


**Bukti Korespondensi Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia**  
**Efektivitas Ekstrak Mangrove Rhizophora Apiculata (Tomlinson, 1986) Dalam Menghambat Vibrio Parahaemolyticus Penyebab Penyakit Pada Udang Vaname Litopenaeus Vannamei (Boone, 1931)**

Compose

← Back ↶ ↷ → Archive Move Delete Spam ...

Yahoo/Inbox ☆

[JARI] Proofreading Request (Author)

 **Tanbiyaskur Tanbiyaskur** <ejournal@unsri.ac.id>  
To: Supono supono Sat, 31 Dec 2022 at 11:55 pm ☆

Supono supono:

Your submission "EFEKTIFITAS EKSTRAK MANGROVE Rhizophora apiculata (Tomlinson, 1986) DALAM MENGHAMBAT Vibrio parahaemolyticus PENYEBAB PENYAKIT PADA UDANG VANAME Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)" to Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia now needs to be proofread by following these steps.


1. Click on the Submission URL below.
2. Log into the journal and view PROOFING INSTRUCTIONS
3. Click on VIEW PROOF in Layout and proof the galley in the one or more formats used.
4. Enter corrections (typographical and format) in Proofreading Corrections.
5. Save and email corrections to Layout Editor and Proofreader.
6. Send the COMPLETE email to the editor.

Submission URL:  
<https://ejournal.unsri.ac.id/index.php/jari/author/submissionEditing/18678>  
Username: supono

Tanbiyaskur Tanbiyaskur  
Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia  
Phone 07117728874  
[jurnaljari@gmail.com](mailto:jurnaljari@gmail.com)

---

Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia  
<http://ejournal.unsri.ac.id/index.php/jari>


  
199-2011 Su... .pdf  
465.2kB

Compose

← Back ↶ ↷ → Archive Move Delete Spam ...

Yahoo/Inbox ☆

[JARI] Editor Decision


 **Akuakultur Rawa Indonesia fp** <jari@fp.unsri.ac.id>  
To: supono\_unila@yahoo.com Tue, 15 Nov 2022 at 2:50 pm ☆

Supono supono: Revision Required

We have reached a decision regarding your submission to Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia, "EFEKTIFITAS EKSTRAK MANGROVE Rhizophora apiculata (Tomlinson, 1986) DALAM MENGHAMBAT Vibrio parahaemolyticus PENYEBAB PENYAKIT PADA UDANG VANAME Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)".

Our decision is to: Revisions Required

Tanbiyaskur Tanbiyaskur  
Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia  
Phone 07117728874  
[jurnaljari@gmail.com](mailto:jurnaljari@gmail.com)

  
3.18678-51... .docx  
64.3kB

↶ ↷ → ...

Compose

← Back

Archive Move Delete Spam


[JARI] Editor Decision 2 Yahoo/Inbox ☆

**Akuakultur Rawa Indonesia fp** Supono supono We have reached a decision regarding your submission to Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia. "i Tue, 15 Nov 2022 at 2:52 pm ☆

**supono supono** <supono\_unila@yahoo.com>  
To: Akuakultur Rawa Indonesia fp Thu, 17 Nov 2022 at 5:16 pm ☆

Berikut kami kirimkan artikel yang telah kami perbaiki, terima kasih.

> Show original message

 18678-5151....docx  
76.1kB

← ↶ ↷ →

Compose

← Back

Archive Move Delete Spam

[JARI] Submission Acknowledgement Yahoo/Inbox ☆

**Akuakultur Rawa Indonesia fp** <jari@fp.unsri.ac.id>  
To: supono\_unila@yahoo.com Tue, 20 Sept 2022 at 11:30 pm ☆

Yth. Penulis,

Terimakasih atas partisipasi Anda telah mengirimkan naskah ke Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia (JARI).

Sebagai persyaratan, mohon untuk menyelesaikan biaya publikasi sebesar **Rp 350.000,-** ke Rekening **BNI 0363211872 an. Tanbiyaskur (editor chief)** mengisi Surat Pernyataan Penulis (terlampir).

Mohon bukti transfer dan surat pernyataan yang sudah diisi dapat dikirim via email ini. Atas perhatiannya kami mengucapkan terima kasih.

 SURAT PER... .doc  
41.5kB

← ↶ ↷ →

Compose

← Back ↶ ↷ → Archive Move Delete Spam ...

[JAFH] Submission Acknowledgement 2 Yahoo/Inbox ☆

**Akuakultur Rawa Indonesia fp** Yth. Penulis, Terimakasih atas partisipasi Anda telah mengirimkan naskah ke Jurnal Akuakultur Rawa indonesia (. Tue, 20 Sept 2022 at 11:30 pm ☆

**supono supono** <supono\_unila@yahoo.com>  
To: Akuakultur Rawa Indonesia fp Wed, 21 Sept 2022 at 11:38 am ☆

Kepada Yth. Editor JARI  
Berikut kami kirimkan surat pernyataan dan bukti transfer, terima kasih

Supono

> Show original message

Download all attachments as a zip file

Accounting Package	30.000.000
Bank Perkreditan	5.000.000.000
Transfer	21.000.000
Transfer	0.000.000
Bank Perkreditan	0.000.000
Bank Perkreditan	0.000.000
Bank Perkreditan	0.000.000
Bank Perkreditan	0.000.000
Bank Perkreditan	0.000.000
Bank Perkreditan	0.000.000

Bukti transfer.jpeg 42.4Kb Surat Pernya....pdf 217.4Kb

← ↶ ↷ → ...

Compose

← Back ↶ ↷ → Archive Move Delete Spam ...

[JARI] Submission Acknowledgement Yahoo/Inbox ☆

**Tanbiyaskur** <ejournal@unsri.ac.id>  
To: Supono supono Mon, 15 Aug 2022 at 6:25 am ☆

Supono supono:

Thank you for submitting the manuscript, "EFEKTIFITAS EKSTRAK MANGROVE *Rhizophora apiculata* (Tomlinson, 1986) DALAM MENGHAMBAT *Vibrio parahaemolyticus* PENYEBAB PENYAKIT PADA UDANG VANAME *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)" to Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:  
<https://ejournal.unsri.ac.id/index.php/jari/author/submission/18678>  
Username: supono

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Tanbiyaskur  
Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia


Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia  
<http://ejournal.unsri.ac.id/index.php/jari>

← ↶ ↷ → ...

Compose

← Back ↶ ↷ → Archive Move Delete Spam ...

[JARI] Copyediting Review Request Yahoo/Inbox ☆

 **Tanbiyaskur Tanbiyaskur** <ejournal@unsri.ac.id>  
To: Supono supono Sat, 31 Dec 2022 at 11:49 pm ☆

Supono supono:

Your submission "EFEKTIFITAS EKSTRAK MANGROVE *Rhizophora apiculata* (Tomlinson, 1988) DALAM MENGHAMBAT *Vibrio parahaemolyticus* PENYEBAB PENYAKIT PADA UDANG VANAME *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)" for Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia has been through the first step of copyediting, and is available for you to review by following these steps.

1. Click on the Submission URL below.
2. Log into the journal and click on the File that appears in Step 1.
3. Open the downloaded submission.
4. Review the text, including copyediting proposals and Author Queries.
5. Make any copyediting changes that would further improve the text.
6. When completed, upload the file in Step 2.
7. Click on METADATA to check indexing information for completeness and accuracy.
8. Send the COMPLETE email to the editor and copyeditor.

Submission URL:  
<https://ejournal.unsri.ac.id/index.php/jari/author/submissionEditing/18878>  
Username: supono

This is the last opportunity to make substantial copyediting changes to the submission. The proofreading stage, that follows the preparation of the galleys, is restricted to correcting typographical and layout errors.

If you are unable to undertake this work at this time or have any questions, please contact me. Thank you for your contribution to this journal.

Tanbiyaskur Tanbiyaskur  
Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia  
Phone 07117728874  
[jurnaljari@gmail.com](mailto:jurnaljari@gmail.com)

Unread  
Starred  
Drafts 172  
Sent  
Archive  
Spam  
Deleted Items  
^ Less  
Views Hide  
Photos  
Documents  
Subscriptions  
Travel  
Folders Hide  
+ New folder

EFEKTIFITAS EKSTRAK MANGROVE *Rhizophora apiculata* (Tomlinson, 1986) DALAM MENGHAMBAT *Vibrio parahaemolyticus* PENYEBAB PENYAKIT PADA UDANG VANAME *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Comment [EHH1]: Fond nya berbe

Supono, Siti Ning Mulyaningsih, Yeni Elisdiana

Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung

\*Corresponden author email: [supono\\_unila@yahoo.com](mailto:supono_unila@yahoo.com)

### ABSTRACT

Vaname (*L. vannamei* -) shrimp cultivation is currently experiencing problems, one of which is disease caused by *Vibrio* bacteria, especially *V. parahaemolyticus*. This type of vibrio is the cause of white feces disease and AHPND in shrimp. Disease control due to *Vibrio* can be done by utilizing plants that have active compounds as natural antibacterials that are environmentally friendly. Mangrove plants have several active compounds that have great potential as antibacterial. This study aimed to examine some parts of the mangrove plant *R. apiculata* in inhibiting the activity of *V. parahaemolyticus*. Three parts of the mangrove plant, namely: roots, stems, and leaves were extracted using methanol. The three extracts were tested for their antibacterial activity against *V. parahaemolyticus* by several tests such as phytochemical, sensitivity, zone of inhibition, best dose, and toxicity tests. The test results showed that *R. apiculata* mangrove stem extract had the greatest ability to inhibit *V. parahaemolyticus* with an effectiveness value of 15.85% with the best dose of 200 mg/L. Toxicity testing using vaname shrimp larvae extract showed that mangrove stems were non-toxic with an LC50 value of 2,155.5 mg/L.

Comment [EHH2]: Di awal disebutkan dulu genusnya.

Comment [EHH3]: Disebutkan dulu genusnya untuk di awal

Comment [EHH4]: Penggunaan decimal menggunakan tanda koma atau tanda titik?

**Keywords:** White feces disease, AHPND, active compounds, extracts, antibacterials

### ABSTRAK

Budidaya udang vaname saat ini sering sekali mengalami kendala, salah satunya adalah terserang penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* terutama *V. parahaemolyticus*. *Vibrio* jenis ini menjadi penyebab munculnya penyakit *white feces disease* dan AHPND pada udang. —Penanggulangan penyakit karena *Vibrio* dapat dilakukan dengan memanfaatkan tanaman yang memiliki senyawa aktif sebagai antibakteri alami yang ramah lingkungan. Tumbuhan mangrove memiliki beberapa senyawa aktif yang berpotensi besar sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji beberapa bagian dari tanaman mangrove *R. apiculata* dalam menghambat aktivitas *V. parahaemolyticus*. Tiga bagian tanaman mangrove yaitu: akar, batang, dan daun diekstraksi dengan menggunakan methanol. Ketiga ekstrak tersebut diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *V. parahaemolyticus* dengan beberapa pengujian seperti uji fitokimia, sensitivitas, zona hambat, dosis terbaik, dan toksisitas. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak batang mangrove *R. apiculata* memiliki kemampuan paling besar dalam menghambat *V. parahaemolyticus* dengan nilai efektivitas sebesar 15,85% dengan dosis terbaik sebesar 200 mg/L. Pengujian toksisitas menggunakan larva udang vaname ekstrak menunjukkan bahwa batang mangrove bersifat tidak toksik dengan nilai LC50 2.155,5 mg/L.

**Kata kunci:** White feces disease, AHPND, senyawa aktif, ekstrak, antibakteri

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki potensi besar dalam pengembangan subsektor perikanan, terutama pada budidaya udang vaname. Udang vaname banyak dibudidayakan di Indonesia karena memiliki beberapa keunggulan seperti dapat dipelihara dengan kisaran salinitas yang lebar (0,5-45 ppt), dapat ditebar dengan kepadatan yang tinggi hingga lebih dari 150 ekor/m<sup>2</sup>, lebih resisten terhadap kualitas lingkungan yang rendah, dan waktu pemeliharaan lebih pendek yakni sekitar 90-100 hari per siklus (Wyban dan Sweeney, 1991).

Namun saat ini, budidaya udang banyak mengalami hambatan, seperti terserangnya penyakit (Supono *et al.*, 2021). Hal ini dikarenakan akibat lingkungan yang buruk, adanya virus ataupun bakteri (Supono *et al.*, 2019). Salah satu bakteri yang sering menyerang udang vaname yaitu *Vibrio parahaemolyticus* (Haditomo *et al.*, 2018). Gejala klinis udang saat terinfeksi penyakit vibriosis yaitu tubuh berwarna hitam kemerahan, serta beberapa organ luar tampak merah, terutama pada insang dan anggota badan.

Upaya pengobatan penyakit telah dilakukan dengan menggunakan antibiotik, (Sipayung *et al.*, 2015). Namun,

penggunaan antibiotik atau bahan kimia dengan konsentrasi yang kurang tepat dapat menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan perairan, menyebabkan resistensi, dan membahayakan kesehatan konsumen karena residu dari bahan kimia yang digunakan akan terakumulasi secara berkala pada tubuh udang (Defoirdt *et al.*, 2007). Hal tersebut menyebabkan pembatasan penggunaan antibiotik pada kegiatan budidaya.

Salah satu alternatif dalam pencegahan vibriosis menggunakan bahan alami yang dapat dijadikan sebagai antibakteri alami seperti tumbuhan mangrove. Mangrove merupakan produk tanaman alam yang memiliki kandungan senyawa bioaktif yang telah diketahui sebagai antimikroba dan obat-obatan yang dimanfaatkan dalam bidang kesehatan (Dai *et al.*, 2017). Berdasarkan penelitian Susanti *et al.* (2016) perendaman ekstrak daun mangrove *Rizhophora apiculata* pada dosis 20.000 mg/L merupakan dosis terbaik untuk mengobati kepiting bakau (*Scylla serrata*) yang di infeksi *V. harveyi*. Pada penelitian. Ekstrak metanol akar mangrove *R. apiculata* menunjukkan aktivitas antibakteri tertinggi dengan diameter zona hambat 8,3 mm pada konsentrasi 500 µg/well dengan masa inkubasi selama 48 jam terhadap bakteri *S. aureus* (Usman,

Formatted: Superscript

Comment [EHH5]: Genus apa?

2017).

Berdasarkan penelitian terdahulu yang menyebutkan bahwa seluruh bagian tumbuhan mangrove terbukti memiliki sifat antibakteri, tetapi belum ada penelitian yang membandingkan efektifitas dari masing-masing bagian mangrove dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio* penyebab penyakit udang. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efektivitas ekstrak daun, batang, dan akar tumbuhan mangrove *R. apiculata* dalam menghambat pertumbuhan *Vibrio. parahaemolyticus* penyebab penyakit vibriosis pada udang vaname.

## MATERI DAN METODE

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2021 sampai bulan Juni 2021 bertempat di Laboratorium Budidaya Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

### Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian yaitu mangrove *R. hizophora apiculata* bagian akar, batang, daun, media *tryptic soy agar* (TSA), media *tryptic soy broth* (TSB), media *thiosulfate citrate bile sucrose* (TCBS), alkohol, aquades, metanol, bakteri *Vibrio parahaemolyticus*, air laut, udang vaname PL 9, dan kotrimoksazol.

### Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan yakni Rancangan Acak lengkap

(RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan dan 3 ulangan untuk menguji kemampuan bagian dari mangrove dalam menghambat pertumbuhan *V. parahaemolyticus*.

Perlakuan tersebut adalah:

Perlakuan A: Kontrol positif (larutan

pembanding Kotrimoksazol 10 mg)

Perlakuan B: kontrol negatif (aquades)

Perlakuan C: ekstrak akar mangrove

Perlakuan D: ekstrak batang mangrove

Perlakuan E: ekstrak daun mangrove

### Prosedur penelitian

#### Ekstraksi Mangrove

Ekstraksi mangrove dilakukan dengan metode maserasi (Wardani *et al.*, 2012). Bagian yang digunakan adalah akar, batang, dan daun. Bahan tersebut dicuci sampai bersih kemudian dikeringkan dengan cara dikering-anginkan pada suhu ruangan tanpa bantuan cahaya matahari. Selanjutnya daun dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan saringan sampai didapatkan bubuk halus. Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam 100g bubuk bagian akar, batang, dan daun mangrove dengan penambahan larutan metanol 96% sebanyak 500 ml selama 24 jam. Kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan dievaporasi menggunakan vacuum evaporator supaya didapatkan ekstrak yang siap digunakan.

#### Pembuatan Larutan Kontrol

Larutan antibiotik pembanding (kontrol positif) yaitu Kotrimoksazol 10 mg yang dilarutkan dalam 10 ml aquades

**Comment [EHH8]:** Berapa konsentrasi masing2 bagian mangrove yang digunakan dalam uji?

**Comment [EHH6]:** Di bagian pendahuluan ditambahkan beberapa riset daun mangrove *R. apiculata* pada pathogen ikan dan udang. Banyak sekali yang sdh meneliti.

**Comment [EHH9]:** Ditambahkan detail abstrak konsentrasinya.

**Comment [EHH10]:** Ukuran?

**Comment [EHH7]:** Dicantumkan merknya untuk semua media agar yang digunakan

**Comment [EHH11]:** Berapa tingkat viskositas ekstrak??

sehingga didapatkan larutan kotrimoksazol dengan konsentrasi 1 mg/mL (Pratiwi, 2008). Kontrol negatif menggunakan larutan aquades steril??.

### Analisis Fitokimia

Analisis dilaksanakan di laboratorium kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis yang dilakukan yaitu menganalisis adanya senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid, steroid, dan saponin dalam ekstrak akar, daun, dan batang mangrove.

### Penyiapan Bakteri Uji

Bakteri uji yang akan digunakan pada penelitian ini adalah biakan murni *V. parahaemolyticus* yang berasal dari BKIPM (Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan) Lampung. Biakan/isolat murni di inokulasi ke media TCBS (*Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose*) yang telah disiapkan pada cawan petri. Isolat *V. parahaemolyticus* pada media TCBS diambil dari koloni tunggalnya, lalu di inokulasi ke media TSB dengan bantuan jarum ose. Bakteri selanjutnya diletakkan pada permukaan media TSA untuk di uji daya hambat.

### Uji Aktivitas Antibakteri

Tahap pertama dilakukan uji daya hambat ekstrak mangrove terhadap bakteri *V. parahaemolyticus* menggunakan metode Kirby-Bauer yang mengacu pada penelitian Tampemawa (2016), yaitu metode difusi

dengan menggunakan kertas cakram. Biakan bakteri *V. parahaemolyticus* dipindahkan secara aseptik sebanyak 20 µL dari media TSB dengan kepadatan 10<sup>9</sup> CFU/mL ke media TSA lalu diratakan dengan spreader. Kertas cakram dimasukkan ke dalam ekstrak mangrove dengan konsentrasi 500 mg/L yang telah direndam selama 15 menit. Kontrol positif dilakukan dengan memberikan kertas cakram yang direndam antibiotik, sedangkan kontrol negatif berupa kertas cakram netral (hanya diberi aquades). Kertas cakram yang telah direndam kemudian diangkat menggunakan pinset steril dan dipindahkan secara aseptik pada permukaan media TSA, setelah itu diinkubasi pada suhu 40°C selama 24 jam. Pengujian daya hambat ekstrak mangrove terhadap bakteri *V. parahaemolyticus* dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Zona bening yang terbentuk setelah masa inkubasi diukur dengan menggunakan jangka sorong.

### Uji Dosis Terbaik

Pengujian ini dilakukan setelah pengujian daya hambat ekstrak mangrove terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*. Ekstrak yang menghasilkan daya hambat paling besar dilakukan pengujian dosis menggunakan konsentrasi berbeda. Sebanyak 20 µL isolat cair *V. parahaemolyticus* dengan kepadatan 10<sup>7</sup> CFU/mL ditetaskan pada media TSA lalu diratakan dengan spreader. Setelah itu, kertas cakram diletakkan di atas permukaan media

Comment [EHH13]: Dimasukkan atau direndam brp lama?

Comment [EHH14]: Ditambahkan dalam metode awal

Comment [EHH12]: Ditambahkan bahan

Comment [EHH15]: Bagian apay g diuji lanjut??



yang berisi olesan bakteri dengan sedikit ditekan. Direndam kertas cakram ke dalam ekstrak daun mangrove *R. apiculata* dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600, dan 700 mg/L selama 15 menit. Kontrol positif dengan memberikan kertas cakram berisi Kotrimoksazol sedangkan kontrol negatif berupa kertas cakram yang diberi aquades. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam. Kemudian diamati dan diukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram tersebut.

### Uji Toksisitas

Uji toksisitas merupakan uji hayati yang digunakan untuk menentukan tingkat toksisitas dari suatu zat atau bahan pencemar. Suatu senyawa kimia bersifat racun jika senyawa tersebut menimbulkan kematian. Parameter yang diamati untuk mengetahui tingkat toksisitas ekstrak terbaik antara akar, batang, dan daun mangrove *R. apiculata* terhadap udang vaname dengan ukuran PL 9. Sampel yang akan di uji toksisitas adalah menggunakan dosis 100, 200, 300, 400 dan 500 mg/L. Udang sebanyak 20 ekor dimasukkan ke dalam wadah uji yang berisi 300 ml air laut yang bercampur dengan ekstrak. Diamati pada 6 jam pertama, jam ke-12, ke-18 dan ke-24, kemudian dihitung jumlah udang yang hidup dan mati dari tiap perlakuan. Perhitungan dengan log konsentrasi sebagai sumbu X terhadap mortalitas sebagai sumbu Y. Nilai  $LC_{50}$  merupakan konsentrasi dimana zat menyebabkan kematian 50% yang diperoleh

dengan memakai persamaan regresi linier  $y = a + bx$ . Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai  $LC_{50} < 1000$  mg/L (Juniarti *et al.*, 2009).

### Parameter yang diamati

Analisis fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, terpenoid dan steroid.

Perbandingan zona hambat disajikan dalam tabel dan gambar. Perhitungan efektivitas antibakteri konsentrasi ekstrak mangrove terhadap antibiotik dihitung berdasarkan persamaan (Tangapo, 2005), yaitu:

$$E = (D/Da) \times 100\%$$

Keterangan:

E : efektivitas antibakteri (%)

D : diameter zona hambat ekstrak tumbuhan mangrove (mm)

Da : diameter zona hambat antibiotik (mm)

Berdasarkan kategori zona hambat menurut Davis dan Stout (1971), penilaian zona hambat digolongkan menjadi tidak memiliki zona hambat, zona hambat lemah (<5mm), zona hambat sedang (5-10 mm), zona hambat kuat (11-20 mm), dan zona hambat sangat kuat (21-30 mm).

Hasil pengamatan dosis terbaik ekstrak mangrove *R. apiculata* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

**Comment [EHH16]:** Apakah data diperoleh di uji secara statistic?

## Uji Aktivitas Antibakteri

### Analisis Data

Data hasil uji in vitro pada semua perlakuan berupa data zona hambat dan data perlakuan dosis berbeda dianalisis menggunakan ANOVA. Apabila hasilnya berbeda nyata dilakukan uji lanjut Duncan dan hasil analisis fitokimia yang terdapat pada ekstrak dianalisis secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Analisis Fitokimia pada Ekstrak Mangrove

Berdasarkan uji fitokimia yang telah dilakukan, senyawa yang terkandung dalam ekstrak akar, batang, dan daun mangrove *R. apiculata* adalah senyawa saponin, steroid, terpenoid, tanin, alkaloid, dan flavonoid. Hasil uji fitokimia ekstrak dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisis fitokimia ekstrak mangrove *R. apiculata*

No	Senyawa aktif	Sumber Senyawa		
		Akar	Batang	Daun
1	Saponin	+	+	+
2	Steroid	-	+	+
3	Terpenoid	+	-	-
4	Tanin	+	+	+
5	Alkaloid	+	+	-
6	Flavonoid	+	+	+

Keterangan:

(+): Teridentifikasi senyawa aktif

(-): Tidak teridentifikasi senyawa aktif

Daya hambat ekstrak akar, batang, dan daun mangrove terhadap pertumbuhan bakteri ditunjukkan dari diameter zona bening yang terbentuk setelah diinkubasi selama 24 jam. Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak akar, batang, dan daun mangrove *R. apiculata* terhadap pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* setelah diinkubasi selama 24 jam disajikan pada Tabel 2 di bawah ini:

Formatted Table

Tabel 2. Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak mangrove *R. apiculata* terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*

No	Perlakuan (Konsentrasi 500 mg/L)	Diameter Hambat (mm)	Zona	Kriteria Hambat
1	Kontrol Negatif (Akuades steril)	0,0 ± 0,00 <sup>a</sup>		Tidak ada
2	Kontrol Positif (Kotrimoksazol)	18,3 ± 0,38 <sup>c</sup>		Kuat
3	Akar Mangrove	2,5 ± 0,20 <sup>b</sup>		Lemah
4	Batang Mangrove	2,9 ± 0,27 <sup>b</sup>		Lemah
5	Daun Mangrove	2,7 ± 0,20 <sup>b</sup>		Lemah

menghambat *Vibrio parahaemolyticus*.

Tabel 2 menunjukkan bahwa hasil pengukuran rata-rata zona hambat yang dibentuk oleh setiap perlakuan ekstrak mangrove *R. apiculata* yaitu pada ekstrak akar mangrove memiliki rata-rata zona hambat sebesar 2,5 ± 0,2 mm, pada ekstrak batang mangrove memiliki rata-rata zona hambat sebesar 2,9 ± 0,27 mm, dan ekstrak daun mangrove memiliki rata-rata zona hambat sebesar 2,7 ± 0,2 mm. Berdasarkan analisis statistik ANOVA diperoleh nilai signifikan P < 0,05 yang menunjukkan adanya perbedaan pengaruh dari perlakuan. Pada saat dilakukan uji lanjut menggunakan uji Duncan, hasil uji kontrol negatif berbeda nyata terhadap kontrol positif, berbeda nyata terhadap sampel akar, batang, dan daun mangrove. Hasil uji kontrol positif berbeda nyata terhadap kontrol negatif, berbeda nyata terhadap sampel akar, batang, dan daun mangrove. Pada sampel akar, batang, dan daun mangrove tidak berbeda nyata sehingga dapat disimpulkan bahwa akar, batang, dan daun mangrove *R. apiculata* memiliki kemampuan yang sama dalam

Berdasarkan kategori zona hambat menurut Davis dan Stout (1971), ekstrak metanol akar, batang, dan daun mangrove *R. apiculata* memiliki daya hambat lemah terhadap bakteri uji karena memiliki rata-rata diameter di bawah 5 mm. Kontrol positif termasuk pada kategori daya hambat kuat karena rata-ratanya di antara 10 sampai 20 mm, sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan daya hambat terhadap bakteri uji. Pada aquades tidak terbentuk zona bening karena merupakan air murni yang tidak mengandung senyawa aktif sebagai antibakteri.

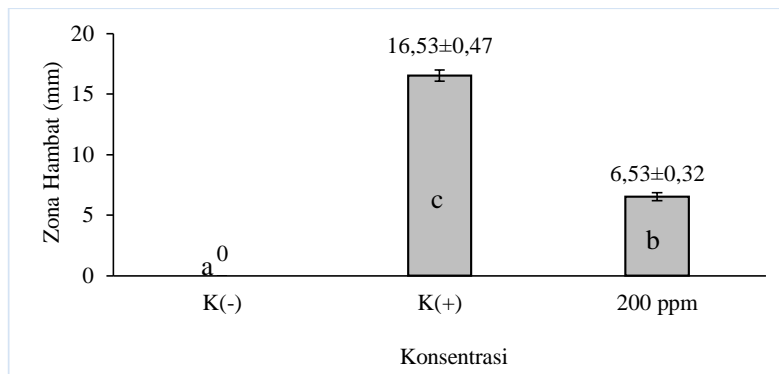
Uji efektivitas antibakteri pada penelitian ini diperoleh dari membandingkan daya hambat ekstrak dengan daya hambat dari kontrol positif. Hasil perhitungan efektivitas antibakteri ekstrak mangrove *R. apiculata* terhadap pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* disajikan dalam Tabel 3.

**Comment [EHH17]:** Berapa diameter antibacterial disc yang digunakan? Bagaimana pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk? Ini diameter zona hambat yang terbentuk kecil sekali

Tabel 3. Efektivitas antibakteri ekstrak mangrove *R. apiculata* terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*

No	Perlakuan	Efektivitas Antibakteri (%)
1	Akar Mangrove	13,66± 0,115
2	Batang Mangrove	15,85± 0,129
3	Daun Mangrove	14,75± 0,136

### Perbandingan Dosis Terbaik Ekstrak Mangrove



Keterangan: nilai merupakan rata-rata plus minus dari 3 kali ulangan. Perbedaan huruf superscript menunjukkan beda nyata dari uji dosis terbaik ekstrak batang mangrove *R. apiculata* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* pada tingkat kepercayaan 95%.

Gambar 1. Hasil pengamatan dosis terbaik ekstrak batang mangrove *R. apiculata* dalam menghambat bakteri *V. parahaemolyticus*

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan bahwa pada gambar 1 kontrol negatif menggunakan aquades tidak membentuk zona hambat, sehingga rata-rata zona hambatnya 0. Kontrol positif menggunakan kotrimoksazol memiliki rata-rata zona hambat sebesar 16,53 ±0,47 mm. Pada uji

Berdasarkan hasil uji perbandingan efektivitas ekstrak metanol akar, batang, dan daun mangrove *R. apiculata* di peroleh hasil nilai efektivitas tertinggi berasal dari ekstrak metanol batang mangrove. Berikut ini disajikan hasil pengamatan dosis terbaik ekstrak mangrove *R. apiculata* dalam menghambat bakteri *V. parahaemolyticus* pada Gambar 1 :

dosis terbaik ekstrak batang mangrove ini diperoleh hasil bahwa pada dosis 200 ppm memiliki zona hambat terbesar dengan rata-rata zona hambat yang diperoleh sebesar 6,53±0,32 mm. Hasil analisis statistik Anova menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

### Uji Toksisitas

**Comment [EHH18]:** Pastikan penulisan

Dalam pencegahan efek toksik dari ekstrak mangrove *R. apiculata* terhadap larva udang vaname (*L. vannamei*), dilakukan uji toksisitas. Tujuan dari uji ini untuk menentukan ekstrak mangrove dapat diberikan sebagai antibiotik alami

yang bersifat toksik atau tidak terhadap larva udang vaname. Hasil analisis uji toksisitas ekstrak metanol batang mangrove *R. apiculata* disajikan pada Tabel 4 di bawah ini:

Tabel 4. Data hasil uji toksisitas ekstrak batang mangrove *R. apiculata*

Konsentrasi Ekstrak Metanol Batang Mangrove	Mortalitas Benur <i>Litopenaeus vannamei</i>			Mortality	Total	LC <sub>50</sub> (mg/L) 24 jam
	Ulangan I	Ulangan II	% mati			
Kontrol negatif (air laut)	0	0	0%	0	20	
100 mg/L	0	0	0%	0	20	
200 mg/L	1	0	3%	0,5	20	2155,5
300 mg/L	1	2	8%	1,5	20	
400 mg/L	0	0	0%	0	20	
500 mg/L	2	3	13%	2,5	20	

Comment [EHH19]: Penulisan disesuaikan dengan penulisan di awa

Pada kontrol negatif tidak ada kematian pada larva udang vaname dengan nilai mortalitas sebesar 0%. Pada konsentrasi ekstrak metanol batang mangrove 100 mg/L mortalitas larva udang vaname sebesar 0%. Pada konsentrasi 200 mg/L mortalitas larva udang sebesar 0%. Pada konsentrasi 300 mg/L mortalitas larva udang sebesar 3%. Pada konsentrasi 400 mg/L mortalitas larva udang sebesar 0%. Pada konsentrasi 500 mg/L mortalitas larva udang sebesar 13%. Tingkat toksisitas suatu ekstrak yang diukur dengan LC<sub>50</sub> jika nilainya  $\leq 30$  mg/L dikatakan sangat toksik, 31 mg/L–1000 mg/L dikatan toksik, dan LC<sub>50</sub>  $\geq 1000$  mg/L dikatakan tidak toksik (Manullang *et al.*, 2013). Dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 2155,5 mg/L menunjukkan bahwa ekstrak metanol batang mangrove *R. apiculata*

bersifat tidak toksik.

### Pembahasan

Mangrove *R. apiculata* merupakan salah satu dari jenis mangrove yang paling banyak ditemukan di areal pertambakan. Mangrove jenis ini hidup pada substrat berlumpur, dalam, tergenang pada pasang normal, dan memiliki warna kulit kayu abu-abu tua. Akar mangrove ini memiliki ciri khas yang dapat tumbuh hingga ketinggian 5 meter, dan terkadang memiliki akar udara yang keluar dari cabang. Daun *R. apiculata* berbentuk elips menyempit dengan ujung yang meruncing. Setiap helai daun berwarna hijau tua tetapi pada bagian tengah berwarna hijau muda dan bagian bawah berwarna kemerahan. Pada saat pengujian fitokimia yang dilakukan pada bagian akar, batang, dan daunnya,

terdapat senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai antibakteri. Senyawa-senyawa tersebut yaitu saponin, terpenoid, tanin, alkaloid, dan flavonoid. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa hampir semua bagian tanaman *Rhizophora* sp. mengandung senyawa alkaloid, saponin, flavonoid, dan tanin (Rohaeti *et al.*, 2010).

Senyawa-senyawa fitokimia yang terdapat pada ekstrak metanol mangrove memiliki kemampuan antibakteri. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri yaitu membentuk senyawa kompleks yang berisi protein ekstraseluler terlarut yang bertugas untuk merusak membran sel bakteri kemudian diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Ngajow *et al.*, 2013). Pada senyawa tanin, cara kerja antibakterinya yaitu dengan mengerutkan dinding sel atau membran sel kemudian mengganggu sistem permeabilitas sel yang mengakibatkan terhambatnya sistem pertumbuhan bakteri bahkan menimbulkan kematian (Ajizah, 2004). Sistem kerja saponin yaitu mengganggu stabilitas membran sel bakteri yang menyebabkan protein dan asam nukleat keluar dari dalam sel bakteri (Darsana *et al.*, 2012). Mekanisme kerja antibakteri pada senyawa steroid dapat menyebabkan kebocoran pada lisosom bakteri (Madduluri *et al.*, 2011). Pada senyawa alkaloid memiliki fungsi sebagai antibakteri yaitu dapat menghambat

pembelahan sel bakteri dan sintesis asam nukleat bakteri (Cushnie dan Lamb, 2005).

Pada penelitian ini pelarut yang digunakan dalam melarutkan ekstrak mangrove adalah metanol. Pelarut ini dipilih karena dapat melarutkan hampir seluruh senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun nonpolar. Metanol juga mudah menguap sehingga mudah dibebaskan dari ekstrak. Selain itu metanol memiliki harga cenderung lebih murah dibandingkan dengan pelarut organik yang lain. Metanol paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan golongan metabolit sekunder (Dewi dan Usman, 2016).

Pada penelitian ini dilakukan uji pendahuluan berupa uji perbandingan zona hambat ekstrak akar, batang, dan daun mangrove yang bertujuan untuk mengetahui zona hambat terbesar diantara 3 bahan dalam menghambat pertumbuhan *V. parahaemolyticus*. Berdasarkan data yang diperoleh membuktikan bahwa batang mangrove memiliki daya hambat paling besar dibandingkan dengan akar dan daun mangrove. Hal tersebut dikarenakan pada batang mangrove *R. apiculata* memiliki kandungan aktif yang paling penting seperti flavonoid, saponin, dan tanin yang berperan sebagai antibakteri (Darlian *et al.*, 2011). Ekstrak metanol batang mangrove *R. apiculata*

juga memiliki aktivitas antibakteri terhadap *V. parahaemolyticus* dikarenakan adanya senyawa alkaloid yang terkandung dalam ekstrak yang memiliki peran dapat mengganggu penyusunan komponen peptidoglikan pada sel bakteri yang dapat mengakibatkan pembentukan dinding sel tidak sempurna dan senyawa steroid yang dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel terhadap senyawa-senyawa lipofilik yang bersifat impermeabel yang dapat menyebabkan menurunnya integritas membran, berubahnya morfologi membran sel, dan akhirnya dapat menyebabkan membran sel rapuh dan lisis (Bangham dan Horne, 2006). Terbentuknya diameter zona hambat di sekitar kertas cakram merupakan respon alami yang timbul dari bakteri karena sensitif terhadap bahan aktif yang terdapat pada ekstrak mangrove. Hal ini membuktikan bahwa zona bening hanya terbentuk jika terdapat aktivitas antibakteri pada suatu senyawa (Tampemawa, 2016). Sedangkan perbedaan besarnya zona hambat yang terbentuk diakibatkan karena terdapat banyak atau sedikitnya kandungan zat aktif antibakteri yang terkandung di dalamnya, kecepatan difusi bahan antibakteri ke dalam medium agar, kepekatan pertumbuhan antibakteri, reaksi antara bahan aktif dengan medium dan temperatur inkubasi (Dewi dan Usman, 2016).

Pembentukan zona hambat pada media tumbuh bakteri harus disertai dengan kontrol sebagai pembanding. Kontrol merupakan unit/kelompok penelitian yang tidak diberikan perlakuan. Pada penelitian ini, kontrol yang digunakan terdapat 2 macam, yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif yang digunakan yaitu kotrimoksazol, sedangkan pada kontrol negatif berupa akuades steril. Kotrimoksazol merupakan kombinasi dari sulfametoksazol dan trimetoprim dengan perbandingan 5:1 yang memiliki sifat bakterisida yang mampu menghambat bakteri. Trimetoprim sama dengan sulfametoksazol, meskipun daya antibakterinya 20-100 kali lebih kuat dari sulfametoksazol (Mariana dan Setiabudy, 1995).

Berdasarkan hasil analisis statistik efektivitas masing-masing bahan dalam menghambat pertumbuhan *V. parahaemolyticus* menunjukkan bahwa ekstrak batang memiliki nilai efektivitas terbesar diantara ekstrak akar dan daun. Hal ini diduga karena terdapat perbedaan komposisi dan konsentrasi senyawa metabolit sekunder pada ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Nilai toksisitas suatu bahan ekstrak diperoleh dari uji toksisitas ( $LC_{50}$ ) berdasarkan analisis probit. Apabila nilai toksisitas  $<1000$  mg/L berdasarkan analisis probitnya, maka ekstrak tersebut bersifat toksik (tidak direkomendasikan

untuk aplikasi *in vivo*), sebaliknya jika analisis probit pada pengujian toksisitas ekstrak >1000 mg/L maka ekstrak tersebut bersifat tidak toksis (Zainuddin, 2009). Berdasarkan analisis probit dan data, terlihat bahwa hasil uji toksisitas ekstrak metanol batang mangrove *R. apiculata* yang di ujikan pada larva udang vaname (*L. vannamei*) stadia *post larva* 9 pada konsentrasi 100-500 mg/L menghasilkan nilai analisis probit sebesar 2155,5 mg/L hasil tersebut tidak bersifat toksik karena melebihi 1000 mg/L, sehingga dapat direkomendasikan untuk diaplikasikan secara *in vivo*.

### KESIMPULAN

Ekstrak mangrove *R. apiculata* pada bagian akar, batang, dan daun memiliki zat antibakteri alami. Bioaktivitas antibakteri tertinggi terdapat pada bagian batang karena memiliki nilai rata-rata diameter zona sebesar  $2,9 \pm 0,27$  mm. Nilai efektivitas antibakteri ekstrak metanol mangrove *Rhizophora apiculata* dalam menghambat pertumbuhan *Vibrio parahaemolyticus* pada bagian akar sebesar 13,66%, batang sebesar 15,85%, dan daun sebesar 14,75%. Dosis terbaik dari ekstrak batang mangrove *R. apiculata* dalam menghambat bakteri *V. parahaemolyticus* yaitu 200 mg/L.

### DAFTAR PUSTAKA

Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap daun jambu biji (*Psidium guajava* L.).

- Jurnal Bioscientiae*. 1(1): 8-31.
- Bangham, A.D., and R.W. Horne. 2006. Action of saponins on biological cell membranes. *Nature*.196:952-953
- Cushnie T.P. & Lamb A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26(5): 343-56.
- Dai M., Liu, W., Jia, H., Hong, H., Liu, J., Yan, C. 2017. Phosphorus mediation of cadmium stress in two mangrove seedlings *Avicennia marina* dan *Kandelia obovata* differing in cadmium accumulation. *Ecotoxicology dan Environmental Safety*. 139: 272-279.
- Darlihan, L., Imran, G., Fachruddin. 2011. Skrining Bioaktivitas Ekstrak kulit Akar Bakau Merah (*Rhizophora apiculata*) terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Koloni Bakteri *Streptococcus* sp. *Jurnal Progres Kimia Sains*. 1(2): 210549.
- Darsana IGO, Besung INK, Mahatmi H. 2012. Potensi daun binahong (*Anredera cordifolia*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli in vitro*. *Jurnal Indonesia Medicus Veterinus*. 1(3): 337-351.
- Davis, W. W. dan T. R. Stout. 1971. Disc plate methods of microbiological antibiotic assay. *Microbiology* 22: 659-665.
- Defoirdt, T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Van de Wiele, T., Sorgeloos, P., Bossier, P. Verstraete, W. 2007. The bacterial storage compound of Poly b-hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environ Microbial*. 9(2): 445-452.
- Dewi, E. R. O., & Usman, U. 2016. Uji fitokimia dan uji antibakteri dari akar mangrove *Rhizophora apiculata* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Proceeding of Mulawarman*



- Pharmaceuticals Conferences*. 3(2): 183-193.
- Haditomo, A. H. C., Djunaedi, A., Prayitno, S. B. 2018. The diversity of vibrios associated with vibriosis in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from extensive shrimp pond in Kendal District, Indonesia. *In IOP Conference Series: Earth dan Environmental Science*. 116(1): 012011.1-012011.7.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Edisi kedua, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soedira, ITB Press. Bandung. 354 hal.
- Mariana, Y. & Setiabudy, R. 1995. Sulfonamid, kotrimoksazol dan antiseptik saluran kemih. *Farmakologi Dan Terapi (Sulfonamides, Cotrimoxazole dan Urinary Tract Antiseptic)*. 584-596.
- Ngajow, M., Abidjulu, J., Kamu, V.S. 2013. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Jurnal MIPA Universitas Sam Ratulangi*. 2(2): 128-132.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Penerbit Erlangga. Jakarta. 220 hal.
- Rohaeti, E., Batubara, I., Lieke, A., Darusman, L. K. 2010. Potensi ekstrak *Rhizophora* sp. sebagai inhibitor tirosinase. *Prosiding Semnas Sains III*. IPB, Bogor. 196-201.
- Sipayung, B. S., Ma'ruf, W. F., Dewi, E. N. 2015. Pengaruh senyawa bioaktif buah mangrove *Avicennia marina* terhadap tingkat oksidasi fillet ikan nila merah *Oreochromis niloticus* selama penyimpanan dingin. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*. 4(2):115-123.
- Supono, Wardiyanto, Harpeni E., Khotimah A. K., Ningtyas A., 2019 Identification of *Vibrio* sp. as a cause of white feces diseases in white shrimp *Penaeus vannamei* and handling with herbal ingredients in East Lampung Regency, Indonesia. *AACL Bioflux* 12(2):417-425.
- Supono. 2021. Current status of technical and economic analysis of inland shrimp culture in Lampung Province, Indonesia. *AACL Bioflux* 14(1):218-216.
- Susanti, S B. Prayitno, Sarjito. 2016. Penggunaan ekstrak daun bakau (*Rhizophora apiculata*) untuk pengobatan kepiting bakau (*scylla serrata*) yang diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi* terhadap kelulushidupan. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 5 (2): 18-25.
- Tampemawa, P. V. 2016. Uji efektivitas ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa* l.) terhadap bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*. *Pharmacon*. 5(1): 308-320.
- Tangapo, A.M. 2005. *Efektivitas Antibakteri Ekstrak Tumbuhan Daun Sendok (Plantago major) terhadap Staphylococcus aureus dan Pseudomonas aeruginosa*. Skripsi. Universitas Sam Ratulangi. Manado.
- Usman. 2017. Uji fitokimia dan uji antibakteri dari akar mangrove *Rhizophora apiculata* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kimia Dan Pendidikan Kimia*. 2(3): 169 -177.
- Wardani, R.K., Wahyu T., Budi S.R. 2012. Uji efektivitas ekstrak daun sirih merah (*Piper rocatum*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*. *Jurnal Ilmiah dan Kelautan*. 4: 59-64.
- Wyban J. A., Sweeney J. N., 1991 Intensive shrimp production technology: The Oceanic Institute shrimp manual. The Ocean Institute Honolulu, Hawaii, 158 pp
- Zainuddin, E. N. & A.C. Malina. 2009. Skrining rumput laut komersil asal Sulawesi Selatan sebagai antibiotik melawan bakteri patogen pada ikan.

Penelitian Research Grant, Biaya  
IMHERE-DIKTI

Beberapa catatan :

1. Perhatikan penulisan huruf latin
2. Tulis urutan atau tahapan penelitian yang digunakan dan hasil dari tiap tahapan riset yang digunakan untuk tahap selanjutnya.

**Formatted:** Numbered + Level: 1 +  
Numbering Style: 1, 2, 3, ... + Start  
1 + Alignment: Left + Aligned at: 0  
cm + Indent at: 1,27 cm