar MJ, ECS Chan. Penerjemah: Ratna Siri Hadioetomo dkk. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 2007. hal. 166
26. Djide N, Sartini, Kadir S. *Analisi Mikrobiologi Farmasi*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Unhas. Makassar. 2009. Hal. 258-288, 299-502.
27. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. Hal. 891-899.
28. Deinstrop EH. *Applied Thin Layer Chromatography*. Translated by RG Leach. Wiley VCH. Eckental, Germany. 2007. Hal. 1-5.
29. Ganjar IG, A Rohman. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta. 2008. Hal. 46-50, 353-364
30. Gritter RJ, JM Bobbit. *Pengantar Kromatografi*. Terbitan kedua. Institut Teknologi Bandung. Bandung. Hal. 1991. 8, 99-101, 108-109, 115.
31. Betina V. *Pharmaceutical Application of Thin Layer and Paper Chromatography*. Amsterdam. 1972. hal. 503-507.
32. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Materia Medika Indonesia*. Jilid IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1989. hal. xviii, 95
33. Hadioetomo RS. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. PT Gramedia. Jakarta. 1990. hal. 56-57.
34. Difco. *Culture Media Handbook*. E. Merck Darmastand. Federal Republic of Germany. 1988. hal. 45.
35. Soebandrio WK. *Kemoterapi Antimikroba*. FMIPA Universitas Indonesia. 1995.
36. Knobloch K, A. Pauli, B. Iberl, H. Weigland dan N. Wei. *Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components*. J. Essential Oil Res. 1989.

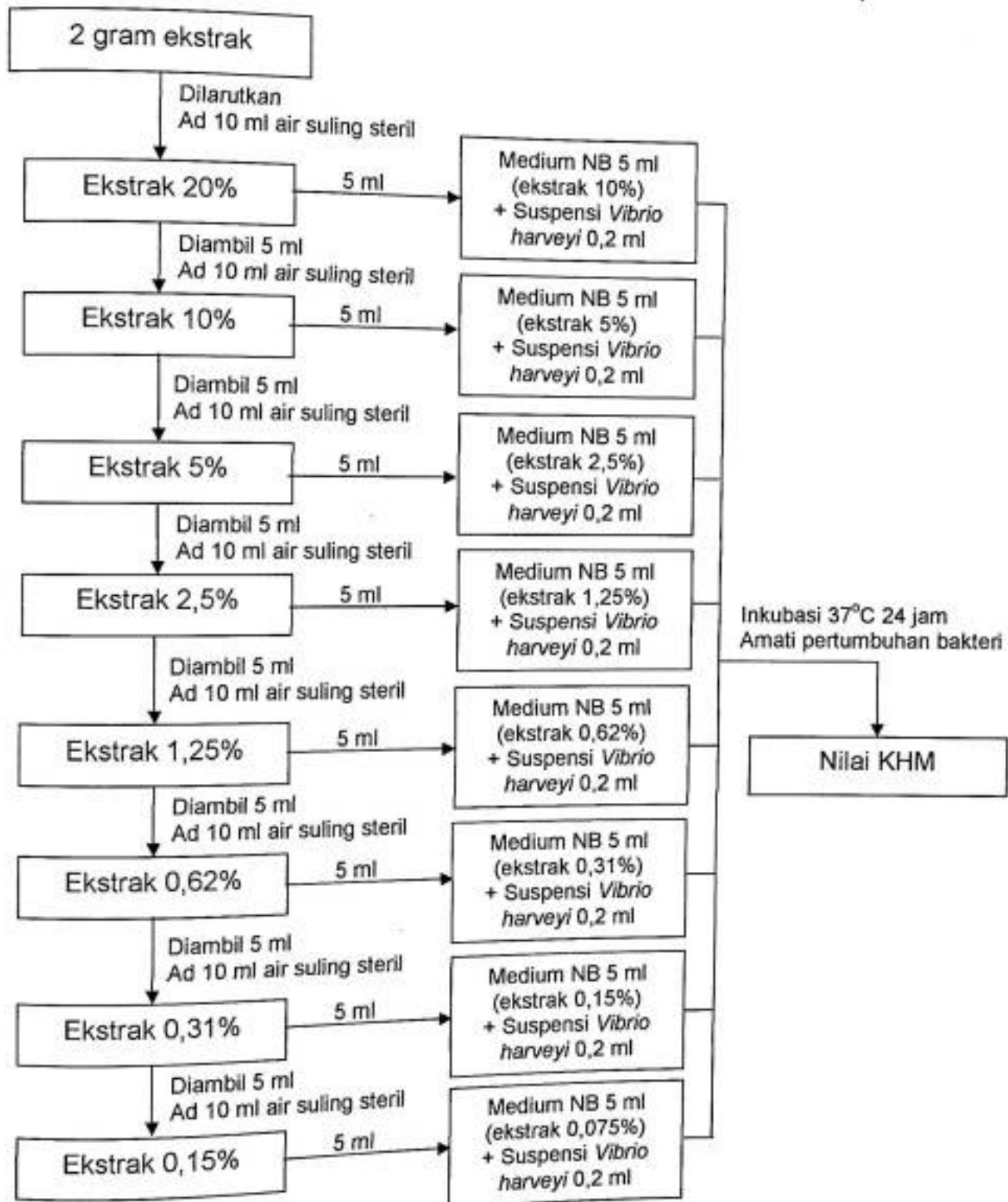
24. Buchanan RE, NE Gibbons. *Bergey's Manual of Determinatif Bacteriology*. The Williams and Walkins Company. Baltimore, USA. Hal. 293-295.
25. Pelczar MJ, ECS Chan. Penerjemah: Ratna Siri Hadioetomo dkk. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 2007. hal. 166
26. Djide N, Sartini, Kadir S. *Analisi Mikrobiologi Farmasi*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Unhas. Makassar. 2009. Hal. 258-288, 299-502.
27. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. Hal. 891-899.
28. Deinstrop EH. *Applied Thin Layer Chromatography*. Translated by RG Leach. Wiley VCH. Eckental, Germany. 2007. Hal. 1-5.
29. Ganjar IG, A Rohman. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta. 2008. Hal. 46-50, 353-364
30. Gritter RJ, JM Bobbit. *Pengantar Kromatografi*. Terbitan kedua. Institut Teknologi Bandung. Bandung. Hal. 1991. 8, 99-101, 108-109, 115.
31. Betina V. *Pharmaceutical Application of Thin Layer and Paper Chromatography*. Amsterdam. 1972. hal. 503-507.
32. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Materia Medika Indonesia*. Jilid IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1989. hal. xviii, 95
33. Hadioetomo RS. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. PT Gramedia. Jakarta. 1990. hal. 56-57.
34. Difco. *Culture Media Handbook*. E. Merck Darmastand. Federal Republic of Germany. 1988. hal. 45.
35. Soebandrio WK. *Kemoterapi Antimikroba*. FMIPA Universitas Indonesia. 1995.
36. Knobloch K, A. Pauli, B. Iberl, H. Weigland dan N. Wei. *Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components*. J. Essential Oil Res. 1989.

37. Irianto K. *Mikrobiologi: Menguak Dunia Mikroorganismen*. Jilid 1. Yrama Widya. Bandung. 2007. hal. 92
38. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. *Natural Products Isolation*. 2nd edition. Humana Press. Totowa, New Jersey. 2006. Hal. 341

Lampiran 1. Skema kerja ekstraksi dan pengujian ekstrak



Lampiran 2. Skema kerja penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak n-butanol akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.)



Lampiran 3. Komposisi Medium

1. Medium Trypticasein Soy Agar (TSA)

Komposisi :

Casein pepton	15,0 gram
Soy pepton	5,0 gram
Natrium klorida	5,0 gram
Air suling hingga	1000 ml

2. Medium Muller Hinton Agar (MHA)

Komposisi :

Infus daging	5,0 gram
Casein hidrosilat	17,5 gram
Pati	1,5 gram
Agar	13,0 gram
Air suling hingga	1000 ml

3. Medium Nutrien Broth (NB)

Komposisi :

Ekstrak daging	3,0 gram
Pepton	5,0 gram
Air suling hingga	1000 ml

Lampiran 4. Tabel data

Tabel 1. Hasil pengukuran diameter daerah hambatan ekstrak metanol (ekstrak awal) akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) terhadap *Vibrio harveyi* dengan konsentrasi 20%.

Replikasi	Diameter daerah hambatan (mm)		
	Ekstrak Akar	Ekstrak Buah	Kontrol Negatif (DMSO)
1	10,8	10,7	0,0
2	9,8	10,2	0,0
3	10,5	10,6	0,0
Rata-rata	10,4	10,5	0,0

Tabel 2. Hasil pengukuran diameter daerah hambatan ekstrak hasil partisi ekstrak metanol akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) terhadap *Vibrio harveyi* dengan konsentrasi 20%.

Bagian tanaman	Diameter daerah hambatan (mm)				
	Replikasi	Ekstrak n-heksan	Ekstrak n-butanol	Ekstrak air	Kontrol negatif (DMSO)
Akar	1	7,6	14,9	9,0	0,0
	2	7,8	16,0	9,7	0,0
	3	6,9	15,6	7,5	0,0
	Rata-rata	7,4	15,5	8,7	0,0
Buah	1	6,4	15,8	8,4	0,0
	2	7,7	16,7	8,9	0,0
	3	6,8	13,9	8,0	0,0
	Rata-rata	6,9	15,4	8,4	0,0

Tabel 3. Hasil penentuan nilai Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) terhadap *Vibrio harveyi*

Bagian tanaman	Konsentrasi							
	10%	5%	2,5%	1,25%	0,62%	0,31%	0,15%	0,075%
Akar	-	-	-	-	-	-	-	+
Buah	-	-	-	-	-	-	-	+

Keterangan :

- =Tidak terdapat pertumbuhan bakteri

+ = Terdapat pertumbuhan bakteri

Lampiran 5. Perhitungan nilai Rf

A. Ekstrak n-butanol akar

$$\begin{aligned} \text{Rf noda 1} &= \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 1}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}} \\ &= \frac{0,7 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}} \\ &= 0,13 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf noda 2} &= \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 2}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}} \\ &= \frac{2,7 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}} \\ &= 0,49 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf noda 3} &= \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 3}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}} \\ &= \frac{4,0 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}} \\ &= 0,72 \end{aligned}$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 4}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

Lampiran 5. Perhitungan nilai Rf

A. Ekstrak n-butanol akar

$$\begin{aligned} \text{Rf noda 1} &= \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 1}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}} \\ &= \frac{0,7 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}} \\ &= 0,13 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf noda 2} &= \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 2}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}} \\ &= \frac{2,7 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}} \\ &= 0,49 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf noda 3} &= \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 3}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}} \\ &= \frac{4,0 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}} \\ &= 0,72 \end{aligned}$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 4}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

$$= \frac{4,7 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,84$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 5}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

$$= \frac{5,2 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,94$$

B. Ekstrak n-butanol buah

$$\text{Rf noda 1} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 1}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

$$= \frac{0,6 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,11$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 2}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

$$= \frac{2,6 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,47$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 3}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

$$= \frac{3,8 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,70$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 4}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

$$= \frac{4,4 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}}$$

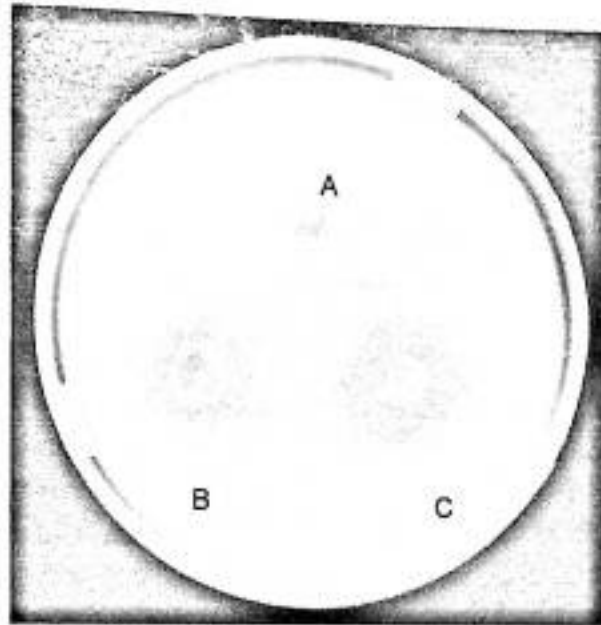
$$= 0,80$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa 5}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

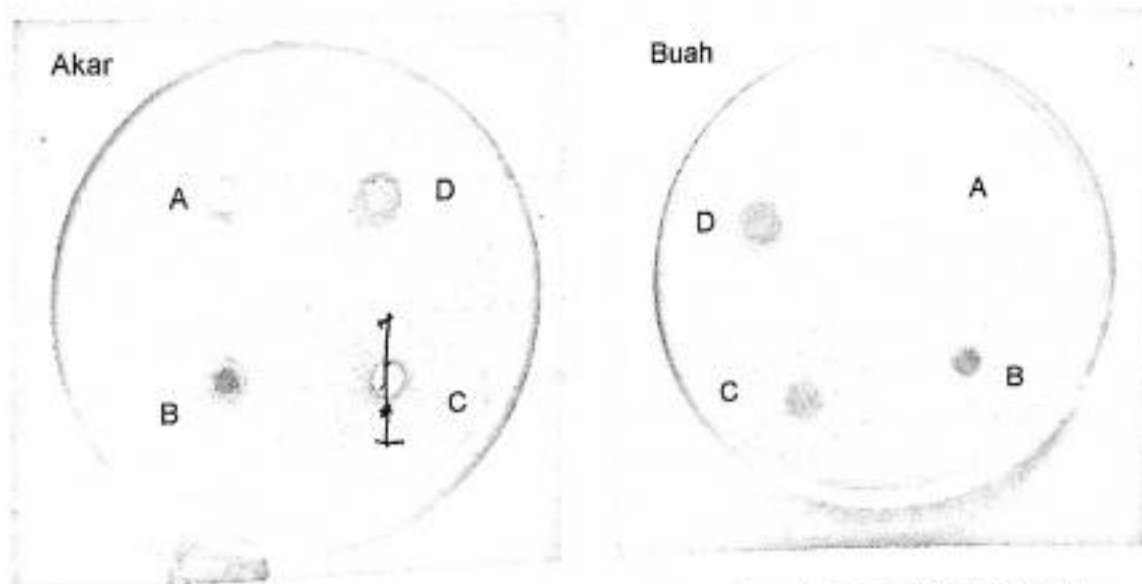
$$= \frac{5,4 \text{ cm}}{5,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,98$$

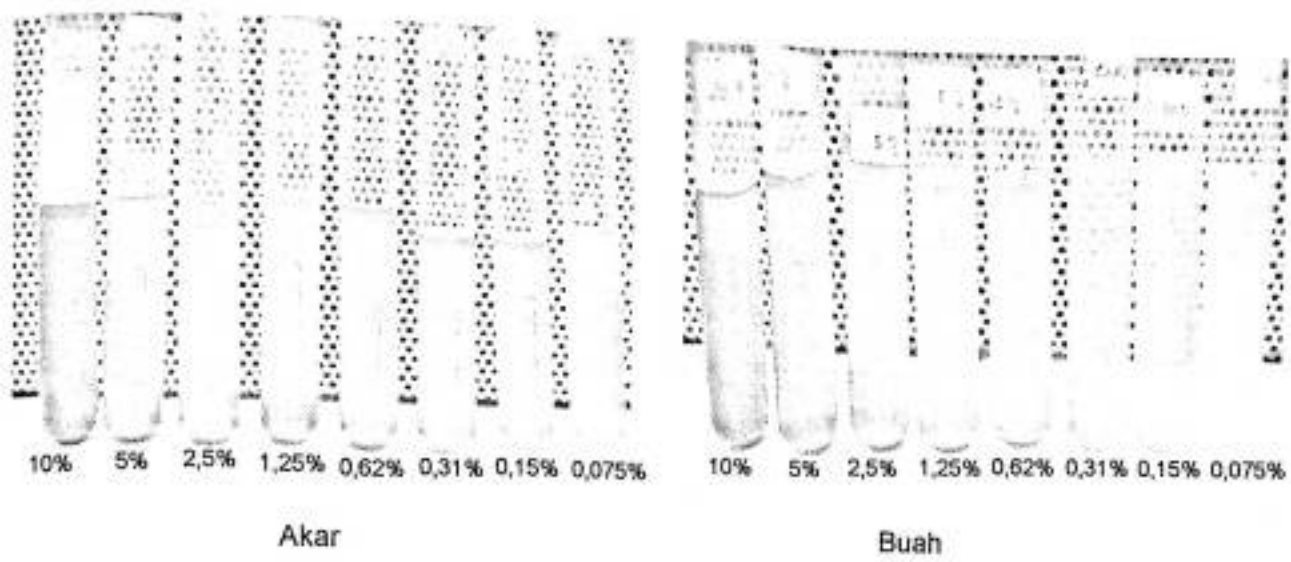
Lampiran 6. Foto hasil penelitian



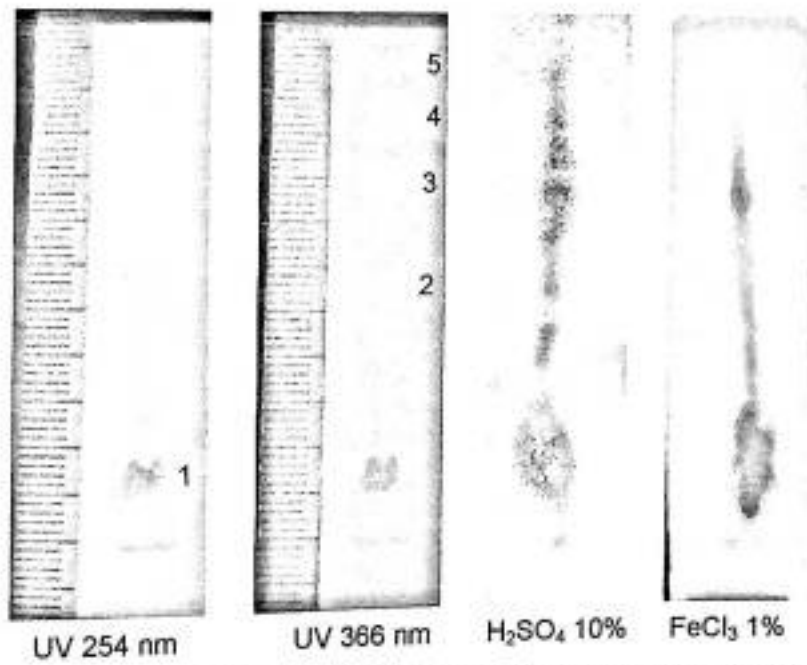
Gambar 1. Hasil uji daya hambat ekstrak metanol (ekstrak awal) akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.), A=control negatif, B=ekstrak metanol akar, C=ekstrak metanol buah



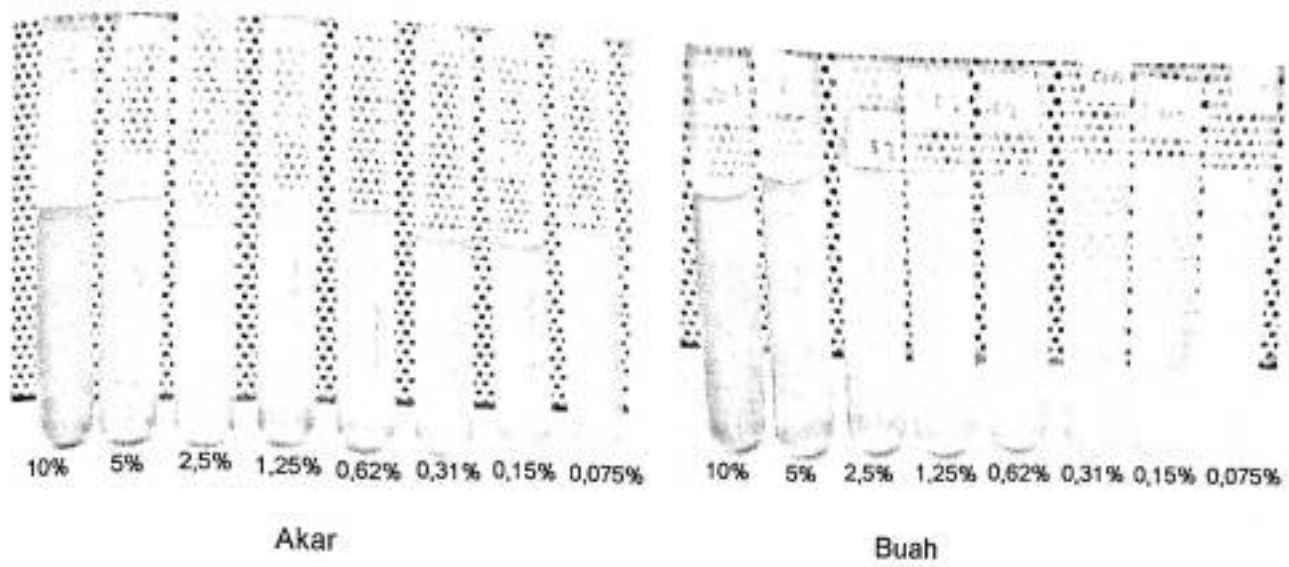
Gambar 2. Hasil Uji daya hambat ekstrak bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.), A= control negatif B= ekstrak n-heksan C= ekstrak n-butanol D=ekstrak air



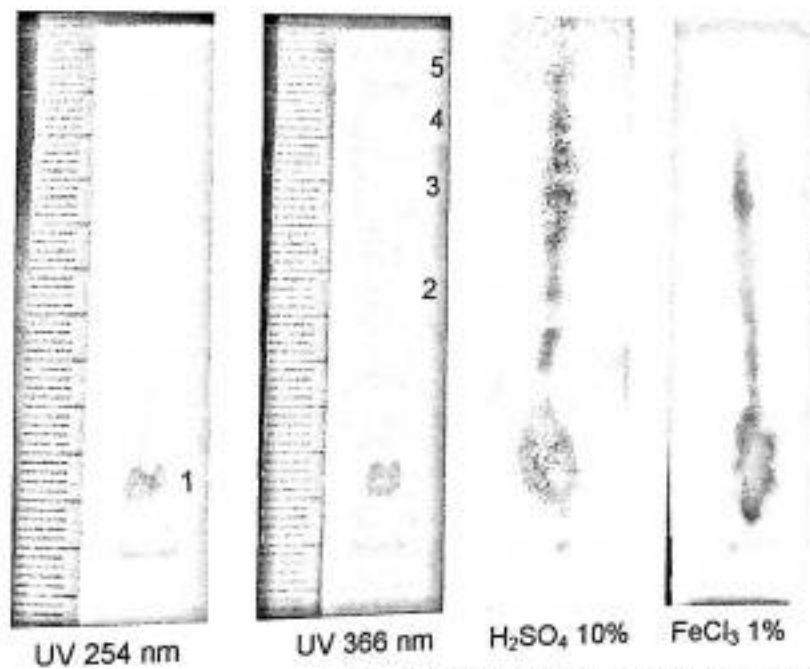
Gambar 3. Hasil penentuan KHM ekstrak n-butanol akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) terhadap *Vibrio harveyi*



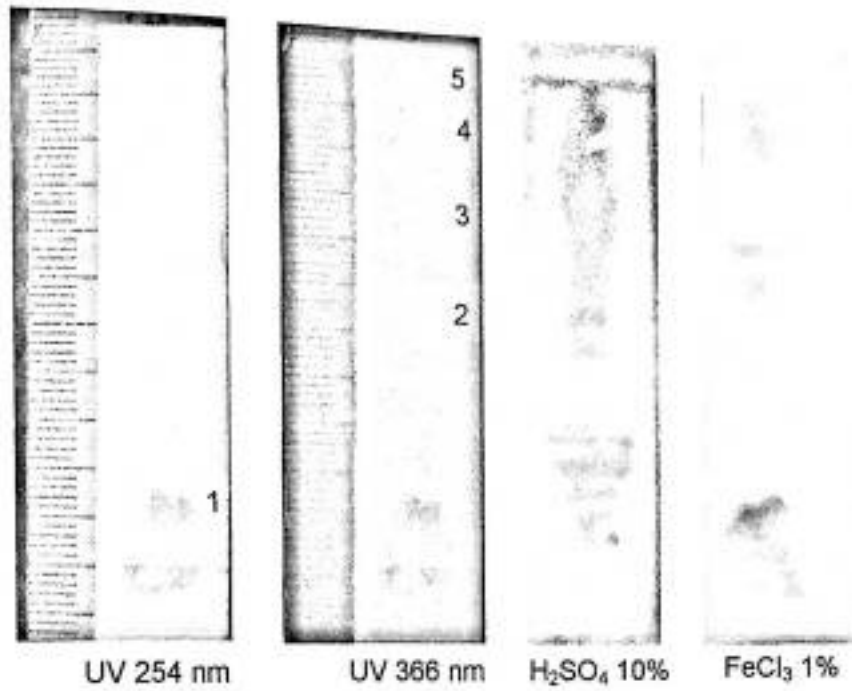
Gambar 4. Hasil KLT Ekstrak n-butanol Akar bakau (*Rhizophora stylosa* Griff), eluen n-butanol:asam asetat:air (4:1:5)



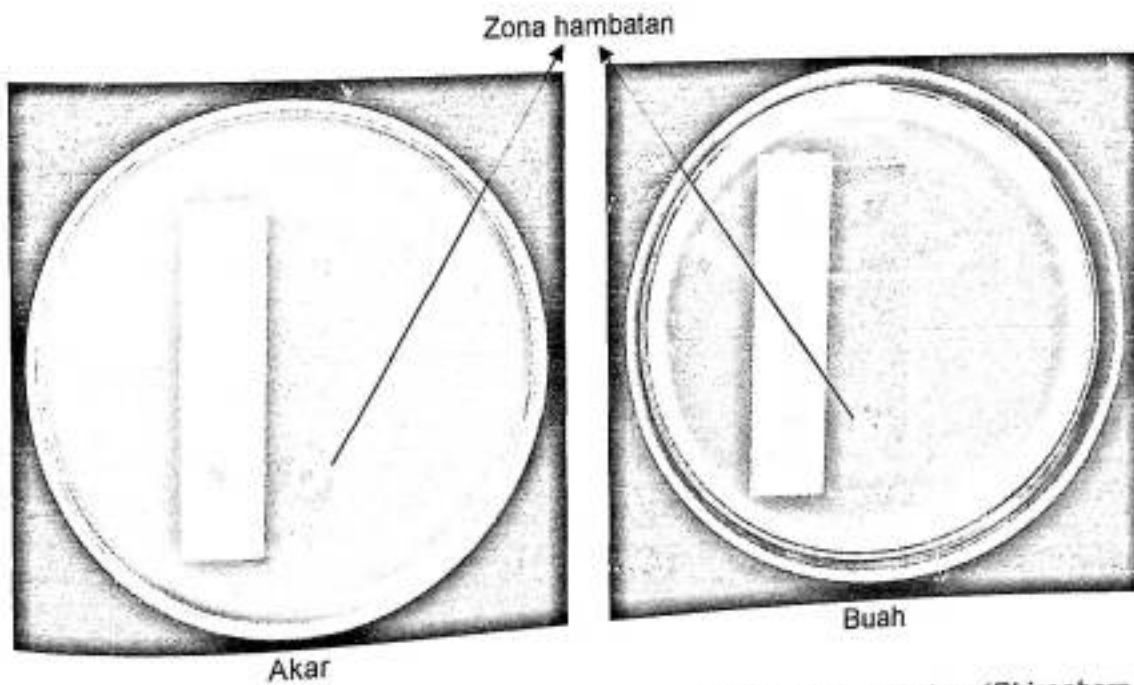
Gambar 3. Hasil penentuan KHM ekstrak n-butanol akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) terhadap *Vibrio harveyi*



Gambar 4. Hasil KLT Ekstrak n-butanol Akar bakau (*Rhizophora stylosa* Griff), eluen n-butanol:asam asetat:air (4:1:5)



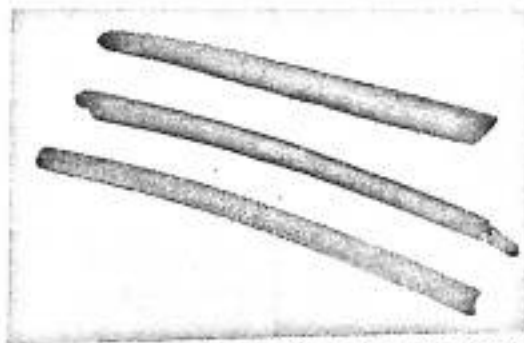
Gambar 5. Hasil KLT Ekstrak n-butanol buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff) eluen n-butanol:asam asetat:air (4:1:5)



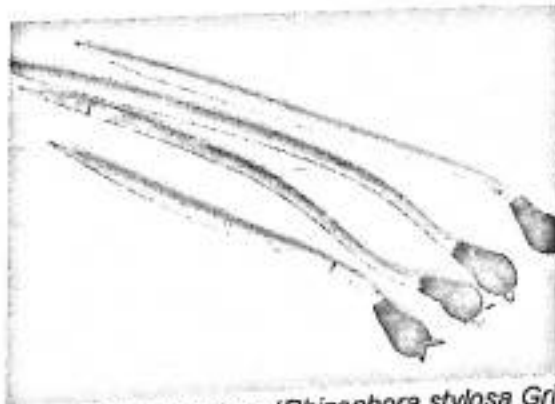
Gambar 6. Hasil KLT bioautografi ekstrak n-butanol Akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.)



Gambar 7. Tanaman bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.)



Gambar 8. Akar bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.)



Gambar 9. Buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.)

Lampiran 7. Hasil determinasi sampel


**YAYASAN KERAGAMAN HAYATI SULAWESI
(KHAS)**

 Sekretariat: Jalan Soan Blok C No. 13 A Makassar 90214
 Telp. (0411) 434661

Klasifikasi dari tanaman Bakau adalah sebagai berikut :

Regnum	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Dicotyledoneae
Supclassis	: Dialypetalae
Ordo	: Myrtales
Familia	: Rhizophoraceae
Genus	: <i>Rhizophora</i>
Species	: <i>Rhizophora stylosa</i> Griff.
Nama Indonesia	: Tanaman Bakau

Deskripsi : Habitus pohon, berakar tunggang dengan lentisel untuk pernafasan, daun tunggal berhadapan, pertulangan daun menyirip, bunga berukuran kecil berwarna putih. Dialypetalae artinya tumbuhan yang mahkota bunganya berlepasan. Rhizophoraceae kelompok tumbuhan bakau penyusun hutan Mangrove.

Makassar, 12 Nopember 2009

Dikerjakan oleh :



Dra. Eli Tambaru, M.Si.

Hj. Sri Suhadiyah, M.Agr.