



Isolation and Identification of Secondary Metabolic Compounds from Mangrove (*Rhizophora mucronata*) and their Bioactivity Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Bacteria

Anisa Sandhya Ligina[✉], Sudarmin

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang Gedung D6 Lantai 2, Kampus Sekaran, Gunungpati, Semarang, 50229, Indonesia

Info Artikel

Diterima Maret 2022

Disetujui April 2022

Dipublikasikan Mei 2022

Keywords:

Mangrove
Alkaloid
Antibacterial activity
Staphylococcus aureus
Escherichia coli

Abstrak

Bakteri seringkali dijumpai sebagai penyebab terjadinya suatu penyakit pada tubuh manusia karena bersifat patogen. Salah satu bakteri penyebab penyakit infeksi adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Tanaman mangrove yang kaya senyawa metabolit sekunder dimanfaatkan untuk mendapatkan zat antibakteri yang dapat berperan menghambat pertumbuhan bakteri. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder berupabalkaloid pada tanaman mangrove (*Rhizophora mucronata*) serta mengetahui aktivitas antibakteri senyawa alkaloid dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Metode penelitian dilakukan dengan remaserasi serta isolasi senyawa alkaloid, kemudian hasilnya dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi kolom, FT-IR dan UV-Vis. Hasil analisis menunjukkan adanya alkaloid turunan isoquinolin didukung oleh serapan FT-IR pada 3317 cm^{-1} menunjukkan gugus fungsi N-H yang merupakan ciri khas alkaloid dan panjang gelombang UV-Vis 230 nm. Senyawa tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 2 nm dan *Escherichia coli* sebesar 0 nm. Daya hambat yang diperoleh terhadap bakteri *Escherichia coli* disebabkan oleh lapisan membran sel bakteri gram negatif terdiri dari 3 lapis sehingga resisten terhadap antibakteri dan sulit ditembus. Pada bakteri *Staphylococcus aureus* hanya memiliki lapisan tunggal sehingga lebih mudah ditembus oleh antibakteri dengan menyebabkan lisis dan menghambat interkalasi DNA.

Abstract

Bacteria are often found as the cause of disease in the human body because they are pathogenic. One of the bacteria that cause infectious diseases is *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Mangrove plants that are rich in secondary metabolites are used to obtain antibacterial substances that can play a role in inhibiting bacterial growth. The purpose of this study was to determine the presence of secondary metabolites of alkaloids in mangrove plants (*Rhizophora mucronata*) and to determine the antibacterial activity of alkaloid compounds in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. The research method was carried out by remaceration and isolation of alkaloid compounds, analysis of thin-layer chromatography (TLC) and column chromatography, and characterization tests using FT-IR and UV-Vis. The results of the analysis showed the presence of isoquinoline-derived alkaloids supported by FT-IR absorption at 3317 cm^{-1} indicating the N-H functional group which is a characteristic of alkaloids and the UV-Vis wavelength of 230 nm. These compounds can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria by 2 nm and *Escherichia coli* by 0 nm. The inhibition obtained against *Escherichia coli* bacteria was caused by the cell membrane layer of gram-negative bacteria consisting of 3 layers so that it was resistant to antibacterial and difficult to penetrate. *Staphylococcus aureus* only has a single layer, so it is more easily penetrated by antibacterials by causing lysis and inhibiting DNA intercalation.

© 2022 Universitas Negeri Semarang

Pendahuluan

Bakteri merupakan mikroorganisme prokariotik yang dapat memberikan dampak negatif bagi makhluk hidup terutama pada manusia. Bakteri seringkali dijumpai sebagai penyebab suatu penyakit pada tubuh manusia dengan memberikan gejala seperti terjadinya infeksi yang memicu gangguan pencernaan, gangguan pada kulit, hingga kematian. Menurut (Brooks *et al.*, 2013) perkembangbiakan mikroorganisme seperti bakteri, virus, jamur, prion, protozoa ketika masuk ke dalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan organ yang memicu terjadinya infeksi. Mikroorganisme yang menyebabkan infeksi disebut juga patogen. Salah satu bakteri penyebab infeksi adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Bakteri *Escherichia coli* mengganggu sistem pencernaan dengan meningkatkan daya lekat kuman, merusak sel mukosa dengan penetrasi dan memproduksi toksin. Sedangkan *Staphylococcus aureus* memberikan gangguan pada kulit dengan menyebabkan peradangan, pembentukan abses, nekrosis, serta terjadinya bisul atau nanah, dan jerawat. Menurut (Misbahul, 2013) *Staphylococcus aureus* menginfeksi luka, menyebabkan shock, menginfeksi katup jantung yang dapat memicu gagal jantung, hingga menyebabkan kematian.

Pengendalian bakteri patogen memanfaatkan tanaman mangrove (*Rhizophora mucronata*) sebagai zat antibakteri. Zat antibakteri merupakan suatu zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Antibakteri bekerja dengan merusak susunan sel bakteri tanpa meracuni penggunaannya, sehingga antibakteri disebut sebagai zat dengan sifat toksik selektif. *Rhizophora mucronata* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio harvey* (Sumampouw, *et al.*, 2014). Tanaman mangrove (*Rhizophora mucronata*) memiliki senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, tannin, dan flavonoid (Kasitowati *et al.*, 2017). Menurut (Egra *et al.*, 2019) aktivitas antibakteri ditemukan dalam tumbuhan *Rhizophora mucronata* mengandung senyawa aktif triterpenoid, flavonoid, alkaloid, dan tanin.

Tanaman mangrove (*Rhizophora mucronata*) memiliki potensi sebagai sumber daya alam yang besar yang dapat menghasilkan produk secara tidak langsung maupun secara langsung seperti bahan obat tradisional, hingga melindungi pantai dari badai, gelombang, dan angin besar (Sendukh *et al.*, 2019). *Rhizophora mucronata* menjadi salah satu jenis tanaman mangrove yang tumbuh subur dan tersebar di banyak pesisir Indonesia yang memiliki populasi terbesar di pulau Kalimantan, Sumatra, Papua, dan Sulawesi. *Rhizophora mucronata* di Indonesia memiliki populasi hingga 75% dari seluruh wilayah Asia Tenggara dan 25% dari populasi Dunia (Sungkar *et al.*, 2018). *Rhizophora mucronata* termasuk tumbuhan yang beradaptasi mudah dengan habitat asal mereka, sehingga tanaman tersebut banyak mengandung senyawa fitokimia yang memiliki sifat farmakologis, ekologis, dan toksikologi. (Mahmiah *et al.*, 2017) Kandungan senyawa fitokimia tanaman *Rhizophora mucronata* dapat digunakan sebagai zat antibakteri (Sumampouw, *et al.*, 2014).

Alkaloid merupakan senyawa yang paling banyak diperoleh dari tumbuhan serta terlibat pada pertahanan dan perlindungan tanaman. Senyawa alkaloid yang telah diidentifikasi pada penelitian Sathyabama (2015) menyebutkan bahwa senyawa aktif alkaloid efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. Alkaloid dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebabkan oleh sifat dasarnya dengan ciri gugus N-H sehingga mempengaruhi kemampuan kerja suatu zat antibakteri (Rahmawati *et al.*, 2017) Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui jenis alkaloid tanaman mangrove (*Rhizophora mucronata*) serta uji aktivitasnya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Escherichia coli*.

Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Jurusan Kimia Universitas Negeri Semarang. Sampel Akar tanaman mangrove (*Rhizophora mucronata*) diambil dari hutan mangrove Grand Maerokoko, Tawang Sari, Semarang Barat, Semarang, Jawa Tengah, melalui perizinan dari pengelola tempat wisata tersebut.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi blender, ayakan 40 mesh, neraca, spatula, pengaduk, kertas saring, corong, gelas kaca, gelas ukur, pipet tetes, tabung reaksi, plat tetes, tabung vial, penjepit, corong pisah, oven, chamber, pipa kapiler, cawan petri, porselen, rotary evaporator, penggaris, pipet mikro, jarum ose, lampu UV, UV-Vis, dan FT-IR. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan berupa serbuk akar tanaman mangrove sebanyak 750 gram, aquades, n-heksana, etanol teknis, plat silica gel GF₂₅₄, silica gel GF₂₅₄, etil asetat, n-butanol, HCl p.a, asam asetat, etanol teknis, methanol, aseton, HCl 1%, CHCl₃, NH₃ 10%, NHO₃ 10%, dietil eter, kloroform, H₂SO₄ 2N, H₂SO₄ p.a, anhidrit asetat, norit, FeCl₃, bakteri yang digunakan yaitu *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*.

Prosedur diawali dengan maserasi menggunakan n-heksana 3,5 L selama 3x24 jam, diaduk setiap 24 jam sekali, filtrat disaring dan residu diangin-anginkan untuk dilanjutkan remaserasi dengan etanol 3,5

L dengan perlakuan yang sama. Filtrat n-heksana dan etanol dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kasar dan dilakukan uji fitokimia.

Isolasi dilakukan dengan partisi 25 mL sampel kasar ditambah 50 ml NHO_3 10% dan 50 mL dietil eter, dikocok, didiamkan, diambil fase asam, dialkilasi dengan 25 mL NH_3 10%, dan ditambahkan 25 mL CHCl_3 . Fase kloroform menarik senyawa alkaloid diambil untuk dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis (Jati, 2019). KLT dilakukan menggunakan beberapa komponen eluen antara lain kloroform : metanol (9:1), etanol : etil asetat : n-heksana (1:2:30), kloroform : aseton : methanol (20:3:2), methanol : etil asetat : aquadest (6:4:2), etil asetat : kloroform (10:8), kloroform : etanol (7:3) dengan fasa diam silica gel GF_{254} . Eluen yang mampu memisahkan paling baik digunakan untuk memurnikan isolat menggunakan kromatografi kolom sebagai fasa gerak dan silica gel GF_{254} sebagai fasa diam. Fraksi yang diperoleh dilakukan KLT kembali untuk menentukan R_f senyawa. Kemudian dilakukan identifikasi struktur senyawa alkaloid menggunakan FT-IR dan UV-Vis.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Universitas Diponegoro sebagai Laboratorium Uji Mikrobiologi yang menyediakan pembiakan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode cakram. Kertas cakram ukuran 5 mm diresapkan pada sampel dan ditekan pelan pada media agar. Kontrol positif menggunakan 20 μL kloramfenikol 30 mg/mL, dan kontrol negatif dengan pengenceran aquades steril. Media bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Mpila *et al.*, 2012)

Hasil dan Pembahasan

Maserasi dilakukan untuk menarik senyawa metabolit sekunder yang ada didalam sampel tanaman sesuai kepolarannya dengan cara perendaman. Maserasi pada penelitian ini menghasilkan rendemen akar tanaman mangrove (*Rhizophora mucronata*) ekstrak n-hexana sebesar 4% dan ekstrak etanol 10,67%. N-heksana digunakan untuk menarik senyawa non-polar sedangkan etanol digunakan untuk menarik senyawa polar. Maserasi pertama dilakukan dengan n-heksana agar tidak mengganggu maserasi selanjutnya dengan membentuk emulsi. Emulsi tersebut akan berupa campuran fase etanol dan n-heksana. Pemilihan pelarut etanol sebagai pelarut polar dilakukan dengan melihat titik didih etanol yang tidak terlalu tinggi sehingga tidak membutuhkan suhu yang tinggi untuk mengekstrak suatu senyawa dalam sampel.

Ekstrak kasar yang diperoleh dilakukan uji fitokimia dan menunjukkan adanya senyawa seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji fitokimia sebelum dilakukan isolasi

Jenis Uji	Keterangan	
	N-Heksana	Etanol
Alkaloid	-	+
Flavonoid	+	+
Steroid	+	+
Terpenoid	-	-
Fenolik	-	+
Saponin	-	-

Isolasi senyawa alkaloid dilakukan dengan metode partisi cair-cair menggunakan corong pisah. Sebanyak 50 mL sampel ditambahkan HNO_3 10% dan 50 mL dietil eter. Penambahan asam bertujuan untuk mengubah alkaloid menjadi bentuk garamnya. Selanjutnya fase asam dialkilasi dengan NH_3 10% dilanjutkan penambahan kloroform (CHCl_3). NH_3 10% bertujuan untuk mengubah garam alkaloid tersebut kembali dalam bentuk semula yang tidak dapat larut dalam larutan yang mengandung air sehingga penambahan kloroform (CHCl_3) menyebabkan alkaloid berpindah dari fase air menuju fase organik.

Hasil positif yang ditunjukkan dari uji fitokimia sebelum dan setelah isolasi membuktikan bahwa akar tanaman mangrove memiliki senyawa alkaloid. Fase organik atau fase kloroform (CHCl_3) yang mengandung senyawa alkaloid dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan kromatografi lapis tipis.

Tabel 2. Uji Fitokimia Setelah Isolasi

Jenis Uji	Parameter	Keterangan
HCl 1%	Endapan Jingga	+
Dragendorff	Endapan Jingga	+
Meyer	Endapan Putih	-



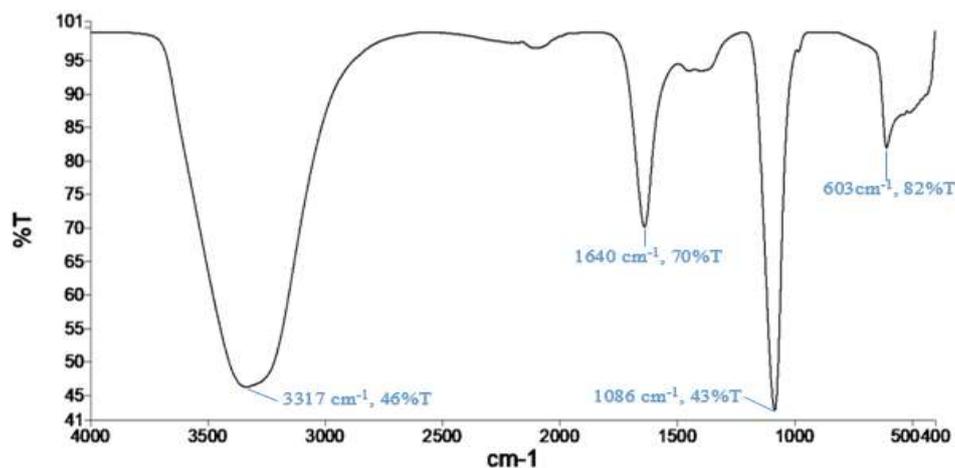
Gambar 1. Hasil Deteksi Noda KLT Eluen Kloroform : Metanol (9:1)
(a). setelah isolasi (b) setelah pemurnian

Kromatografi lapis tipis yang mendapatkan noda terbaik terjadi pada eluen kloroform : metanol (9:1) yaitu 3 noda dengan $Rf_1 = 0,46$; $Rf_2 = 0,52$; dan $Rf_3 = 0,65$ yang nampak pada panjang gelombang 254 nm menggunakan lampu UV, sedangkan Rf standar kafein sebesar 0,72. Perhitungan Rf dilakukan berdasarkan (Wulandari, 2011) perbandingan antara jarak yang ditempuh suatu komponen terhadap jarak keseluruhan seperti pada rumus dibawah ini:

$$Rf = \frac{\text{jarak noda dari batas bawah}}{\text{jarak pergerakan eluen}}$$

Rf tersebut diidentifikasi merupakan harga Rf yang dimiliki golongan oleh alkaloid. Penelitian (Aksara *et al.*, 2013) kloroform : metanol (9,5:0,5) menghasilkan Rf alkaloid 0,21-0,92. Pada tepi bawah terdapat noda dengan Rf 0,04 yang diduga merupakan noda pengotor berasal dari perlakuan penanganan plat silica gel, kontaminasi sidik jari dan atau pengotor pada eluen. Dalam analisis kuantitatif pengotor tersebut tidak mengganggu dikarenakan berada pada $Rf < 0,2$ yang berada diluar Rf analisis kuantitatif yaitu 0,2-0,8 (Wulandari, 2011). Hasil kromatografi kolom mendapatkan Rf 0,82 yang juga merupakan Rf alkaloid terlihat pada panjang gelombang 366 nm.

Senyawa alkaloid yang dibuktikan keberadaannya dengan kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom dilakukan identifikasi struktur menggunakan FT-IR dan UV-Vis. Uji struktur FT-IR alkaloid dilakukan pengukuran pada daerah cahaya *infrared* tengah atau *mid infrared* yaitu pada panjang gelombang 4000-200 cm^{-1} (Dachriyanus, 2017).

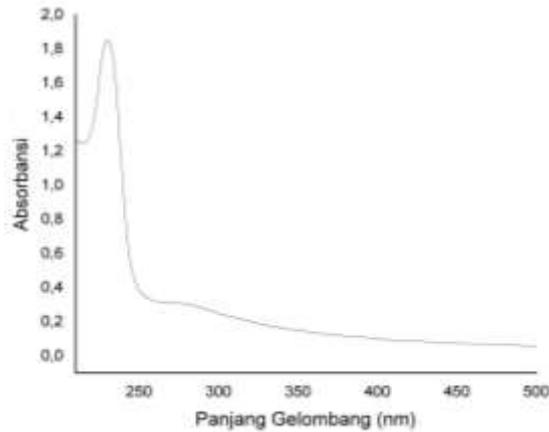


Gambar 2. Hasil spektra FT-IR senyawa alkaloid akar tanaman mangrove (*Rhizophora mucronata*).

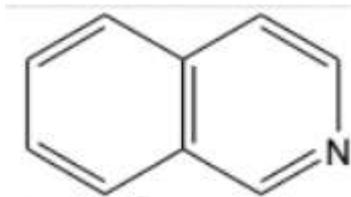
Hasil analisis spektra FT-IR terdapat serapan melebar vibrasi ulur -NH pada 3317,03 cm^{-1} disebabkan adanya ikatan N-H yang merupakan ciri khas senyawa alkaloid, pada serapan 1640,50 cm^{-1}

dengan pita tajam menunjukkan adanya gugus C=C dengan intensitas sedang, kemudian pita tajam ditunjukkan pada serapan $1086,54 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan indikasi adanya gugus C-N diperkuat dengan N-C=O pada bilangan ciri khas alkaloid ($1020-1250 \text{ cm}^{-1}$), pada vibrasi $603,48 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya serapan lentur gugus fungsi C-H alifatik (Kosela, 2103)

Identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dilakukan pengukuran panjang gelombang antara 200-800 nm (Dachriyanus, 2017).



Gambar 3. Hasil spektra UV senyawa alkaloid



Gambar 4. Hasil struktur senyawa alkaloid turunan isoquinolin

Berdasarkan hasil analisis Spektroskopi *visible* dapat diketahui bahwa isolat alkaloid akar tanaman mangrove (*Rhizophora mucronata*) mengandung senyawa alkaloid. (Harborne, 1996) mengatakan bahwa untuk senyawa alkaloid memiliki panjang gelombang maksimum 203-230 nm. Menurut (Cordell, 1981) senyawa yang mengandung inti isokuinolin memiliki panjang gelombang maksimum pada daerah spektroskopi visible dan sinar tampak 230 nm, 266 nm, dan 351 nm. Adanya serapan pada panjang gelombang 230 diduga merupakan hasil transisi elektron $n-\pi^*$ yang disebabkan oleh gugus C=O. Senyawa yang mengandung inti isoquinolin merupakan suatu senyawa alkaloid yang mempunyai 2 cincin atom karbon dan 1 atom nitrogen (Musman, 2017)

Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode cakram atau *paperdisk*, dimana terbentuknya zona hambat di sekitar *paperdisk* mengindikasikan adanya aktivitas antibakteri. Hasil uji aktivitas antibakteri dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Zona Hambat Bakteri Senyawa Alkaloid Tanaman Mangrove (*Rhizophora mucronata*)

No	Bakteri	Hasil (mm)	Metode
1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	Paper disk
2.	<i>Escherichia coli</i>	0	Paper disk

Zat antibakteri dari senyawa alkaloid turunan isoquinolin kurang efektif menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif *Escherichia coli*. Hal ini disebabkan bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks sehingga memiliki resistensi yang lebih tinggi terhadap senyawa antibakteri. Bakteri gram negatif dinding sel nya berlapis tiga yang terdiri dari lipidprotein, lipidopolisakarida, dan sedikit peptidoglikan (5-10%) (Septiani & Ima, 2017). Susunan dinding sel pada bakteri gram negatif tersebut memperkuat rigiditas atau kekuatan dinding sel bakteri dengan ikatan yang disebut ikatan intermolekuler (Kinrel, *et al.*, 2011).

Uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan zona hambat 2 mm. Data ini menunjukkan zat antibakteri tersebut hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dengan intensitas lemah. Bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki struktur dinding sel dengan susunan tunggal yang terdiri dari peptidoglikan 95% sehingga lebih mudah ditembus oleh zat antibakteri. Zat antibakteri yang mengandung senyawa alkaloid turunan isoquinolin bekerja menghambat pertumbuhan bakteri dengan mengganggu terbentuknya komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri yang dapat menyebabkan bakteri menjadi lisis, menghambat sintesis protein. Dalam penghambatan sintesis protein mengakibatkan bakteri *Staphylococcus aureus* salah membaca kode pada m-RNA oleh t-RNA dan menghambat enzim topoisomerase bakteri *Staphylococcus aureus*.

Hasil penelitian yang diperoleh sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Nurhayati *et al.*, 2020) bahwa dalam penelitiannya menghasilkan daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 1,18-1,46 mm menggunakan metode cakram. Begitu pula dengan daya hambat bakteri *Escherichia coli* yang memiliki daya hambat lebih kecil sebesar 0,75-1,27 mm.

Simpulan

Tanaman mangrove (*Rhizophora mucronata*) mengandung senyawa alkaloid yang berasal dari turunan isoquinolin ditunjukkan dengan perolehan panjang gelombang 230 dari instrumen UV-Vis, diperkuat dengan serapan FT-IR 3317 cm^{-1} yang merupakan daerah gugus fungsi N-H ciri khas senyawa alkaloid. Senyawa alkaloid turunan isoquinolin menunjukkan aktivitas antibakteri dengan intensitas lemah dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* 0 mm dan *Staphylococcus aureus* 2 mm. Hasil daya hambat yang diperoleh disebabkan susunan membrane sel yang lebih kompleks pada bakteri *Escherichia coli* meliputi peptidoglikan 5-10%, lipidprotein, dan lipidopolisakarida sehingga lebih sulit ditembus oleh senyawa antibakteri dibandingkan membrane sel pada bakteri *Staphylococcus aureus* yang hanya tersusun dari lapisan tunggal peptidoglikan 95%.

Daftar Referensi

- Aksara, R., Musa, W. J. A., & Alio, L. 2013. Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Mangga (*Mangifera indica* L). *Jurnal Entropi*, 8(1): 514–519.
- Brooks, G.F., Carrol, K.C. & Butel J.S., Morse, S.A., & Mietzner, T.A. 2013. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg* (25th ed.). Jakarta: EGC.
- Cordell, G.A. 1981. *Introduction to Alkaloids a Biogenetic Approach*. John Wiley & Sons.
- Dachriyanus, D. 2017. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. Padang: Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi (LPTIK), Universitas Andalas.
- Egra, S., Mardhiana, M., Rofin, M., Adiwena, M., Jannah, N., Kuspradini, H., & Mitsunaga, T. 2019. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Bakau (*Rhizophora mucronata*) dalam Menghambat Pertumbuhan *Ralstonia Solanacearum* Penyebab Penyakit Layu. *Agrovigor: Jurnal Agroekoteknologi*, 12(1): 26-31.
- Harborne, J. B. 1996. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro), Bandung : Penerbit ITB.
- Jati, N.K., Prasetya, A.T. & Mursiti, S. 2019. Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Alkaloid pada Daun Pepaya. *Jurnal Mipa*, 42(1): 1–6.
- Kasitowati, R. D., Yamindago, A., & Safitri, M., 2017. Potensi Antioksidan dan Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Mangrove *Rhizophora mucronata*, Pilang Probolinggo. *JFMR-Journal of Fisheries and Marine Research*, 1(2): 72–77.
- Knirel, Y.A., Valvano, M. A. 2011. *Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis, and Interaction*. NewYork: SpringerWienNewYork.
- Kosela, S. 2103. Penentuan Struktur Molekul dengan Pendekatan Problem dan Solusi Spektra. Yogyakarta: Dian Rakyat.
- Mahmiah, Sudjarwo, G. W. & Mizni, M. H. O. 2017. Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang *Rhizospora mucronata* L. *Prosiding Seminar Nasional Kelautan XII*, 52–57.

- Misbahul, H. 2013. Pengaruh Madu Terhadap Pertumbuhan Bakteri Gram Positif (*Staphylococcus Aureus*) Dan Bakteri Gram Negatif (*Escherichia Coli*) Effect On The Growth Of Honey gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*). *Jurnal Analis Kesehatan* 2(2): 250-259.
- Mpila, D.A., Fatimawali, & Wiyono, W.I., 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (*Coleus Atropurpureus* [L] Benth) Terhadap *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli* Dan *Pseudomonas aeruginosa* Secara In-Vitro. *Pharmakon*, 1(1): 13-22.
- Musman, M. 2017. Kimia Organik Bahan Alam. Banda Aceh: Syiah Kuala University Press.
- Nurhayati, L. S., Yahdiyani, N., & Hidayatulloh, A. 2020. Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt Dengan Metode Difusi Sumuran Dan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 1(2): 41-46.
- Rahmawati, F., Bintang, M., & Made Artika, I. 2017. Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of *Geranium homeanum* Turez Leaves. *Current Biochemistry* 4(3): 13–22.
- Sendukh, T. W., Linggama, G. A., Kembaren, M. S., & Montolalu, L. A. 2019. Aktivitas Antibakteri Air Rebusan Daun Mangrove *Sonneratia alba*. *Media Teknologi Hasil Perikanan*, 7(3): 68-71.
- Septiani, N. D., & Ima, W. 2017. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Lamun (*Cymodocea rotundata*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Saintek Perikanan*, 13(1): 1–6.
- Sumampouw, M., Bara, R., Awaloei, H., & Posangi, J. 2014. Uji Efek Antibakteri Jamur Endofit Akar Bakau *Rhizophora stylosa* Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal E-Biomedik*, 2(1): 1-5.
- Sungkar, O. F., Khanza, S., & Pangestu, R. A. 2018. Aktivitas Antibakteri Bedak yang Diperkaya dengan Konsentrasi Ekstrak Buah (*Rhizophora mucronata*). *Jurnal Teknologi Pangan*, 2(2): 135–141.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: Taman Kampus Presindo.