

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penelitian Pendahuluan

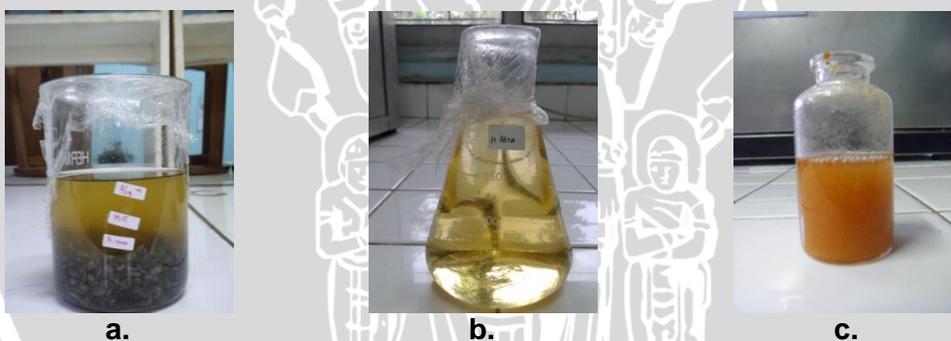
Tahap penelitian pendahuluan dibagi menjadi 4, yaitu : (1) ekstraksi senyawa yang terdapat pada *H. atra*, (2) uji fitokimia untuk mengetahui senyawa-senyawa pada *H. atra* yang diduga memiliki potensi sebagai antibakteri, (3) isolasi ekstrak *H. atra* dengan metode kromatografi kolom, dan (4) uji daya hambat fraksi-fraksi kromatografi kolom dengan variasi konsentrasi terhadap bakteri *V. cholerae*. Apabila diketahui pada penelitian pendahuluan sampel *H. atra* memiliki potensi sebagai antibakteri, penelitian akan dilanjutkan untuk mengetahui fraksi dan konsentrasi terbaik penghambatan pertumbuhan *V. cholerae* serta identifikasi senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri.

4.1.1 Ekstraksi *Holothuria atra*

Teripang hitam (*Holothuria atra*) segar dengan berat 500 gr setelah disiangi dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan memiliki berat konstan 400 gr. Terjadi pengurangan bobot ini dikarenakan komposisi air di dalam tubuh *H. atra* segar yang banyak. Selanjutnya daging teripang melalui tahap ekstraksi. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi tunggal menggunakan pelarut metanol. Penggunaan metanol juga dilakukan dalam penelitian Ismail *et al.*, (2008), Rasyid (2012), Albuntana *et al.*, (2011), dan Pranoto *et al.*, (2012), dalam mengisolasi senyawa-senyawa bioaktif pada beberapa spesies teripang. Pelarut metanol mengalami perubahan warna saat maserasi dari bening menjadi coklat keruh (**Gambar 5**). Ini menandakan senyawa-senyawa bioaktif yang terdapat pada *H. atra* kemungkinann tertarik keluar oleh pelarut metanol. Menurut Setyohadi, *et al.*, (2013), pada proses maserasi akan terjadi pemecahan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel, sehingga

metabolit sekunder yang ada dalam simplisia akan terlarut dalam pelarut. Pelarut yang mengalir ke dalam simplisia dapat menyebabkan membengkak dan bahan kandungan bioaktif akan larut sesuai dengan kelarutannya.

Setelah proses maserasi, dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas Whatman No.1 sehingga didapatkan filtrat. Filtrat hasil maserasi yang diperoleh berwarna kuning keemasan (**Gambar 5**). Filtrat kemudian dibebaskan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* vakum pada suhu 40° C dan kecepatan putaran 100 rpm. Agar seluruh pelarut hilang, hasil pemekatan menggunakan *rotary evaporator* vakum kemudian di panaskan kembali pada suhu 40° C di dalam waterbath. Diperoleh ekstrak kasar berupa cairan pekat berwarna jingga yang berbau amis dan asam (**Gambar 5**). Berat akhir ekstrak kasar sebesar 16,87 gr sehingga diperoleh % rendemen sebesar 4,21 % (**Lampiran 1**).



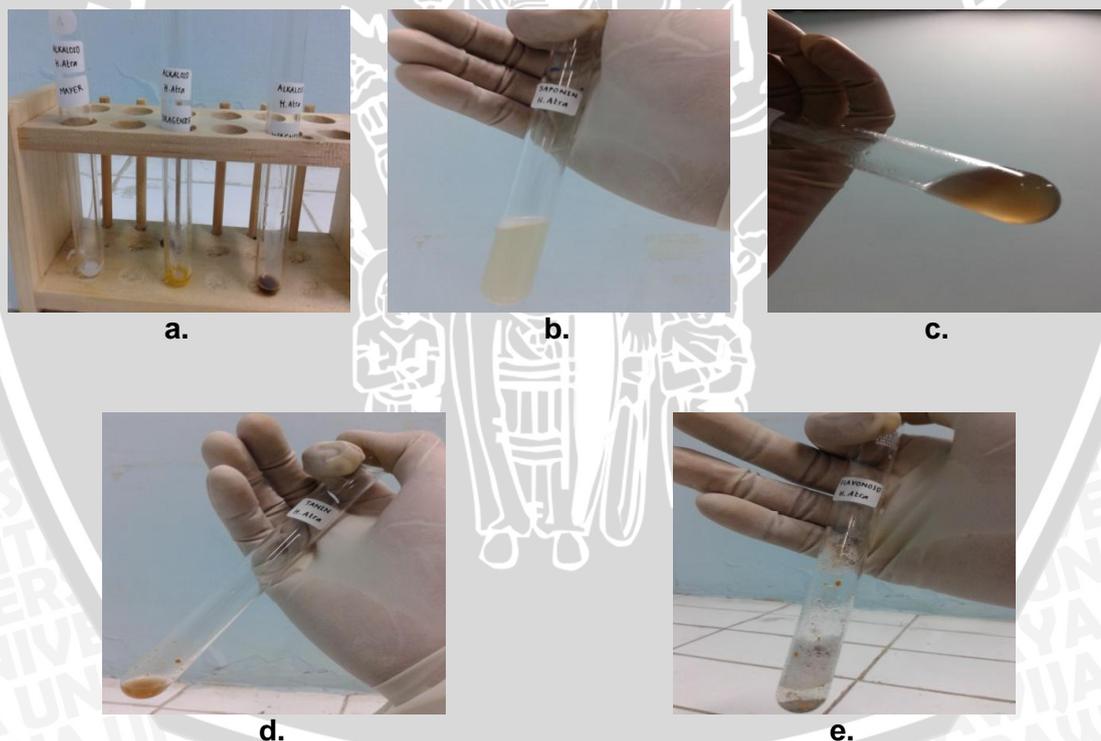
Gambar 1 Ekstraksi *H. atra* : a.) proses maserasi, b.) filtrat hasil maserasi dan c.) ekstrak kasar

4.1.2 Uji Fitokimia Ekstrak Metanol *Holothuria atra*

Pengujian fitokimia merupakan uji kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder yang diduga terkandung didalam *H. atra*. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, saponin, steroid/triterpenoid, flavonoid dan tanin. Tahap ini akan menentukan perlakuan

selanjutnya dalam penentuan metode isolasi dan pemurnian senyawa pada *H. atra*.

Hasil uji fitokimia menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam tubuh *H. atra* (**Gambar 6**). Senyawa-senyawa yang terdeteksi antara lain alkaloid, saponin dan triterpenoid, sedangkan senyawa tanin dan flavonoid tidak terdeteksi (**Tabel 3**). Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Septiadi *et al.*, (2013), Pranoto *et al.*, (2012), Nimah *et al.*, (2012), Inayah *et al.*, (2012), dan Rasyid (2012) yang berhasil mengisolasi alkaloid, saponin dan sterol/triterpenoid pada teripang. Tidak terdeteksinya flavonoid dan tanin dikarenakan jenis senyawa metabolit sekunder ini sebagian besar terdapat pada jenis tumbuh-tumbuhan.



Gambar 2 Uji Fitokimia Ekstrak Metanol *H. atra* : a.) alkaloid, b.) saponin, c.) triterpenoid, d.) tanin, dan e.) flavonoid

Tabel 1 Uji Fitokimia Ekstrak Metanol *H. atra*

Uji	Hasil	Reaksi
Alkaloid		
• Pereaksi Mayer	+	Terdapat endapan putih
• Pereaksi Wagner	+	Terdapat endapan coklat
• Pereaksi Dragendroff	+	Terdapat endapan jingga
Saponin	+	Masih terdapat buih setelah ditetesi HCl 2N
Steroid/Triterpenoid	+	Terbentuk warna coklat keunguan yang menandakan adanya triterpenoid
Tanin	-	Tidak terbentuk warna biru kehitaman
Flavonoid	-	Tidak terbentuk warna merah atau jingga

Hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih (Mayer), coklat (Wagner), dan jingga (Drangedroff). Robinson (1995), menjelaskan bahwa pereaksi Mayer (kalium tertraiodomerkurat) merupakan pereaksi yang banyak digunakan dalam mendeteksi alkaloid karena pereaksi ini dapat mengendapkan hampir seluruh alkaloid yang terdapat pada sampel. Menurut Gholib (2009), alkaloid merupakan senyawa yang dapat berperan sebagai antimikroba, dimana senyawa ini dapat menghambat esterase, DNA dan RNA polimerase serta menghambat respirasi sel bakteri. Sedangkan menurut Lamothe (2009), senyawa alkaloid dalam menghambat pertumbuhan bakteri diprediksi melalui penghambatan sintesis dinding sel yang kemudian menyebabkan lisis pada sel bakteri.

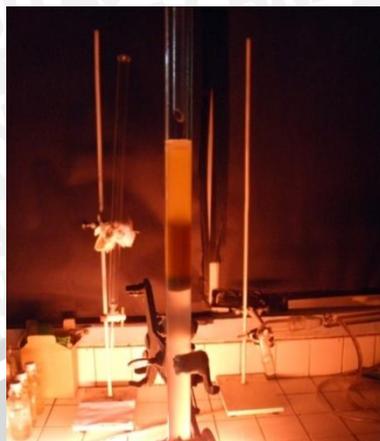
Terdeteksinya saponin ditentukan dengan terbentuknya busa dengan tinggi 1-10 cm dan apabila ditetesi dengan HCl 2N busa tidak hilang maka dapat dinyatakan positif saponin. Saponin merupakan senyawa yang memiliki potensi sebagai antimikroba alami. Menurut Hardiningtyas (2009), saponin dapat berinteraksi dengan membran sterol sehingga terjadi pelepasan protein dan enzim dari dalam sel bakteri. Selain itu saponin berperan dalam menurunkan tegangan permukaan membran sterol dari dinding sel jamur sehingga permeabilitasnya meningkat.

Positif triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya cincin coklat keunguan setelah ditetesi dengan asam sulfat pekat. Triterpenoid merupakan turunan dari senyawa terpenoid seperti halnya saponin dan steroid. Triterpenoid memiliki potensi sebagai antijamur, antibakteri dan sitotoksik. Han *et al.*, (2008), berhasil mengisolasi dan memurnikan triterpen glikosida menjadi senyawa holothurin yang bersifat toksik terhadap bakteri dan jamur. Ditambahkan oleh Bordbar *et al.*, (2011), teripang kaya akan triterpen glikosida seperti holothurin A dan B dan menunjukkan aktivitas antijamur terhadap 20 jenis jamur secara *in vitro*. Roihanah *et al.*, (2012) menjelaskan bahwa triterpenoid mampu merusak membran sel, menonaktifkan enzim dan mendenaturasi protein sehingga dinding sel mengalami kerusakan. Perubahan permeabilitas membran sitoplasma memungkinkan ion-ion organik dapat masuk ke dalam sel dan berakibat terhambatnya pertumbuhan atau bahkan dapat mematikan sel bakteri.

4.1.3 Isolasi Ekstrak Metanol *Holothuria atra* dengan Kromatografi Kolom

Isolasi pada penelitian ini bertujuan untuk memisahkan dan memurnikan senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak kasar *H. atra*. Substansi campuran senyawa akan dipisahkan menjadi komponen-komponen senyawa yang lebih kompleks. Pemisahan yang dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom dan diperkuat dengan kromatografi lapis tipis.

Dalam kromatografi kolom digunakan fase diam *silica gel* GF₂₅₄ dan fase gerak klorofom:metanol:air (8:2:1-6,5:3,5:1). Penggunaan fase gerak dilakukan secara bertahap dalam hal konsentrasi campuran (klorofom:metanol:air) dengan tujuan senyawa-senyawa yang memiliki perbedaan kepolaran akan bergerak keluar secara bergantian sesuai dengan kepolarannya. Proses pemisahan dan pemurnian dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada **Gambar 7**.



Gambar 3 Kromatografi Kolom Ekstrak Metanol *H. atra*

Fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom selanjutnya diuji dengan kromatografi lapis tipis untuk mengetahui senyawa-senyawa dari masing-masing fraksi. Fase diam pada KLT berupa plat *silica gel* berukuran panjang 5 cm dan lebar 1 cm. Fase gerak yang digunakan berupa campuran n-heksan dan aseton dengan perbandingan 7:3. Tiap fraksi yang diperoleh pada kromatografi kolom ditotolkan pada titik awal plat KLT kemudian di rendam dalam bejana berisi fase gerak. Noda yang terbentuk kemudian disemprot dengan pereaksi semprot H_2SO_4 (15%) dalam etanol. Plat KLT selanjutnya dipanaskan sampai tampak noda yang jelas. Noda-noda yang terbentuk dari tiap fraksi dikelompokan berdasarkan warna dan nilai R_f yang diperoleh. Hasil dari isolasi dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 2 Fraksi-Fraksi Ekstrak Metanol *H. atra* Hasil Kromatografi Kolom

No Botol	Warna	R_f	Warna*	Fraksi
1	Jingga	0,51	Coklat	A
2	Jingga tua	0,51	Coklat	
3	Jingga tua	0,51;0,6	Coklat	
4	Jingga tua	0,51;0,6	Coklat	
5	Jingga	0,51	Coklat	
6	Jingga	0,51	Coklat	
7	Jingga being	0,51	Coklat	B
8	Jingga bening	0,51	Coklat	
9	Kuning	0,57	Coklat	
10	Kuning bening	0,57	Coklat	
11	Kuning bening	0,57	Coklat	
12	Kuning bening	0,57	Coklat	

Tabel 3 (lanjutan) Fraksi-Fraksi Ekstrak Metanol *H. atra* Hasil Kromatografi Kolom

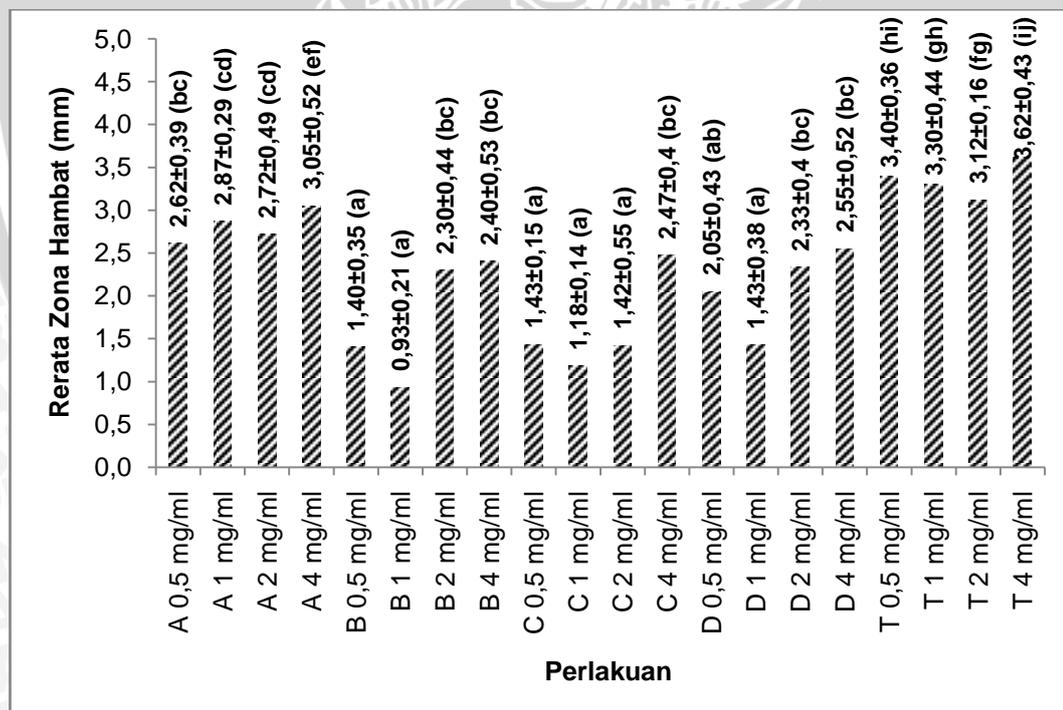
No Botol	Warna	KLT		Fraksi	
		Rf	Warna*		
13	Bening	0,23	Coklat	C	
14	Bening	0,23	Coklat		
15	Kuning Bening	0,23	Coklat		
16	Bening	0,23	Coklat		
17	Bening	0,23	Coklat		
18	Jingga bening	0,08	Ungu		D
19	Jingga bening	0,08	Ungu		
20	Kuning bening	0,08	Coklat		
21	Kuning bening	0,08	Coklat		
22	Bening	0,14	Coklat		
23	Bening	0,08	Coklat		
24	Bening	0,08	Coklat		
25	Kuning bening	0,08	Coklat		
26	Kuning bening	0,14	Coklat		
27	Bening	0,08	Coklat		
28	Bening	0,08	Coklat		
29	Bening	0,08	Coklat		
30	Bening	0,08	Coklat		
31	Bening	0,08	Coklat		
32	Bening	0,14	Coklat		

* Pereaksi semprot H₂SO₄

Hasil kromatografi lapis tipis (**Lampiran 3**) menunjukkan secara keseluruhan nilai Rf yang diperoleh yaitu 0,08, 0,14, 0,23, 0,51, 0,57, dan 0,60. Kromatografi kolom menghasilkan 32 botol fraksi kecil (5 ml/botol). Fraksi no 1-8 setelah dilakukan KLT menghasilkan warna coklat dan nilai Rf sebesar 0,51 dan 0,6. Fraksi-fraksi ini dikelompokkan menjadi fraksi besar yaitu fraksi A. Fraksi no 9-12 pada KLT menghasilkan warna coklat dan nilai Rf 0,57. Selanjutnya fraksi-fraksi ini dikelompokkan menjadi fraksi B. Fraksi no 13-17 dikelompokkan menjadi fraksi B karena memiliki kesamaan warna coklat dengan nilai Rf 0,23. Fraksi D diperoleh dari botol no 18-32 dengan warna coklat dan ungu serta nilai Rf 0,08 dan 0,14. Dari pengelompokan hasil kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis dihasilkan 4 fraksi besar yaitu fraksi A, B, C, dan D. Fraksi-fraksi besar ini yang akan diuji aktivitas antibakteri untuk menentukan fraksi yang paling aktif.

4.1.4 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi-Fraksi *Holothuria atra* terhadap Bakteri *Vibrio cholerae*

Pengujian aktivitas antibakteri dalam penelitian menggunakan bakteri gram negatif yaitu *Vibrio cholerae*. Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi cakram. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini dibuat bervariasi dengan pembanding kontrol positif antibiotik *tetrasiklin*. Masing-masing fraksi besar hasil kromatografi kolom dan kontrol positif dibuat seri konsentrasi yaitu 0,5, 1, 2, dan 4 mg/ml. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui dan menentukan fraksi teraktif dan konsentrasi optimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. cholerae* jika dibandingkan dengan kontrol positif antibiotik *Tetrasiklin*. Histogram uji daya hambat penelitian pendahuluan dapat dilihat pada **Gambar 8**.



Keterangan : perlakuan yang memiliki notasi sama menandakan tidak berbeda nyata, perlakuan yang memiliki notasi berbeda menandakan berbeda nyata.

Gambar 4 Histogram Rerata Hasil Zona Hambat dan Hasil Uji BNT 5 % Fraksi-Fraksi *H. atra*

Berdasarkan data yang diperoleh pada uji daya hambat penelitian pendahuluan dapat diketahui semua fraksi yang diuji memiliki potensi sebagai antibakteri, ini dibuktikan dengan adanya zona bening yang dihasilkan dari semua fraksi. Rata-rata zona hambat terkecil dari fraksi yang diuji terdapat pada fraksi B dengan konsentrasi 1 mg/ml yaitu sebesar $0,93 \pm 0,21$ mm. Sedangkan rata-rata zona hambat terbesar dimiliki oleh fraksi A dengan konsentrasi 4 mg/ml yaitu sebesar $3,05 \pm 0,52$ mm.

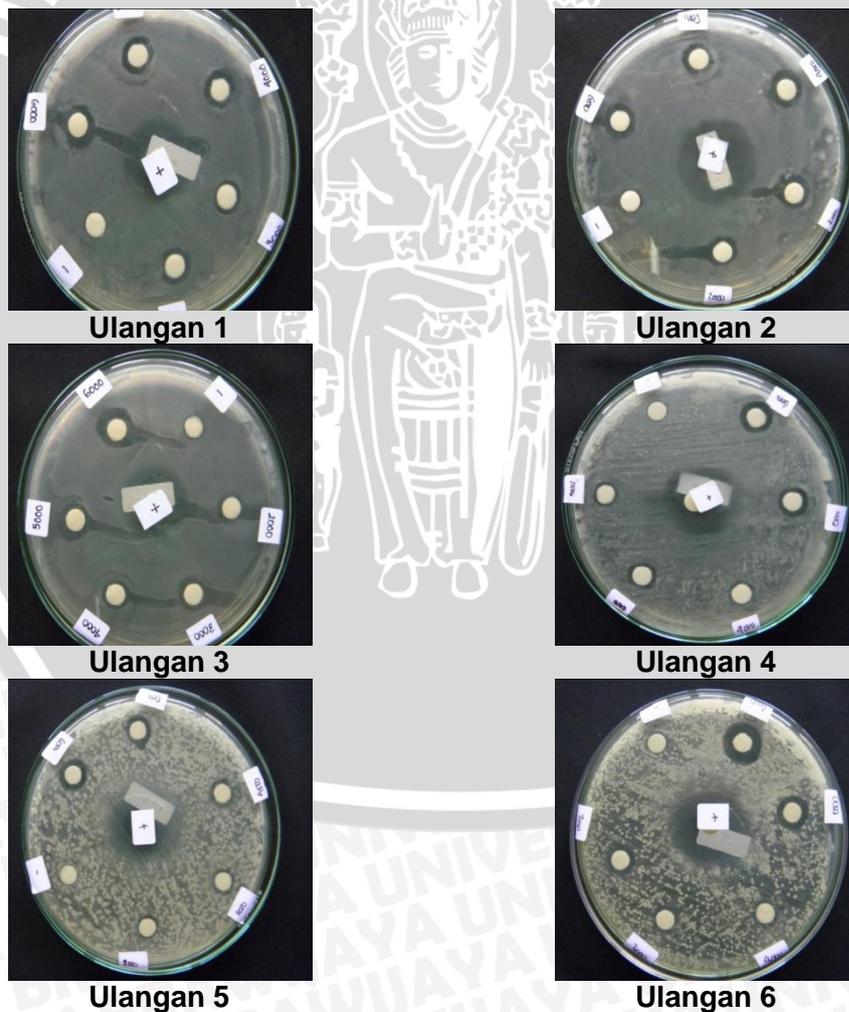
Data dari hasil uji ANOVA dua arah penelitian pendahuluan (**Lampiran 4**) antara fraksi dengan konsentrasi yang diberikan diperoleh nilai F hitung sebesar 2,172 dan probabilitasnya sebesar 0,033 lebih kecil dari 0,05. Dengan demikian terbukti bahwa interaksi antara fraksi dan konsentrasi nyata. Dapat disimpulkan bahwa pengaruh antara fraksi A, B, C dan D serta antibiotik *tetrasiklin* dengan konsentrasi yang berbeda memberikan pengaruh yang signifikan.

Untuk menentukan perlakuan kombinasi yang paling bisa meningkatkan zona hambat perlu dilakukan uji lanjut. Uji lanjut yang digunakan yaitu BNT 5 %. Hasil uji lanjut BNT 5 % (**Lampiran 4**) menunjukkan perlakuan kombinasi antara fraksi A dengan konsentrasi 4 mg/ml merupakan perlakuan terbaik. Perlakuan ini mampu menghasilkan zona hambat terbesar yaitu $3,05 \pm 0,52$ mm dan mampu menyetarai hasil perlakuan antibiotik *tetrasiklin* dengan konsentrasi 2 mg/ml sebagai kontrol positif. Dengan demikian, fraksi A dianggap sebagai fraksi teraktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. cholera* dan akan digunakan dalam penelitian utama sebagai sampel uji.

4.2 Penelitian Utama

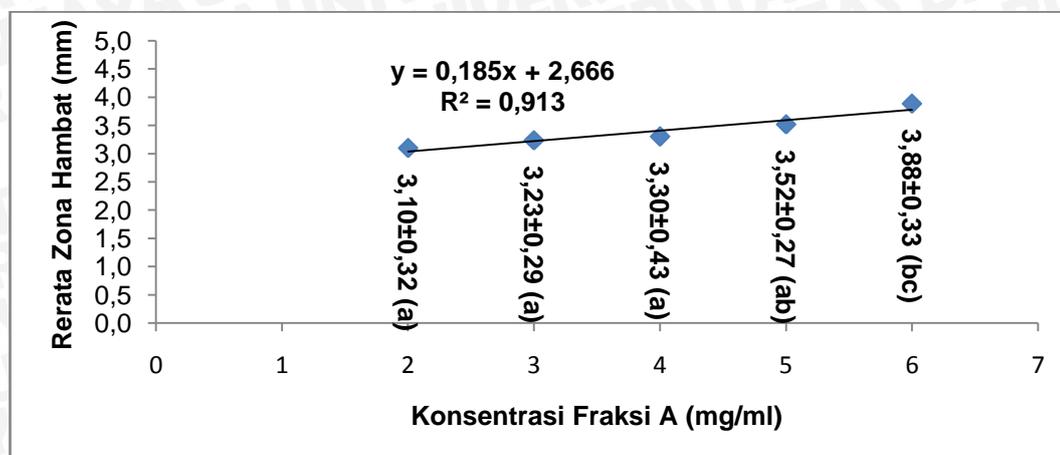
4.2.1 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Teraktif *Holothuria atra* terhadap Bakteri *Vibrio cholerae*

Hasil uji aktivitas antibakteri yang diperoleh pada penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa fraksi A merupakan fraksi teraktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae*. Uji daya hambat selanjutnya dilakukan untuk menentukan konsentrasi terbaik dari fraksi A yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 2, 3, 4, 5, dan 6 mg/ml. *Tetrasiklin* digunakan sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 4 mg/ml, sedangkan kontrol negatif digunakan DMSO 10%. Hasil pengamatan daya hambat penelitian utama dapat dilihat pada **Gambar 9**.



Gambar 5 Zona Hambat Fraksi A *H. atra*

Data pengamatan zona hambat yang terbentuk dan uji BNT 5 % pada penelitian utama dapat dilihat pada **Gambar 10**.



Keterangan : perlakuan yang memiliki notasi sama menandakan tidak berbeda nyata, perlakuan yang memiliki notasi berbeda menandakan berbeda nyata.

Gambar 6 Grafik Rerata Hasil Zona Hambat dan Hasil Uji BNT 5 % Fraksi A *H. atra*

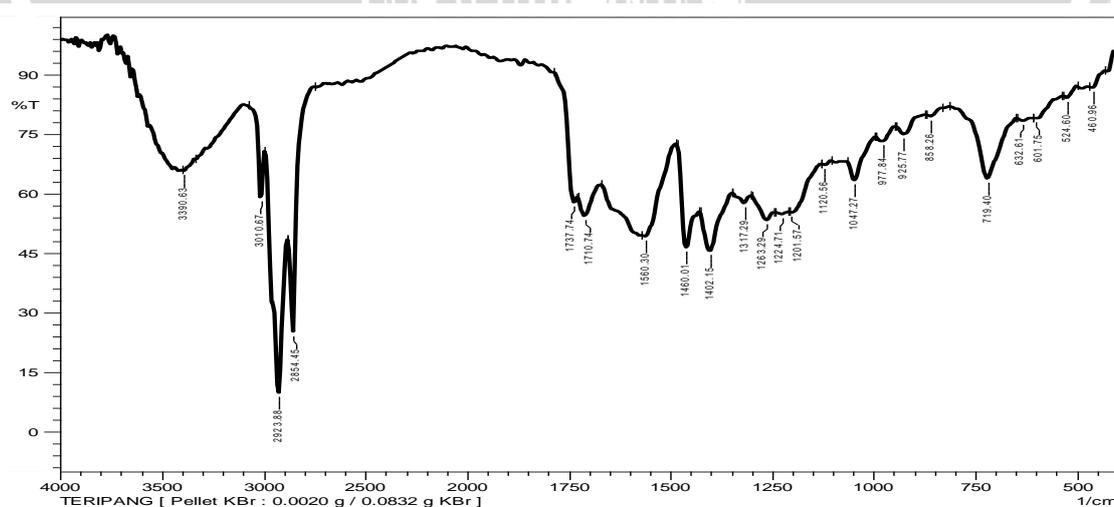
Dari grafik diatas diketahui rata-rata zona hambat yang terbesar dihasilkan oleh fraksi A pada konsentrasi 6 mg/ml yaitu sebesar $3,88 \pm 0,33$ mm. Sedangkan rata-rata zona hambat terkecil dihasilkan oleh fraksi A pada konsentrasi 2 mg/ml yaitu sebesar $3,10 \pm 0,32$ mm. Hasil uji ANOVA *One Way* (**Lampiran 5**) diperoleh nilai F hitung sebesar 5,04 dan probabilitasnya sebesar 0,004 lebih kecil dari 0,01. Dengan demikian terbukti bahwa terdapat hubungan yang sangat berbeda nyata antara pengaruh pemberian konsentrasi fraksi A yang berbeda-beda.

Untuk menentukan perlakuan terbaik atau yang paling bisa memberikan hasil zona hambat terbesar perlu dilakukan uji lanjut. Uji lanjut yang digunakan yaitu BNT 5 %. Hasil uji lanjut BNT 5 % (**Lampiran 5**) menunjukkan perlakuan fraksi A dengan konsentrasi 5 mg/ml dan 6 mg/ml memiliki potensi yang sama. Namun untuk konsentrasi 6 mg/ml berbeda nyata dengan semua perlakuan sehingga dapat dikatakan bahwa fraksi A dengan konsentrasi 6 mg/ml

merupakan konsentrasi terbaik atau teraktif yang dapat memberikan zona hambat paling besar. Regresi yang cocok untuk menggambarkan hubungan antara pemberian konsentrasi fraksi A dan hasil zona hambat adalah regresi linier dengan persamaan $\hat{Y} = 2,666 + 0,185 X$ dan nilai korelasi sebesar 0,913 (sangat signifikan). Hal ini menunjukkan besar atau kecilnya zona hambat 91,3 % bisa dijelaskan dengan perlakuan konsentrasi fraksi A. Dengan meningkatnya konsentrasi fraksi A yang diberikan maka akan menghasilkan nilai zona hambat yang semakin besar.

4.2.2 Analisa Senyawa Antibakteri Fraksi Teraktif *Holothuria atra*

Fraksi teraktif ekstrak metanol *H. atra* dianalisa komponen senyawa yang terkandung di dalamnya dengan menggunakan Spektrofotometri Ultra Violet (UV-Vis), FT-IR, dan analisis LC-MS. Fraksi teraktif ekstrak metanol *H. atra* diuji spektrum IR menggunakan pelet KBr untuk mengetahui gugus fungsional yang terdapat pada sampel. Gugus-gugus fungsional yang diduga terdapat pada fraksi teraktif ekstrak metanol *H. atra* hasil analisa FT IR dapat dilihat pada **Gambar 11** dan **Tabel 6**.



Gambar 7 Spektrum FT-IR Fraksi A *H. atra*

Tabel 4 Gugus Fungsional Pita Serapan FT-IR Fraksi Teraktif *H. atra* Daerah serapan

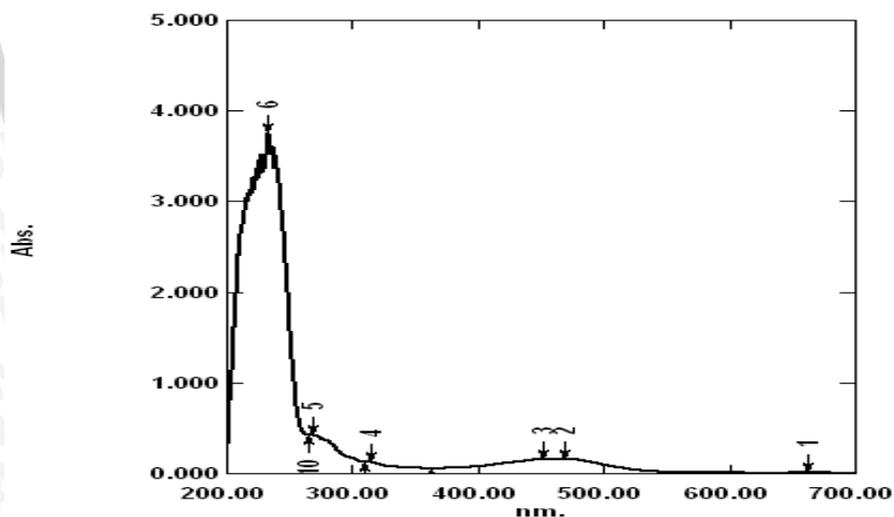
Gugus Fungsional	Fraksi A <i>H. atra</i>	Pustaka (Silverstrein <i>et al.</i> , 1986; Sastrohamidjojo, 1992)	Jenis Ikatan
O-H	3390,63 cm ⁻¹	2400-3400 cm ⁻¹	
C-H alifatik	3010,67 cm ⁻¹ 2923,88 cm ⁻¹ 2854,45 cm ⁻¹	2850-3159 cm ⁻¹	Alkana, Alkena, Aromatik
-CH ₂ , -CH ₃	1460,01 cm ⁻¹ 1402,15 cm ⁻¹	1375-1465 cm ⁻¹	Alkana
=C-H	1560,30 cm ⁻¹ 977,84 cm ⁻¹ 925,77 cm ⁻¹ 858,26 cm ⁻¹ 719,40 cm ⁻¹	1475-1600 cm ⁻¹ 650-1000 cm ⁻¹	Alkena, Aromatik
C=O	1737,74 cm ⁻¹ 1710,74 cm ⁻¹	1700-1750 cm ⁻¹	Asam karboksilat, Ester
C-O	1263,29 cm ⁻¹ 1224,71 cm ⁻¹ 1201,57 cm ⁻¹ 1120,56 cm ⁻¹ 1047,27 cm ⁻¹	1000-1300 cm ⁻¹	Alkohol, Asam karboksilat, Ester

Gambar diatas menunjukkan adanya serapan melebar dengan intensitas kuat pada daerah bilangan gelombang 3390,63 cm⁻¹ yang diduga serapan dari gugus O-H. Munculnya gugus O-H diperkuat dengan dugaan gugus C-O alkohol yang muncul pada daerah serapan antara 1300-1000 cm⁻¹. Serapan tajam muncul pada daerah 2923,88 cm⁻¹ dan 2854,45 cm⁻¹ diduga merupakan vibrasi C-H alifatik yang diperkuat dengan adanya serapan pada daerah 1469,01 cm⁻¹ dan 1402,15 cm⁻¹ dimana merupakan gugus yang memungkinkan berasal dari gugus CH₃-CH₂. Gugus karbonil (C=O) diduga muncul dengan intensitas yang kuat pada daerah serapan 1737,74 cm⁻¹ dan 1710,74 cm⁻¹. Oleh karena itu, dugaan adanya gugus asam karboksilat dan ester dimungkinkan dengan adanya gugus -OH untuk asam karboksilat dan gugus -CO untuk ester. Pada spektrum FTIR juga terlihat adanya gugus aromatik (C=C) di daerah 1560,30 cm⁻¹ yang

diperkuat dengan adanya serapan C-H aromatik pada daerah $675-995\text{ cm}^{-1}$ (Silverstrein *et al.*, 1986; Sastrohamidjojo, 1992).

Berdasarkan gugus-gugus yang terbentuk dari analisis FTIR, diduga senyawa yang terdapat pada isolat ekstrak metanol *H. atra* merupakan senyawa triterpenoid. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Rumondang *et al.*, (2013), Rita (2010) dan Asih *et al.*, (2010) tentang isolasi dan identifikasi senyawa golongan triterpenoid alami diperoleh gugus-gugus spektrum IR antara lain gugus OH, CH alifatik, C=O, dan C-O. Kemudian Roihanan *et al.*, (2012) menjelaskan bahwa senyawa triterpenoid dari spesies *Holothuria* sp menunjukkan adanya gugus C-H alifatik dan asam karboksilat dengan munculnya gugus C=O dan O-H. Kemudian penelitian yang dilakukan oleh Han *et al.*, (2009) dan Han *et al.*, (2012) menunjukkan adanya gugus hidroksil (OH), karbonil (C=O), dan gugus C=C pada senyawa triterpene glycosides yang diisolasi pada beberapa jenis teripang.

Hasil analisis menggunakan Spektrofotometri Ultra Violet (UV-Vis) dapat dilihat pada **Gambar 12**.



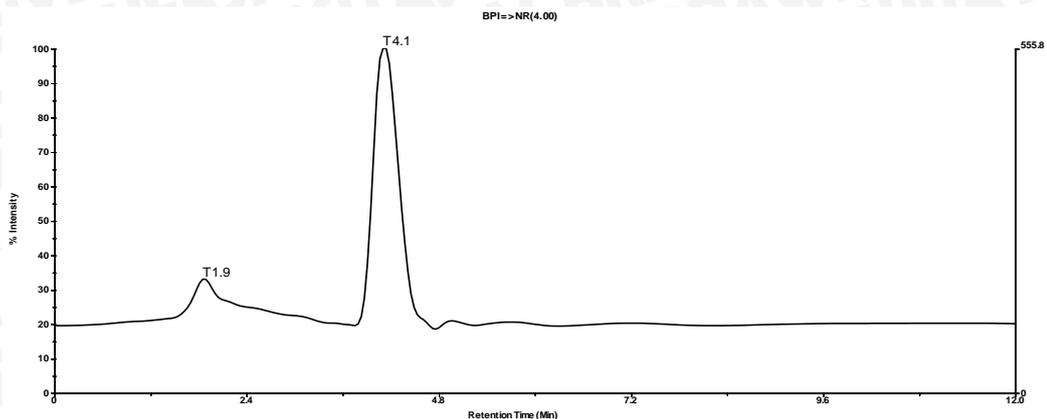
Gambar 8 Spektrum UV-Vis Fraksi A *H. atra*

Hasil analisis spektrofotometri UV-Vis dengan menggunakan pelarut metanol menunjukkan terbentuknya 10 pola pita serapan. Pita serapan yang kuat

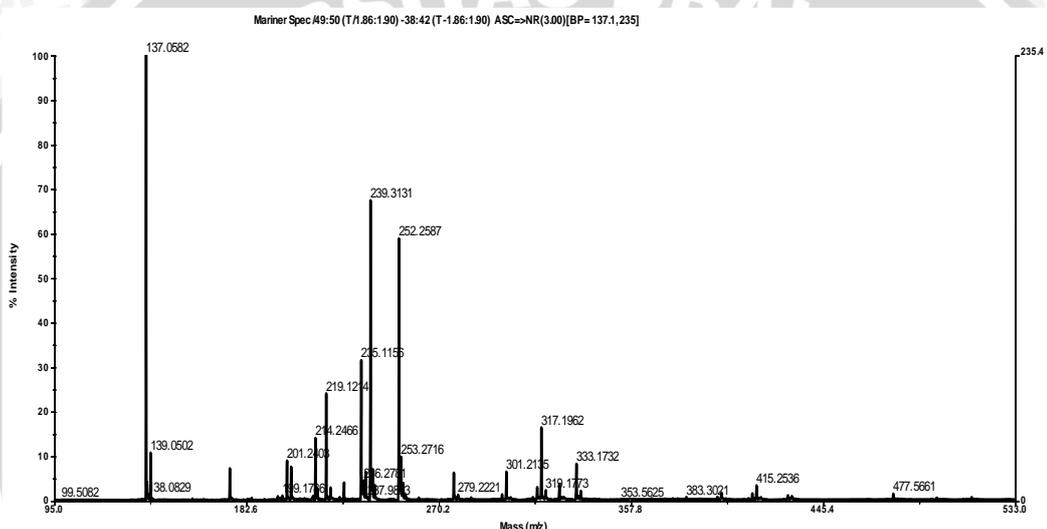
terjadi pada panjang gelombang 233 nm dengan nilai absorbansi sebesar 3,763. Pada panjang gelombang ini diduga terjadi transisi elektron dari $\pi \rightarrow \pi^*$ yang disebabkan oleh adanya kromofor C=O. Hal ini diperkuat oleh data spektrofotometri inframerah yang menunjukkan adanya gugus fungsi C=O pada daerah serapan $1737,74 \text{ cm}^{-1}$ dan $1710,74 \text{ cm}^{-1}$. Pergeseran ini terjadi dikarenakan perpanjangan konjugasi ke panjang gelombang yang lebih panjang (batokhromik). Pita lainnya seperti pada panjang gelombang 265 dan 268 nm terjadi transisi elektron $n \rightarrow \pi^*$ yang diduga diakibatkan oleh adanya ikatan rangkap C=O.

Menurut Silverstein *et al.*, (1986), geseran batokhromik merupakan geseran dari serapan ke panjang gelombang yang lebih panjang karena sisipan atau pengaruh pelarut (geseran merah). Sedangkan geseran hipsokhromik adalah geseran dari serapan ke panjang gelombang yang lebih pendek karena gugus ganti atau pengaruh pelarut (geseran biru). Jadi karena pelarut yang digunakan adalah metanol, diduga terjadi kenaikan kepolaran sehingga elektron dengan transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ akan mengalami kenaikan panjang gelombang dan elektron dengan transisi $n \rightarrow \pi^*$ akan mengalami penurunan panjang gelombang.

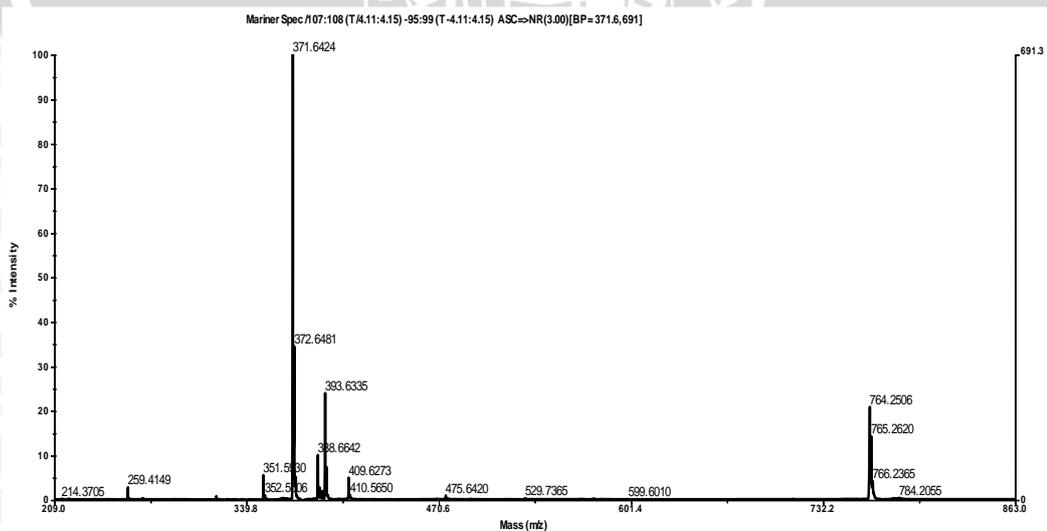
Analisis senyawa dilanjutkan dengan uji LC-MS untuk mengidentifikasi struktur senyawa dan berat molekul yang terdapat pada fraksi teraktif ekstrak metanol *H. atra*. Hasil uji LC-MS dengan metode ESI (+) menunjukkan terbentuknya 2 puncak waktu retensi yang berbeda. Waktu retensi dengan intensitas yang paling besar terdapat pada puncak kedua yaitu 4,1 menit. Sedangkan puncak pertama memiliki waktu retensi 1,9 menit. Puncak dengan waktu retensi paling besar diduga memiliki kelimpahan yang besar suatu jenis senyawa. Pola spektrum LC-MS dapat dilihat pada **Gambar 13, 14 dan 15**.



Gambar 9 Spektrum LC Fraksi A *H. atra*



Gambar 10 Spektrum MS Rt 1,9 Fraksi A *H. atra*



Gambar 11 Spektrum MS Rt 4,1 Fraksi A *H. atra*



Senyawa dugaan dari hasil analisa LC-MS fraksi A *H. atra* dapat dilihat pada **Tabel 7**.

Tabel 5 Senyawa Dugaan Analisa LCMS Fraksi A *H. atra*

Retention Time	Berat Molekul	Rumus Molekul
1,9	476 [M+H]	C ₃₀ H ₅₂ O ₄
4,1	764 [M+]	C ₄₈ H ₆₀ O ₈

Hasil analisa spektrum MS fraksi terkatif ekstrak metanol *H. atra* pada Rt 1,9 (**Lampiran 8**) menunjukkan terdapat beberapa puncak ion yang menandakan fragmentasi berdasarkan berat molekulnya. Diduga senyawa pada Rt 1,9 memiliki berat molekul 476 m/z sebagai [M+H]. Selain itu diduga terdapat fragmentasi senyawa dengan berat molekul 317 m/z dan 137 m/z (*base peak*). Berdasarkan penelusuran database spektra massa, senyawa dengan berat molekul 476 m/z diduga memiliki rumus molekul C₃₀H₅₂O₄. Senyawa ini termasuk dalam golongan triterpenoid sapogenin tetracyclik.

Pada Rt 4,1 (**Lampiran 8**) diduga senyawa memiliki berat molekul 764 m/z sebagai [M+]⁺. Diduga terdapat fragmentasi senyawa pada berat molekul 371 m/z (*base peak*). Berdasarkan penelusuran database spektra massa, senyawa dengan berat molekul 764 m/z diduga memiliki rumus molekul C₄₈H₆₀O₈. Senyawa ini termasuk dalam golongan triterpenoid pentasiklik.

Struktur mutlak dari senyawa triterpenoid berdasarkan hasil analisa LC-MS masih belum bisa ditentukan karena informasi yang kurang. Namun berdasarkan analisa spektrofotometri UV-Vis dan FT-IR dapat diduga senyawa pada fraksi A merupakan senyawa triterpenoid.

4.3 Senyawa Antibakteri *Holothuria atra* dan Mekanisme Penghambatan Bakteri *Vibrio cholerae*

Ekstrak metanol *Holothuria atra* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Vibrio cholerae* berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, namun efek yang ditimbulkan oleh ekstrak metanol *H. atra* masih lebih kecil daripada antibiotik *tetrasiklin*. Hal ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor misalnya komponen senyawa antibakteri dan efektivitasnya serta tingkat resistensi dari bakteri uji. Pada dasarnya mekanisme menghambat mikroorganisme oleh antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya: (1) gangguan pada senyawa penyusun dinding sel, (2) peningkatan permeabilitas membran sel, (3) menginaktivasi enzim, dan (4) kerusakan fungsi material genetik.

Bakteri uji *V. cholerae* termasuk dalam bakteri gram negatif. Umumnya bakteri gram negatif memiliki komposisi dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi dan lebih tahan terhadap antibiotik dibandingkan dengan gram positif. Menurut Jawetz *et al.*, (2001), membran luar pada gram negatif memiliki saluran khusus, yang terdiri dari protein yang disebut porin, yang dapat meloloskan difusi pasif dari beberapa molekul hidrofilik dengan berat rendah. Molekul dengan berat besar sangat lambat dalam menembus membran luar, sehingga bakteri gram negatif relatif sangat tahan terhadap antibiotik. Hal ini yang mungkin terjadi sehingga senyawa antibakteri *H. atra* memiliki aktivitas yang lebih rendah dibandingkan *tetrasiklin*. Namun demikian, *H. atra* dapat dikategorikan memiliki potensi sebagai antibakteri alami.

Dalam identifikasi dan karakterisasi senyawa bioaktif, diduga fraksi teraktif (fraksi A) ekstrak metanol *H. atra* mengandung senyawa golongan triterpenoid. Menurut Harborne (1996), triterpenoid merupakan senyawa dengan kerangka karbon berasal dari isoprena (C_5H_8) dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik. Dalam berbagai penelitian disebutkan senyawa

golongan triterpen memiliki aktivitas yang menguntungkan dan banyak digunakan dalam dunia farmasi. Telah dilaporkan bahwa senyawa triterpenoid dan turunannya memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Gunawan *et al.*, 2008; Sukadana dan Santi, 2011), penghambat sel kanker (Calabria *et al.*, 2008), dan antiinflamasi (Muley *et al.*, 2009).

Senyawa triterpenoid dan derivatnya yang terdapat pada teripang telah banyak diteliti. Menurut Zhang *et al.*, (2006), senyawa yang dominan terdapat dalam teripang adalah saponin. Saponin merupakan senyawa glikosida kompleks dengan kerangka dasar yang berhubungan dengan gugus glukosa dan triterpenoid. Saponin atau biasa disebut Holothurin pada teripang merupakan metabolit sekunder yang berperan sebagai pertahanan diri teripang. Senyawa ini diproduksi pada bagian kulit dan civerian teripang. Dalam penelitian Thanh (2006) dan Yuan *et al.*, (2008), triterpenoid glikosida dari teripang yang terbukti memiliki aktivitas antifungi, antibakteri dan agen sitotoksik.

Dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae*, golongan triterpenoid diduga mampu merusak membran sel, inaktivasi enzim dan mendenaturasi protein sehingga dinding sel mengalami kerusakan akibat penurunan permeabilitas. Perubahan permeabilitas membran sitoplasma memungkinkan ion-ion organik yang penting masuk ke dalam sel sehingga berakibat terhambatnya pertumbuhan bahkan hingga mematikan sel (Roihana *et al.*, 2012). Ditambahkan oleh Farrouk *et al.*, (2007), gugus polisakarida pada senyawa triterpenoid teripang dapat menembus membran sel bakteri sehingga sel tersebut rusak.

Gugus-gugus aktif penyusun triterpenoid juga memiliki peran dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa-senyawa antibakteri dapat dikelompokkan menjadi 4 golongan berdasarkan gugus fungsi dan ada tidaknya

ikatan rangkap. Menurut Maryani (2010), senyawa-senyawa yang mampu berperan sebagai antibakteri biasanya mengandung ikatan rangkap C=C alkena alifatik dan aromatik, gugus C=O karbonil, gugus C-O-C ester, gugus metilena serta gugus metil.

Telah diketahui bahwa berdasarkan analisis FT-IR, senyawa triterpenoid pada *H. atra* memiliki gugus karbonil O-H, C=O, C-O, ikatan rangkap C=C, metilena dan metil. Selain itu, gugus asam karboksilat, ester dan alkohol juga terbentuk pada senyawa triterpenoid *H. atra*. Menurut Pelczar dan Chan (1986), senyawa alkohol dan asam karboksilat diduga memiliki aksi sinergis dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Dalam mekanismenya, alkohol berperan dalam mendenaturasi protein, merusak dinding sel, sarana dehidrasi sel serta aksi detergen atau penghubung antara ikatan hidrifik dan hidrofobik. Sedangkan asam karboksilat bekerja melalui aksi memecah ikatan hidrogen dan mendenaturasi protein. Tingkat aktivitas germisidal dari alkohol adalah sedang, sedangkan asam karboksilat bersifat sedang hingga tinggi.