ISOLASI, IDENTIFIKASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI METANOL TERIPANG HITAM (*Holothuria atra*) TERHADAP BAKTERI *Vibrio cholerae*

SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN

Oleh :
ARY ANGGARA PUTRA
NIM. 105080300111039

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

ISOLASI, IDENTIFIKASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI METANOL TERIPANG HITAM (*Holothuria atra*) TERHADAP BAKTERI *Vibrio cholerae*

SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Oleh :
ARY ANGGARA PUTRA
NIM. 105080300111039

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015

SKRIPSI
ISOLASI, IDENTIFIKASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI METANOL TERIPANG HITAM (*Holothuria atra*) TERHADAP BAKTERI *Vibrio cholerae*

Oleh :
ARY ANGGARA PUTRA
NIM. 105080300111039

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 18 Februari 2015
dan telah dinyatakan memenuhi syarat

SK Dekan no. : _____

Tanggal : _____

Menyetujui,

Dosen Penguji I	**Dosen Pembimbing I**
Dr. Ir. Kartini Zailanie, MP	**Ir. Darius M. Biotech**
NIP. 19550503 198503 2 001	**NIP. 19500531 198103 1 003**
Tanggal :	**Tanggal :**
Dosen Penguji II	**Dosen Pembimbing II**
Dr. Ir. Happy Nursyam, MS	**Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS**
NIP. 19600322 198601 1 001	**NIP. 19640726 198903 2 004**
Tanggal :	**Tanggal :**

Mengetahui,

Ketua Jurusan MSP

Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal :

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 18 Februari 2015

Ary Anggara Putra
NIM. 105080300111039

UCAPAN TERIMAKASIH

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan berkah, nikmat dan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan Skripsi ini. Shalawat serta Salam tidak lupa penulis curahkan kepada junjungan besar Nabi Muhammad SAW beserta iringan doa kepada keluarga, sahabat dan seluruh pengikut setianya hingga akhir zaman.

"Kita tidak bisa berdiri tanpa terjatuh dahulu dan pengalaman membuat kita bisa berjalan. Semua tidak lepas karena kebiasaan dan kesabaran."

Penulis menyadari dalam penyusunan laporan Skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan rendah hati dan penuh keikhlasan, tidak lupa penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Kedua orang tua (Alm. Witoyo di surga dan Sartiyah), Adek Satriyo, Adek Safira serta segenap anggota keluarga Kertosono dan Kroya yang telah memberi dorongan semangat dan doa. Begitu banyak pengorbanan yang telah kalian lakukan demi mewujudkan seorang Sarjana di keluarga kita. Semoga dengan keikhlasan dan kasih sayang kalian, cita-cita kalian dari seorang Sarjana ini bisa terwujud. Amin
2. Ir. Darius M. Biotech selaku dosen pembimbing 1 yang telah banyak memberikan pengarahan dan bimbingan sejak pembuatan usulan skripsi sampai terselesaikannya laporan skripsi ini.
3. Dr. Ir. Hartati Kartika N., MS selaku dosen pembimbing 2 yang telah banyak memberikan pengarahan dan bimbingan dengan penuh kesabaran serta dukungan moril dan materil sejak pembuatan usulan skripsi sampai terselesaikannya laporan skripsi ini.
4. Dr. Ir. Kartini Zailanie, MP dan Dr. Ir. Happy Nursyam, MS, selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan saran dalam penyelesaian laporan skripsi ini.
5. Keluarga besar Om Sandy, Om Dwi Indrawan, dan Bude Nikmah serta orang-orang yang sangat baik dan penuh ikhlas membantu penulis dalam menyelesaikan kuliah.
6. Fatiah Rastra dan Keluarga, yang selalu setia mendampingi penulis dan banyak berkontribusi demi terselesaikannya laporan Skripsi ini.

7. Keluarga besar Barokah Chapter Malang (Taslim, Gustaf, Midun, Cadoy, Bayu, Fadlan dan lain-lain), yang selalu setia membantu bertahan hidup di rantau.
8. Sahabat tak terlupakan Adi Citra Prabowo (Kating), Refa Zain Arsyadana (Wa.Kahim), Haris Rahmadien (Presidium) dan jajaran pengurus HIMATHRIK 2010. Begitu besar arti kehidupan dengan kehadiran kalian dan kita yang terhebat.
9. Sahabat-sahabat tercinta THP angkatan 2010, yang selalu setia memberi motivasi, semangat, doa serta keceriaan. Rasa berhutang budi penulis begitu besar dan tidak akan terlupakan, semoga kelak kita lebih bisa menjadi orang berguna bagi keluarga, masyarakat dan negara.
10. Keluarga besar Himathrik, yang telah memberi banyak ilmu dan pengalaman berorganisasi. Semoga Himathrik semakin jaya dengan kekeluargaan yang erat.
11. Segenap tim asisten praktikum Ichtyologi, Mikdas, Mikpang, Tfpp, Metanal, dan Gizi, yang telah banyak memberikan ilmu dan mau bekerja sama dalam tim.
12. Ibu Iwin selaku Laboran Laboratorium Mikrobiologi, yang selalu membantu dan memudahkan dalam proses penelitian.
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan, baik secara langsung maupun tidak langsung.

Akhirnya, kesempurnaan hanya milik Allah SWT dan kekurangan hanya milik kita sebagai manusia, sehingga penulis menyadari laporan Skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat dalam memberikan informasi bagi pihak yang membutuhkan.

Malang, 18 Februari 2015

Penulis

repository.ub.ac.id

RINGKASAN

Ary Anggara Putra (NIM 105080300111039). Skripsi tentang Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Metanol Teripang Hitam (*Holothuria atra*) terhadap Bakteri *Vibrio cholerae* (di bawah bimbingan **Ir. Darius, M. Biotech** dan **Dr. Ir. Hartati Kartika N., MS)**

Kolera merupakan salah satu wabah *foodborne disease* yang disebabkan oleh bakteri pathogen *Vibrio cholerae*. Kolera dapat menyebabkan kematian apabila tidak ditangani secara dini sehingga perlunya upaya mendapatkan bahan alami yang dapat digunakan untuk menghambat bakteri *Vibrio cholerae*. Salah satu sumber bahan alami yang memiliki aktivitas antimikroba yaitu teripang. Teripang sudah digunakan sejak lama sebagai makanan yang berkasiat oleh etnis Cina. Teripang ini memiliki bahan aktif antara lain antimikriba, antikanker, antijamur, dan antiinflamasi. Salah satu jenis teripang yang banyak di Indonesia adalah *Holothuria atra*.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak *H. atra* terbaik untuk menghambat *V. cholerae* serta mendapatkan senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung dalam *H. atra.* Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang serta Laboratorium Kimia PUSPITEK LIPI Serpong pada Mei sampai September 2014.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Dalam penelitian ini terdapat 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan meliputi ekstraksi, isolasi dengan kromatografi kolom dan KLT, serta uji aktivitas antibakteri untuk mencari fraksi terkatif. Penelitian utama meliputi uji daya hambat fraksi terkatif dan identifikasi senyawa meenggunakan spektrofotometri UV-Vis, FTIR dan LCMS. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu untuk penelitian pendahuluan digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan 2 faktorial dengan 3 ulangan dan untuk penelitian utama digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Sederhana dengan 6 ulangan.

Hasil dari penelitian menunjukan bahwa konsentrasi dari fraksi metanol *Holothuria atra* yang memberikan daya hambat terbaik terhadap pertumbuhan *Vibrio cholerae* terdapat pada konsentrasi 6 mg/ml atau 6000 ppm dengan zona hambat rata-rata yang dihasilkan yaitu 3,88±0,33 mm. Hasil identifikasi senyawa dengan spektrofotometri UV-Vis, FT-IR, dan LC-MS ESI (+) menunjukan bahwa terdapat serapan pada λ^{max} 233 nm dan berat molekul sanyawa dugaan sebesar 476 m/z (Rt 1,9) dan 764 m/z (Rt 4,1). Kemudian gugus-gugus yang terbentuk yaitu O-H, C-O, C=O, C=C, CH_2, dan CH_3. Dengan demikian diduga senyawa tersebut adalah senyawa golongan triterpenoid dan berperan dalam memberikan aktivitas antibakteri.

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut menggunakan isolat murni *H. atra* dengan metode MIC dan MBC untuk mengetahui potensi bakteriostatik maupun bakteriosidal. Disarankan untuk mengidentifikasi senyawa pada *H. atra* menggunakan analisis NMR.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Alhamdulillahirabbilalamin. Segala puji dan syukur kami panjatkan kepada Allah SWT atas segala berkah, rahmat serta karunia-Nya yang tiada terkira sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan Skripsi dengan judul "Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Metanol Teripang Hitam (*Holothuria atra*) terhadap Bakteri *Vibrio cholerae*". Dalam penyusunannya, penulis banyak mengambil literatur-literatur yang bersumber dari *text book*, artikel, jurnal, maupun prosiding seminar untuk dijadikan tinjauan pustaka yang dapat mendukung pembuatan laporan Skripsi tersebut. Selain itu, penulis juga memperoleh banyak bantuan dari berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung, sehingga segala informasi, ilmu dan materi terkait bahasan laporan Skripsi dapat dengan mudah diperoleh.

Penulis menyadari dalam laporan Skripsi ini tentunya masih banyak terdapat kekurangan dan kesalahan, baik dari materi maupun teknik penyajian mengingat kurangnya pengetahuan dan pengalaman penulis. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca pada umumnya, terutama para Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Malang, Februari 2015

Penyusun

DAFTAR ISI

RINGKASAN ..... **vi**
KATA PENGANTAR ..... **vii**
DAFTAR ISI ..... **viii**
DAFTAR TABEL ..... **x**
DAFTAR GAMBAR ..... **xi**
DAFTAR LAMPIRAN ..... **xii**
1. PENDAHULUAN **1**
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Perumusan Masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 3
1.4 Hipotesis 3
1.5 Kegunaan Penelitian 4
1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan 4
2. TINJAUAN PUSTAKA **5**
2.1 Teripang (Holothuridae) 5
2.1.1 Teripang Hitam (*Holothuria atra*) 5
2.1.2 Kandungan Senyawa Bioaktif Teripang 7
2.2 Pelarut 8
2.2.1 Metanol 9
2.2.2 DMSO (*Dimethyl-sulfoxide*) 10
2.3 Ekstraksi 10
2.4 Aktivitas Antibakteri 11
2.4.1 Uji Aktivitas Antibakteri 12
2.4.2 Mekanisme Penghambatan Antibakteri 13
2.4.3 *Vibrio cholerae* 14
2.5 Kromatografi Kolom 15
2.6 Identifikasi Senyawa Antibakteri 16
2.6.1 Spektrofotometer *Ultraviolet Visible* (UV-VIS) 16
2.6.2 Spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (FT-IR) 17
2.6.3 *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) 18
3. METODE PENELITIAN **20**
3.1 Materi Penelitian 20
3.1.1 Bahan Penelitian 20
3.1.2 Alat Penelitian 20
3.2 Metode Penelitian 21
3.2.1 Penelitian Pendahuluan 22
3.2.1.1 Prosedur Penelitian Pendahuluan 24
3.2.1.2 Parameter Uji Penelitian Pendahuluan 28
3.2.2 Penelitian Utama 28
3.2.2.1 Prosedur Penelitian Utama 30
3.2.2.2 Parameter Uji Penelitian Utama 31
3.2.3 Analisis Data 31
4. HASIL DAN PEMBAHASAN **32**
4.1 Penelitian Pendahuluan 32
4.1.1 Ekstraksi *Holothuria atra* 32
4.1.2 Uji Fitokimia Ekstrak Metanol *Holothuria atra* 33
4.1.3 Isolasi Ekstrak Metanol *H.atra* dengan Kromatografi Kolom 36
4.1.4 Uji Antibakteri Fraksi-Fraksi *H.atra* terhadap *V.cholerae* 39

4.2 Penelitian Utama 41
4.2.1 Uji Antibakteri Fraksi Teraktif *H.atra* terhadap *V.cholerae* 41
4.2.2 Analisa Senyawa Antibakteri Fraksi Teraktif *Holothuria atra* 43
4.3 Senyawa Antibakteri *H.atra* dan Mekanisme Penghambatan 49
5. KESIMPULAN DAN SARAN 52
5.1 Kesimpulan 52
5.2 Saran 52
DAFTAR PUSTAKA 53
LAMPIRAN 59

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Jenis Pelarut Untuk Ekstraksi Senyawa Aktif 8
Tabel 2 Karakteristik Pelarut Metanol 9
Tabel 3 Uji Fitokimia Ekstrak Metanol *H. atra* 35
Tabel 4 Fraksi-Fraksi Ekstrak Metanol *H. atra* Hasil Kromatografi Kolom 37
Tabel 5 (lanjutan Tabel 4) 38
Tabel 6 Gugus Fungsional Pita Serapan FT-IR Fraksi Teraktif *H. atra* 44
Tabel 7 Senyawa Dugaan Analisa LCMS Fraksi A *H. atra* 48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 *Holothuria atra* 7
Gambar 2 *Vibrio cholerae* 14
Gambar 3 Diagram Alir Penelitian Pendahuluan 23
Gambar 4 Diagram Alir Penelitian Utama 29
Gambar 5 Ekstraksi *H. atra* 33
Gambar 6 Uji Fitokimia Ekstrak Metanol *H. atra* 34
Gambar 7 Kromatografi Kolom Ekstrak Metanol *H. atra* 37
Gambar 8 Rerata Hasil Zona Hambat dan Uji BNT 5 % Fraksi-Fraksi *H. atra* 39
Gambar 9 Zona Hambat Fraksi A *H. atra* 41
Gambar 10 Rerata Hasil Zona Hambat dan Hasil Uji BNT 5 % Fraksi A *H. atra* 42
Gambar 11 Spektrum FT-IR Fraksi A *H. atra* 43
Gambar 12 Spektrum UV-Vis Fraksi A *H. atra* 45
Gambar 13 Spektrum LC Fraksi A *H. atra* 47
Gambar 14 Spektrum MS Rt 1,9 Fraksi A *H. atra* 47
Gambar 15 Spektrum MS Rt 4,1 Fraksi A *H. atra* 47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan Rendemen Ektrak Metanol *Holothuria atra* 59
Lampiran 2 Prosedur Pembuatan DMSO 10 % dan Konsentrasi 60
Lampiran 3 Hasil Kromatografi Lapis Tipis 63
Lampiran 4 Analisis Keragaman (ANOVA) Penelitian Pendahuluan 65
Lampiran 5 Analisis Keragaman (ANOVA) Penelitian Utama 67
Lampiran 6 Hasil Analisa FT-IR 70
Lampiran 7 Hasil Analisa Spektrofotometer UV-Vis 71
Lampiran 8 Hasil Analisa LC-MS 72
Lampiran 9 Dokumentasi Penelitian 76

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kolera merupakan salah satu wabah *foodborne disease* yang disebabkan oleh bakteri pathogen. Wabah ini sempat menjadi perhatian dunia khususnya di negara berkembang seperti Indonesia karena memiliki tingkat konsumsi *seafood* yang tinggi. Kolera memiliki ciri-ciri seperti halnya penyakit diare bahkan dapat menyebabkan kematian apabila tidak ditangani secara dini. Awal mula infeksi kolera *biasanya* disebabkan karena bakteri *Vibrio cholerae* mengkontaminasi makanan yang berasal dari laut dan tidak mengalami proses pengolahan yang baik.

Vibrio cholerae pada dasarnya hanya pathogen terhadap manusia. Dibutuhkan sekitar 10^{10} atau lebih bakteri *Vibrio cholerae* untuk menginfeksi manusia yang memiliki asam lambung normal. Gambaran klinis dari infeksi ini dimulai dengan munculnya diare tanpa didahului dengan rasa mulas, muntah berlebihan, kejang otot dan kemudian penderita akan mengalami dehidrasi karena kekurangan cairan dan elektrolit. Cara penanggulangan penyakit kolera sudah ditemukan dengan pemberian antibiotika. Antibiotika yang sering digunakan untuk melawan *Vibrio cholerae* adalah *tetrasiklin*. *Tetrasiklin* dapat memperpendek masa ekskresi kuman ini dan memperpendek waktu timbulnya gejala klinis. Akan tetapi *Vibrio cholerae* memiliki kemampuan mengubah permeabilitasnya terhadap tetrasiklin (Jawetz *et al.,* 2001). Dengan adanya strain yang resisten maka perlu informasi tentang sensitivitas bakteri terhadap antibiotik tersebut (Chin, 2006).

Salah satu potensi biota laut yang dapat dijadikan sebagai antibakteri alami adalah teripang. Menurut Wibowo *et* al., (1997), pemanfaatan dan

penelitian tentang penggunaan teripang untuk berbagai aspek kesehatan telah dimulai sejak lama oleh etnis Cina yang mengenal teripang sebagai makanan berkhasiat medis sejak dinasti Ming. Teripang mengandung bahan bioaktif (antioksidan) yang berfungsi mengurangi kerusakan sel jaringan tubuh. Penelitian Kaswandi *et al*., (2000) menunjukkan bahwa ekstraksi komponen antibakteri dari teripang cukup efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli, Vibrio amsela*. Bordbar *et al*., (2011) melaporkan bahwa ekstrak dari *Holothuria scabra* di Asia menunjukkan aktivitas antimikroba, antibakteri, dan antijamur.

Dalam kajiannya tentang bioaktif pada teripang, Pranoto *et* al., (2012) menjelaskan bahwa *Holothuria scabra* memiliki senyawa alkaloid, saponin, steroid, dan triterpen. Zhang *et* al., (2006) menjelaskan saponin pada teripang selain diduga memiliki efek biologis diantaranya sebagai anti jamur, sitotoksik melawan sel tumor, hemolisis, aktivitas kekebalan tubuh, dan anti kanker. Menurut Gholib (2009), alkaloid merupakan senyawa yang bersifat antimikroba, yaitu menghambat esterase dan DNA serta RNA *polymerase*, menghambat respirasi sel. Alkaloid merupakan aktivator kuat bagi sel imun yang menghancurkan bakteri, virus, jamur, dan sel kanker. Dalam penelitian Thanh (2006), isolasi triterpen glikosida dari teripang pasir terbukti mampu menjadi agen antijamur, antibakteri, dan sitotoksik.

Walaupun penelitian tentang antibakteri dari bahan alami teripang telah dilakukan, namun penjelasan dan informasi yang spesifik tentang penggunaan Teripang Hitam (*Holothuria atra*) sebagai senyawa antibakteri terhadap bakteri *Vibrio cholerae* masih sangat sedikit. Hal ini menyebabkan perlu dikembangkannya penelitian lanjutan dari khasiat teripang jenis *Holothuria atra* terutama tentang konsentrasi terbaik ekstrak *H. atra* dalam menghambat *Vibrio*

cholerae dan identifikasi senyawa aktif. Penelitian ini bertujuan untuk pemanfaatan teripang jenis *Holothuria atra* sebagai antibakteri alami terhadap *Vibrio cholerae* dengan konsetrasi yang terbaik.

1.2 Perumusan Masalah

Kajian tentang pemanfaatan *Holothuria atra* sebagai antibakteri alami dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Pada konsentrasi berapa fraksi *Holothuria atra* dapat menghasilkan antibakteri terbaik terhadap *Vibrio cholerae*?
- Senyawa bioaktif apa saja yang terkandung pada fraksi *Holothuria atra* dan berperan sebagai antibakteri alami?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- Mendapatkan konsentrasi fraksi *Holothuria atra* terbaik untuk menghambat *Vibrio cholerae*.
- Mendapatkan senyawa-senyawa antibakteri yang terkandung pada fraksi *Holothuria atra*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang menjadi dasar pada penelitian ini adalah :

- Semakin tinggi konsentrasi fraksi *Holothuria atra* dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio cholerae* semakin baik.
- Senyawa bioaktif dalam *Holothuria atra* berpotensi menghambat pertumbuhan *Vibrio cholerae.*

1.5 Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan:

- Memberikan informasi kepada masyarakat tentang kegunaan teripang hitam (*Holothuria atra*).
- Masyarakat dapat memanfaatkan teripang hitam (*Holothuria atra*) sebagai antibakteri alami yang potensial.

1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang serta Laboratorium Kimia PUSPITEK LIPI Serpong pada Mei sampai September 2014.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Teripang (Holothuridae)

Teripang merupakan salah satu anggota hewan berkulit duri *(Echinodermata)*, yang memiliki tubuh lunak, berdaging, dan berbentuk silindris memanjang. Kurang lebih 10% dari sekitar 650 jenis spesies teripang yang ada di dunia berada di Indonesia. Beberapa daerah penyebaran teripang di Indonesia antara lain meliputi perairan pantai Madura, Jawa Timur, Bali, Sumba, Lombok, Aceh, Bengkulu, Bangka, Riau dan sekitarnya, Belitung, Kalimantan, Sulawesi, Maluku, Timor, dan Kepulauan Seribu (Martoyo *et al.*, 2006).

Teripang mempunyai tubuh yang bulat memanjang dengan garis oral ke aboral sebagai sumbu, bentuknya menyerupai timun sehingga teripang dikenal sebagai timun laut atau *sea cucumber*. Teripang termasuk hewan berkulit duri (*Echinodermata*) dimana duri teripang sebenarnya merupakan rangka yang mengandung zat kapur. Duri pada teripang merupakan duri lunak pada kulit tubuhnya dan tidak semua teripang memilikinya. Teripang umumnya menempati ekosistem terumbu karang dengan perairan yang jernih, bebas dari polusi, air relatif tenang dengan mutu air cukup baik. Habitat yang ideal bagi teripang adalah air laut dengan salinitas 29-33 ‰ yang memiliki kisaran pH 6,5 - 8,5, kecerahan air 50 - 150 cm, kandungan oksigen terlarut 4-8 ppm dan suhu air laut 20 - 25ºC (Wibowo *et al.*, 1997).

2.1.1 Teripang Hitam (*Holothuria atra*)

Teripang hitam (*Holothuria atra*) keseluruhan tubuhnya berwarna hitam dan umumnya ditutupi dengan pasir halus. Spesies ini memiliki 3 morfologi antara lain saat kecil hidupnya dilindungi oleh pasir, saat berukuran sedang hidup di permukaan karang yang beriak, dan saat dewasa lebih sering hidup di air yang

dalam. Memiliki podia pada permukaan dorsal yang kecil dan jarang. Tentakel berwarna hitam dan anus terletak di ujung tanpa gigi atau papila. Spesies ini dapat dibedakaan dengan warna kemerahan yang dilepaskan ketika tubuhnya digosok (Purcell *et al*., 2012).

Holothuria atra dapat ditemukan pada kepadatan yang tinggi di perairan dangkal (pantai) dan memiliki kepadatan yang rendah di perairan yang dalam (laut). Dapat hidup di kedalaman antara 0 - 20 m tapi kebanyakan di kedalaman 0 – 5 m. Memiliki panjang tubuh antara 10 – 30 cm dengan ketebalan daging 4 mm. Rata-rata berat tubuhnya 0,2 kg (SPC, 2004).

Holothuria atra dapat hidup pada suatu perairan yang memiliki kisaran temperatur 31,3 – 39,4^{o} C. Spesies ini dapat memakan karang mati yang memiliki ukuran hingga 2 cm (Bakus, 1968). *Holothuria atra* aktif pada siang hari untuk mencari makan. Warna tubuh *H. atra* umumnya hitam dan sebagian besar permukaan tubuhnya tertutup oleh pasir (Bandaranayake dan Rocher, 1999). Menurut Yusron (2004), *H. atra* sengaja menempeli tubuhnya dengan pasir untuk menghindari tubuh mereka dari sinar matahari. Pasir tersebut akan memantulkan cahaya matahari dan membuat suhu tubuh teripang lebih rendah. Gambar *H. atra* dapat dilihat pada **Gambar 1** dan klasifikasinya menurut Zipcodezoo[a] (2012) adalah sebagai berikut :

Filum : Echinodermata
Sub filum : Echinozoa
Kelas : Holothuroidea
Sub kelas : Asphidochirotacea
Ordo : Aspidochirotida
Famili : Holothuriidae
Genus : *Holothuria*
Spesies : *Holothuria atra*

Gambar 1 *Holothuria atra* (Purcell *et al.,* 2012)

2.1.2 Kandungan Senyawa Bioaktif Teripang

Teripang diketahui mengandung berbagai jenis bahan aktif yang sangat berguna bagi manusia (Nurjannah *et al*., 2009). Menurut Wibowo *et al.,* (1997), bahan bioaktif di dalam teripang juga dikenal sebagai antioksidan yang membantu mengurangi kerusakan sel dan jaringan tubuh. Kandungan antibakteri dan antifungi teripang dapat meningkatkan kemampuannya untuk tujuan perawatan kulit. Teripang juga diketahui mempunyai efek anti-nosiseptif (penahan sakit) dan anti-inflamasi (melawan radang dan mengurangi pembengkakan).

Kaswandi *et al*., (2000) melaporkan bahan aktif yang dihasilkan oleh *Holothuria* sp. sebagai antibakteri dan antifungi. Dari hasil penelitiannya disimpulkan bahwa bahan aktif dari teripang *Holothuria tubolosa* tersebut dapat menghambat pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*.

Bordbar *et al*., (2011) melaporkan bahwa ekstrak dari *Holothuria scabra* di Asia menunjukkan aktivitas antimikroba, antibakteri, dan antijamur. Ditambahkan Farrouk *et al.,* (2007), teripang mengandung bahan aktif antitumor dan antikoagulan. Menurut Han *et al.,* (2009) senyawa yang biasa terkandung dalam teripang adalah *triterpene glycoside*. Senyawa *triterpene glycoside* yang terdapat dalam teripang ternyata bermanfaat sebagai anti tumor, anti jamur, anti bakteri dan anti virus.

2.2 Pelarut

Menurut Susanto (1999), jumlah pelarut berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi, tetapi jumlah yang berlebihan tidak akan mengestrak lebih banyak, dalam jumlah tertentu pelarut dapat bekerja optimal. Pemilihan pelarut untuk ekstraksi harus mempertimbangkan banyak faktor. Pelarut harus memenuhi syarat-syarat sebagai berikut : murah dan mudah diperoleh, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif, dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat.

Menurut Hikmah (2007), ada dua pertimbangan utama dalam memilih jenis pelarut yaitu pelarut harus mempunyai daya larut yang tinggi dan pelarut yang tidak berbahaya atau tidak beracun. Pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi adalah aseton, etil diklorida, etanol, heksana, isopropyl alcohol, dan metanol. Pada umumnya ekstraksi dilakukan secara berturut-turut mulai dengan pelarut non polar (n-heksan) lalu pelarut yang kepolarannya menengah (diklorometan atau etil asetat) kemudian pelarut yang bersifat polar (etanol atau metanol). Jenis-jenis pelarut yang banyak digunakan dalam proses ekstraksi senyawa dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1 Jenis Pelarut Untuk Ekstraksi Senyawa Aktif

Air	Etanol	Metanol	Klorofom	Dikloro Etanol	Eter	Aseton
Antosianin Pati Tanin Saponin Terpenoid Polipeptida Lectin	Tanin Polipenol Poliasetilen Flavonol Terpenoid Sterol Alkaloid Propolis	Antosianin Terpenoid Saponin Tanin Xanthosillin Totarol Quassinoid Lakton Flavon Phenone Polifenol	Terpenoid Flavonoid	Terpenoid	Alkaloid Terpenoid Coumarin Asam Lemak	Falavon

Sumber : Kusumaningtyas (2008)

2.2.1 Metanol

Metanol juga dikenal sebagai metil alkohol, *wood alcohol* atau spiritus, adalah senyawa kimia dengan rumus kimia CH_3OH. Ia merupakan bentuk alkohol paling sederhana. Pada "keadaan atmosfer" ia berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan daripada etanol). Metanol digunakan sebagai bahan pendingin anti beku, pelarut, bahan bakar dan sebagai bahan aditif bagi kebutuhan industri (Wikipedia[a], 2014). Karakteristik dari metanol dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2 Karakteristik Pelarut Metanol

Sifat Metanol	
Nomor RTECS	PC1400000
Rumus Molekul	CH_3OH
Massa Molar	32.04 g/ mol
Penampilan	Cairan tak berwarna
Densitas	0.7918 g/ cm^3
Titik Lebur	-97 ^oC
Titik Didih	64.7 ^oC
Kelarutan dalam air	Tercampur penuh
Keasaman	15.5
Viskositas	0.59 mPa.s (20^Oc)
Momen dipole	1.69 D (gas)
Klasifikasi EU	Mudah terbakar (F), Toxic (T)
Titik nyala	11^o C

Sumber: Wikipedia[a] (2014).

Metanol merupakan senyawa polar yang disebut sebagai pelarut universal karena selain mampu mengekstrak komponen polar juga dapat mengekstrak komponen non polar. Pelarut metanol paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam (Guenther, 1987). Menurut Thompson *et al.,* (1985), metanol dapat menarik senyawa alami seperti alkaloid, steroid, saponin dan flavonoid. Ditambahkan oleh Kristranti *et al.,* (2008) dan Harborne (1996) bahwa senyawa falvonoid, saponin, tanin, triterpenoid, minyak atsiri, serta glikosida dapat tertarik dalam pelarut metanol. Ini dikarenakan

metanol memiliki gugus polar (-OH) dan gugus nonpolar (-CH) sehingga dapat menarik analit-analit yang bersifat polar dan non polar.

2.2.2 DMSO (*Dimethyl-sulfoxide*)

Dimethyl-sulfoxide memiliki rumus kimia CH_3-S(=O)-CH_3 dengan massa jenis 1,092 g/ml. Menurut Hastari (2012), faktor lain yang dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan koloni bakteri adalah pelarut ekstrak. Salah satu zat yang sering digunakan untuk melarutkan ekstrak adalah *Dimethyl-sulfoxide* (DMSO). *Dimethyl-sulfoxide* (DMSO) merupakan salah satu pelarut dalam uji antibakteri maupun uji antifungal suatu ekstrak atau obat baru. Ditambahkan oleh Handayani *et al.,* (2007), *Dimethyl-sulfoxide* merupakan salah satu pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa baik polar maupun non polar. Selain itu DMSO tidak memberikan daya hambat pertumbuhan bakteri sehingga tidak menganggu hasil pengamatan pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar.

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi digolongkan ke dalam dua bagian besar berdasarkan bentuk fase yang diekstraksi yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi cair padat. Ekstraksi cair padat terdiri dari beberapa cara yaitu maserasi, perkolasi dan ekstraksi sinambung. Proses ekstraksi senyawa antibakteri dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu aqueus phase dan organic phase. Ekstraksi aqueus phase dilakukan dengan pelarut air, sedangkan ekstraksi organic phase menggunakan pelarut organic. Prinsip kelarutan yaitu polar melarutkan senyawa polar, pelarut semi polar melarutkan senyawa semi polar, dan pelarut non polar melarutkan senyawa non polar (Harborne, 1996).

Maserasi adalah cara ekstraksi yang paling sederhana. Bahan yang dihaluskan sesuai dengan syarat-syarat fermakope (umumnya terpotong-potong atau berupa serbuk kasar) disatukan dengan bahan pengekstraksi. Selanjutnya rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya (mencegah reaksi yang dikatalis cahaya atau perubahan warna) dan diaduk kembali (Singkoh, 2011).

2.4 Aktivitas Antibakteri

Menurut Jawetz *et al*., (2001), antimikroba harus memenuhi syarat-syarat sebagai berikut : (1) mempunyai kemampuan untuk mematikan atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang luas (*broad spectrum antibacteria*), (2) tidak menimbulkan terjadinya resistensi dari mikroorganisme patogen, (3) tidak menimbulkan efek samping (*side effect*) yang buruk pada tubuh seperti reaksi alergi, kerusakan syaraf, iritasi lambung, dan sebagainya, serta (4) tidak mengganggu keseimbangan flora normal tubuh seperti flora usus atau flora kulit.

Antibakteri adalah obat atau senyawa yang digunakan untuk membunuh bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia. Suatu antibakteri yang ideal memiliki toksisitas selektif, berarti obat antibakteri tersebut hanya berbahaya bagi bakteri, tetapi relatif tidak membahayakan bagi hospes. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan ada yang bersifat membunuh bakteri (bakterisida). Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakterisida bila kadar antibakterinya ditingkatkan melebihi KHM (Setiabudy dan Gan, 1995).

2.4.1 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan. Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas (Kusmiyati dan Agustini, 2006). Uji cakram diperkenalkan oleh Willian Kirby dan Alfred Bauer pada tahun 1966. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan di atas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme (Lay, 1994). Menurut Jawetz *et al*. (2001), semakin besar diameternya maka semakin terhambat pertumbuhannya, sehingga diperlukan standar acuan untuk menentukan apakah bakteri itu resisten atau peka terhadap suatu antibiotik. Faktor yang mempengaruhi metode Kirby-Bauer (1996) antara lain : (1) konsentrasi mikroba uji, (2) konsentrasi antibiotik yang terdapat dalam cakram, (3) jenis antibiotik, serta (4) pH medium.

Prinsip metode pengenceran adalah senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri, yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Larutan uji senyawa antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji, ditetapkan sebagai kadar hambat minimal (KHM) atau *minimal inhibitory concentration* (MIC). Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan bakteri uji ataupun senyawa antibakteri, dan diinkubasi selama 18 - 24 jam. Media cair yang tetap terlihat

jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai kadar bunuh minimal (KBM) atau *minimal bactericidal concentration* (MBC) (Pratiwi, 2008).

2.4.2 Mekanisme Penghambatan Antibakteri

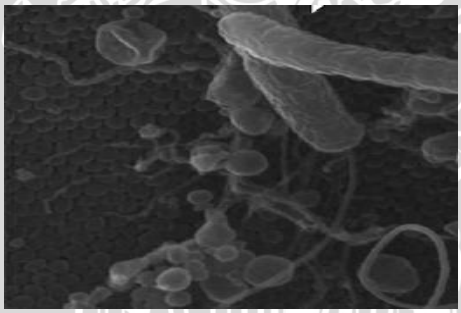
Menurut Pradhika (2008), mekanisme kerja antibakteri dalam menghambat ataupun membunuh bakteri adalah sebagai berikut: (1) menghambat sintesis dinding sel, (2) merusak permeabilitas membran sel, (3) menghambat sintesis RNA (proses transkripsi), serta (4) menghambat sintesis protein (proses translasi penghambat replikasi DNA).

Menurut Pelczar dan Chan (1986), pada umumnya mekanisme kerja antibakteri yaitu : (1) Merusak dinding sel yaitu dengan menghambat pembentukan dan mengubahnya setelah selesai terbentuk. Contoh: penisilin. (2) Mengganggu permeabilitas sel yaitu dengan merusak membran sel. Fungsi membran sel adalah mempertahankan bahan-bahan dalam sel serta mengatur aliran keluar masuknya bahan lain. Adanya kerusakan pada membran ini mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel. Contoh: polimiksin. (3) Merubah molekul protein dan asam nukleat yaitu dengan mendenaturasikan protein dan asam nukleat sehingga kerusakan sel tidak dapat diperbaiki lagi karena hidup suatu sel tergantung pada molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiah. Contoh: fenolat dan persenyawaan fenolat. (4) Menghambat kerja enzim dengan mengganggu reaksi biokimiawi. Penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme sel. Contoh: sulfonamid. (5) Menghambat sintesis asam nukleat dan protein. Gangguan pada pembentukan atau fungsi-fungsi DNA, RNA dan protein dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel, karena zat-zat tersebut memegang peranan penting dalam proses kehidupan normal sel. Contoh: tetrasiklin.

2.4.3 *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae termasuk bakteri gram negatif, berbentuk batang bengkok seperti koma dengan ukuran panjang 2 – 4 µm. *V. cholerae* dapat bergerak sangat aktif karena mempunyai satu flagella polar (mono trikh) yang halus. Bakteri ini tidak membentuk spora. Koloninya sering dijumpai berbentuk cembung, halus dan bulat keruh, dan bergranula bila disinari (Jawetz *et al*., 2001). Gambar *Vibrio cholerae* dapat dilihat pada **Gambar 2** dan klasifikasi menurut Zipcodezoo[b] (2012) adalah sebagai barikut :

Kingdom : Bacteria
Phylum : Proteobacteria
Class : Gamma Proteobacteria
Order : Vibrionales
Family : Vibrionaceace
Genus : Vibrio
Species : *Vibrio cholera*



Gambar 2 *Vibrio cholerae* (Krebs dan Taylor, 2011)

Vibrio cholerae merupakan bakteri fakultatif anaerob yang mempunyai suhu optimum pertumbuhan sekitar 18°C - 37°C. Sistim metabolismenya adalah respiratif maupun fermentatif. Bakteri ini tumbuh baik pada media sederhana yang mengandung sumber karbohidrat , bahan- bahan anorganik nitrogen, sulfur, phosphor dan berbagai macam mineral. Tingkat keasaman pH optimum untuk pertumbuhannya adalah 7, tetapi bakteri ini toleran pada pH alkalis sampai 9,0. Oleh karena itu pH alkalis ini dijadikan dasar untuk membuat media isolasi *Vibrio cholerae.* Pada tingkat keasaman pH asam ≤ 6,0 bakteri ini akan mati. Sebagai

media seletif untuk bakteri ini adalah TTGA/*tellurite taurocholate gelatin agar* atau TCBS/*thiosulfate citrate bile sucrose agar*. *Vibrio cholerae* umumnya memfermentasi sucrosa dan manosa tetapi tidak memfermentasi arabinosa (Joklik *et al.,* 1980).

2.5 Kromatografi Kolom

Prinsip kerja kromatografi kolom ialah kolom pemisah diisi dengan penyerap zat padat seperti alumina (fase tetap) dan dialiri dengan pelarut seperti benzene (fase bergerak) (Sastrohamidjojo, 1985). Pemisahan komponen secara kromatografi kolom dapat dilakukan dalam suatu kolom yang diisi dengan fase stasioner dan cairan (pereaksi) sebagai fase gerak untuk mengetahui banyaknya komponen sampel yang keluar melalui kolom (Adnan 1997). Pengisian kolom dilakukan dengan memasukkan adsorben dalam bentuk larutan (*slurry*), dan partikelnya dibiarkan mengendap (Handayani, 2007).

Komponen-komponen yang terdapat dalam sampel secara perlahan akan teradsorbsi pada fase diam dan bergerak keluar kolom. Pergerakan dalam kolom dipengaruhi oleh perbedaan kekuatan adsorbsi komponen-komponen tersebut oleh fase diam. Komponen yang diserap lemah oleh adsorben akan keluar lebih cepat bersama eluen, dan sebaliknya komponen yang diserap kuat akan keluar lebih lama (Sugara, 2010).

Pemisahan komponen suatu campuran tergantung pada tingkat kepolaran dari fase gerak dan senyawa yang terkandung dalam campuran tersebut (Singkoh, 2011). Ditambahkan menurut Sastrohamidjojo (1985), kecepatan bergerak dari suatu komponen tergantung pada berapa besarnya komponen terhambat atau tertahan oleh penyerap di dalam kolom. Jadi suatu senyawa yang diserap lemah akan bergerak lebih cepat daripada yang diserap

kuat. Akan terlihat bahwa jika perbedaan-perbedaan dalam serapak cukup besar maka akan terjadi pemisahan yang sempurna.

2.6 Identifikasi Senyawa Antibakteri

2.6.1 Spektrofotometer *Ultraviolet Visible* (UV-VIS)

Spektrofotometer sinar ultraviolet (UV-Vis) adalah pengukuran energi cahaya oleh suatu sistem kimia pada gelombang tertentu. Panjang gelombang sinar UV adalah antara 200 - 400 nm dan panjang gelombang sinar tampak yaitu 400 - 750 nm. Spektrofotometer UV-Vis lebih banyak digunakan untuk analisis kuantitatif dibanding analisis kualitatif karena pengukuran spektrofotometri ini menggunakan alat spektrofotometer yang melibatkan energy elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis (Rohman, 2007).

Menurut Sastrohamidjojo (1991), Spektrofotometer UV-Vis sangat bermanfaat dalam penentuan dosis senyawa-senyawa yang dapat menyerap radiasi pada daerah ultraviolet (200 - 400 nm) atau daerah sinar tampak (400 - 800 nm). Analisis ini dapat digunakan untuk penentuan absorbansi dari larutan sampel yang diukur.

Menurut Skoog (1998) secara keseluruhan, keunggulan analisis menggunakan UV Vis dibanding alat konvensional lainnya adalah : (a) penggunaannya luas, dapat digunakan untuk senyawa organik, anorganik dan biokimia yang diabsorbsi di daerah ultra lembayung atau daerah tampak, (b) sensivitasnya tinggi, batas deteksi untuk mengabsorobsi pada jarak 10^{-4} sampai 10^{-5} m. Jarak ini dapat diperpanjang menjadi 10^{-6} sampai 10^{-7} m dengan prosedur modifikasi yang pasti, (c) selektivitasnya sedang sampai tinggi, jika panjang gelombang dapat ditemukan dimana analit dapat mengabsorobsi sendiri, persiapan pemisahan menjadi tidak perlu, (d) ketelitiannya naik, kesalahan

relative pada dosis yang ditemui dengan 3 spektrofotometer UV Vis ada pada jarak dari 1 % sampai 5 %. Kesalahan tersebut dapat diperkecil hingga beberapa puluh persen dengan perlakuan yang khusus, (e) mudah, spektrofotometer mengukur dengan mudah dan kinerjanya cepat dengan instrumen modern, daerah pembacaan otomotis.

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

Metode spektrofotometer FT-IR biasa digunakan dalam mendeteksi gugus fungsional, mengidentifikasi senyawa dan menganalisis campuran (Day dan Underwood, 1989). Menurut Widodo (2007), jika kita mempunyai senyawa yang tidak diketahui yang memiliki gugus-gugus fungsional yang ingin diidentifikasi, kita dapat menguji struktur IR nya dan menggunakan data korelasi untuk mendeduksi gugus fungsional apa yang terdapat dalam senyawa tersebut.

Spektrofotometri *infrared* merupakan alat bantu yang digunakan untuk mengidentifikasi macamnya ikatan yang terdapat dalam suatu senyawa. Dengan mengetahui macamnya ikatan kovalen yang ada dan yang tidak ada, maka gugus fungsional dalam suatu struktur dapat diperkirakan, misalnya jika suatu senyawa memiliki ikatan O-H, maka senyawa tersebut dapat berupa asam karboksilat (RCO2H), alcohol (ROH) atau senyawa fenol (ArOH). Skala pada dasar spektra adalah bilangan gelombang, yang berkurang dari 4000 cm^{-1} sampai 670 cm^{-1} atau lebih rendah. Daerah antara 1400 - 4000 (2.5 sampai kira-kira 7.1 miyum), bagian kiri spectruminfra merah merupakan daerah yang khusus berguna untuk identifikasi gugus-gugus fungsional. Daerah ini menunjukkan absorbansi yang disebabkan oleh modus uluran. Di daerah kanan 1400 cm^{-1} sering kali sangat rumit karena adanya modus uluran maupun modus tekukan di daerah tersebut. Dalam daerah ini biasanya korelasi suatu pita dan suatu gugus

funsional spesifik tak dapat ditarik dengan cermat namun tiap senyawa organik memiliki resapan yang unik di daerah ini (Fessenden and Fesseden, 1997).

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

Spektroskopi massa adalah alat yang berfungsi untuk menentukan dan mengidentifikasi komponen suatu senyawa. Alat ini dapat menginformasikan bobot molekul dan struktur senyawa organik. LC-MS (*liquid chromatography-mass spectrometry*) merupakan gabungan dari MS dan HPLC yang memiliki prisip kerja dimana sampel dipisahkan dalam kolom kemudian diuapkan pada suhu tinggi dan diionisasikan. Kemudian difragmentasi ion yang terbentuk sesuai dengan rasio massa/muatan (m/z) dan dideteksi secara elektrik (Maryam, 2007).

Spektrometer massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilih dan mengidentifikasi ion menurut massa, sesuai rasio fragmentasi mereka. Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion, dan analisis massa (*mass analyzer*) yang menseleksi ion. Sistem LC-MS umumnya menggunakan beberapa jenis *ion source* dan *mass analyzer* yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa. Masing-masing *ion source* dan *mass analyzer* memiliki kelebihan dan kekurangan sehingga harus disesuaikan dengan jenis informasi yang dibutuhkan (Anonymous-Agilent, 2001).

Kelebihan LC-MS menurut Vogeser dan Christoph (2008), antara lain : (a) Spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor. (b) Aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis. Berbeda dengan GC-MS sebagai spektometer massa “klasik”, penerapan LC-MS tidak terbatas untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul dibawah 500Da). Mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan

sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi. (c) Fleksibilitas. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat. (d) Kaya Informasi. Sejumlah data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian menggunakan teripang hitam (*Holothuria atra*) dari daerah perairan Pulau Talango, Madura. Bahan-bahan yang digunakan dalam proses ekstraksi dan isolasi antara lain metanol dan klorofom pro analisis MERCK, aquadest, bubuk dan plat silika gel 60 GF_{254} MERCK, kapas, kertas saring Whatman No 1, alumunium foil, pasir halus dan plastik wrap. Bahan yang digunakan untuk kultur bakteri adalah bakteri *Vibrio cholerae* biakan murni koleksi Fakultas Kodokteran Universitas Brawijaya, media *triptic soy agar* MERCK, media *triptic soy broth* MERCK, dan aquades. Untuk menguji daya hambat bakteri, bahan-bahan yang digunakan adalah fraksi metanol *Holothuria atra* yang diperoleh dari kromatografi kolom dengan berbagai konsentrasi, biakan *Vibrio cholera* koleksi Fakultas Kodokteran Universitas Brawijaya , media *muller hinton agar* MERCK, media *triptic soy agar* MERCK, media *triptic soy broth* MERCK, kertas cakram, *cotton swap* steril, DMSO 10 % MERCK, antibiotik *tetrasiklin* dan alkohol 70 %.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi dan isolasi *Holothuria atra* adalah erlemneyer 500 ml, *rotary vacuum evaporator* merk IKA, corong, timbangan digital, gelas ukur 100 ml, tabung kolom kromatografi, dan botol vial. Untuk kultur bakteri *Vibrio cholerae,* alat-alat yang diperlukan adalah cawan petri, erlenmeyer 500 ml, gelas ukur 100 ml, timbangan digital, ose, bunsen, *autoclave* dan incubator merk MEMMERT. Untuk pengujian daya hambat bakteri, alat-alat

yang diperlukan adalah mikropipet 0,1 mL, bunsen, pinset, vortex dan jangka sorong atau penggaris, dan tabung reaksi. Peralatan yang digunakan untuk purifikasi dan identifikasi senyawa antibakteri dari teripang hitam *Holothuria atra* adalah erlenmeyer 100 ml, tabung reaksi, spektrofotometer UV-Vis merk SHIMADZU dan FTIR merk SHIMADZU milik Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Brawijaya serta LC-MS merk HITACHI L 6200 milik Laboratorium Kimia LIPI Serpong.

3.2 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dan deskriptif. Hasan (2002) menyebutkan bahwa metode eksperimental memungkinkan peneliti memanipulasi variabel dan meneliti sebab akibatnya sedangkan deskriptif berarti mendeskripsikan variabel demi variabel, satu demi satu dengan tujuan untuk mengumpulkan informasi aktual secara rinci yang menggambarkan gejala yang ada, mengidentifikasi masalah atau memeriksa suatu kondisi dan membuat evaluasi.

Dugaan sementara dibuktikan dengan melakukan uji daya hambat fraksi metanol terbaik dari hasil isolasi sampel *Holothuria atra* pada konsentrasi berbeda terhadap *Vibrio cholerae*. Indikator yang ingin dicapai adalah adanya perbedaan diameter zona bening (zona penghambatan bakteri) pada setiap fraksi dan konsentrasi yang diberikan dimana semakin lebar zona bening, maka semakin efektif senyawa kimia dari sampel yang berhasil diisolasi.

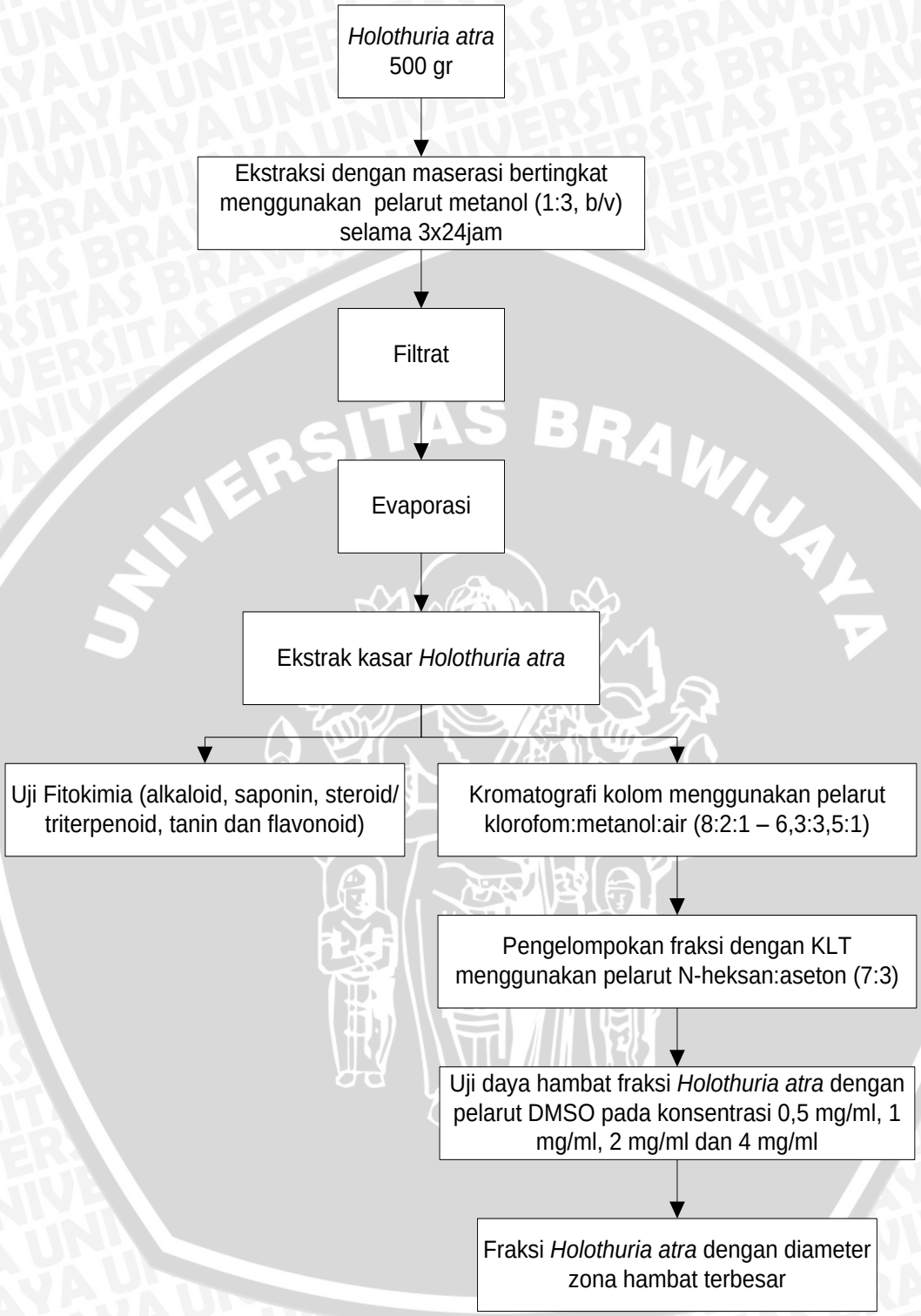
Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap antara lain penelitian pendahuluan yaitu ekstraksi teripang hitam (*Holothuria atra*) dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak yang diperoleh diuji fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada sampel sebagai

identifikasi awal dalam penentuan metode isolasi. Kemudian ekstrak *H. atra* diisolasi dengan kromatografi kolom menggunakan pelarut pengembang tertentu dan dikelompokan berdasarkan noda yang terbentuk pada kromatografi lapis tipis. Fraksi-fraksi yang telah dikelompokan menjadi fraksi besar dilanjutkan dengan uji daya hambat terhadap bakteri *Vibrio cholerae*. Hasil penelitian pendahuluan adalah fraksi metanol *Holothuria atra* yang menghasilkan daya hambat terbaik terhadap bakteri *Vibrio cholerae*.

Penelitian utama yaitu uji daya hambat fraksi metanol *Holothuria atra* yang memiliki daya hambat terbaik hasil dari penelitian pendahuluan. Fraksi terbaik dibuat menjadi beberapa konsentrasi untuk mengetahui efektivitas daya hambat. Selanjutnya diidentifikasi fraksi terpilih dengan spektrofotometri UV-Vis, FTIR dan LCMS.

3.2.1 Penelitian Pendahuluan

Kegiatan dalam penelitian pendahuluan meliputi uji fitokimia ekstrak *Holothuria atra*, isolasi senyawa yang terdapat pada *Holothuria atra*, dan uji daya hambat fraksi-fraksi yang diperoleh dari proses isolasi terhadap bakteri *Vibrio cholerae*. Diagram alir proses penelitian pendahuluan dapat dilihat pada **Gambar 3**.



Gambar 3 Diagram Alir Penelitian Pendahuluan

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian pendahuluan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktorial dengan 3 kali ulangan. Faktor pertama adalah penggunaan fraksi metanol *Holothuria atra* dan antibiotik *Tetrasiklin*. Faktor kedua adalah konsentrasi yang dibuat berbeda (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml). Pengamatan dilakukan terhadap zona hambat bakteri yang terbentuk dari setiap perlakuan. Rumus model linier untuk Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktorial yang digunakan adalah:

$$Yijk = \mu + \alpha i + \beta j + (\alpha\beta)ij + \varepsilon ijk$$

Keterangan:

Yijk = Hasil pengamatan faktor A taraf ke-i, faktor B taraf ke-j, pada ulangan ke-k
μ = Rataan umum
αi = Pengaruh faktor A pada taraf ke-i
βj = Pengaruh faktor B pada taraf ke-j
(αβ)ij = Interaksi antara A dan B pada faktor A taraf ke-i, faktor B taraf ke-j
εijk = Galat percobaan untuk faktor A taraf ke-I, faktor B level ke-j pada ulangan ke-k

3.2.1.1 Prosedur Penelitian Pendahuluan

– **Ekstraksi *Holothuria atra* (Rasyid, 2012; Albuntana *et al*., 2011)**

Sampel segar teripang hitam (*Holothuria atra*) sebanyak 500 gram dibersihakan dan dibuang isi perutnya. Selanjutnya teripang dipotong kecil-kecil dan diangin-anginkan agar kadar air pada tubuh teripang berkurang. Ekstraksi yang dilakukan dengan menggunakan metode maserasi yaitu merendam teripang segar dengan pelarut metanol (1:3 b/v). Maserasi dilakukan selama 3 kali 24 jam, dengan mengganti pelarut baru setiap harinya. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman No. 1 dan pemekatan menggunakan *rotary evaporator* vakum pada suhu 40^{o} C dan 100 rpm. Ekstrak kasar kemudaian diangin-anginkan diatas *waterbath* untuk menguapkan sisa

metanol sehingga ekstrak terbebas dari pelarut. Ekstrak metanol *H. atra* disimpan pada suhu 4^{o} C untuk digunakan pada analisis selanjutnya.

– **Uji Fitokimia Ekstrak Metanol *Holothuria atra***

Untuk identifikasi senyawa alkaloid, sebanyak 1 gram ekstrak teripang ditambah dengan 3 tetes amonia 10% dan 1,5 ml kloroform, lalu dikocok. Lapisan kloroform diambil kemudian dilarutkan dalam 1 ml asam sulfat 2 N, kemudian dikocok. Setelah itu, ekstrak ditambahkan dengan pereaksi Meyer, Wagner, dan Dragendroff. Terbentuknya endapan putih (pereaksi Meyer), coklat (pereaksi Wagner, dan jingga (pereaksi Dragendroff) menandakan adanya senyawa alkaloid (Harborne, 1996).

Untuk identifikasi senyawa steroid dan triterpenoid, sebanyak sebanyak 1 gram ekstrak metanol teripang dimasukan dalam suatu tabung rekasi dan ditambah dengan 2 ml kloroform, kemudian larutan diambil dan diteteskan ke dalam tabung reaksi lainnya, dan dibiarkan sampai kering. Setelah itu, ditambahkan dengan 1 tetes pereaksi Liebermann-Burchard. Terbentuknya warna merah atau coklat keunguan menandakan adanya senyawa triterpenoid dan terbentuknya warna biru atau ungu menandakan adanya senyawa steroid (Harborne, 1996).

Untuk identifikasi senyawa saponin, sebanyak 1 gram ekstrak metanol teripang dimasukan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 20 ml akuades, kemudian dipanaskan selama 5 menit. Larutan dituang ke dalam tabung reaksi lainnya dalam keadaan panas sebanyak 10 ml kemudian dikocok kuat secara vertical selama 10 detik. Adanya saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil setinggi 1-10 cm selama 10 menit dan tidak hilang pada saat ditambahkan dengan satu tetes HCl 2 N (Harborne, 1996).

Untuk uji tanin, ekstrak uji sebanyak 1 ml direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%, jika terjadi warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol dan tanin (Robinson, 1995).

Untuk uji flavonoid, sebanyak 1 gram ekstrak metanol teripang diekstrak dengan 5 ml etanol dan dipanaskan selama lima menit di dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah beberapa tetes HCL pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 g bubuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua selama 3 menit (Sangi *et al.*, 2008).

– **Isolasi Ekstrak Metanol *Holothuria atra* dengan Kromatografi Kolom (Han *et al*., 2012; Matsuno dan Miyuki, 1995)**

Pemisahan senyawa yang terdapat pada *Holothuria atra* dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom dan dilanjutkan dengan kromatografi lapis tipis untuk mengelompokan fraksi-fraksi yang diperoleh. Fraksinasi pada kolom kromatografi menggunakn fase diam *silica gel* 60 GF_{254} sedangkan fase gerak yang digunakan adalah kloroform:metanol:air (8:2:1 – 6,5:3,5:1). Fase diam dibuat dengan cara mencampurkan sebanyak 40 gr bubuk *silica gel* dengan 100 ml fase gerak kemudian diaduk dengan menggunakan *stirer* hingga didapatkan bubur *silica gel*. Bubur *silica gel* dimasukan secara perlahan dan tidak boleh terputus kedalam tabung kolom kromatografi agar tidak terbentuk gelembung udara. Tabung kromatografi kolom diketuk-ketuh dan diberi pasir halus sebagai pelapis, selanjutnya ditunggu hingga *silica gel* memadat sempurna. Ekstrak kasar *Holothuria atra* dilarutkan dengan fase gerak kemudian dimasukan secara perlahan kedalam tabung kolom kromatografi. Katup pada tabung kolom kromatografi dibuka dan tetesan yang keluar ditampung pada tabung reaksi setiap 5 ml.

Untuk identifikasi awal senyawa dan pengelompokan fraksi dilakukan uji menggunakan plat kromatografi lapis tipis. Plat yang digunakan adalah plat *silica gel* 60 GF_{254} MERCK dengan ukuran panjang 5 cm dan lebar 1 cm. Plat tersebut diberi jarak tepi bawah 1 cm dan tepi atas 0,5 cm sehingga didapatkan jarak tempuh 3,5 cm. Fase gerak yang digunakan adalah n-heksan: aseton (7:3). Fraksi-fraksi yang diperoleh kemudian ditotolkan pada batas bawah menggunakan pipa kapiler. Kemudian plat diculupkan kedalam bejana kromatografi yang berisi fase gerak. Ditutup rapat bejana dan dibiarkan fase gerak naik hingga batas atas plat *silica gel*. Plat selanjutnya disemprot dengan H_2SO_4 15 % dalam etanol dan dipanaskan. Diamati noda yang terbentuk dan dicatat nilai *Rf*.

– **Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi-Fraksi *Holothuria atra* terhadap Bakteri *Vibrio cholera* (Lay, 1994)**

Metode yang digunakan dalam uji aktivitas antimikroba fraksi *Holothuria atra* adalah metode difusi kertas cakram. Uji cakram yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba dan dibandingkan dengan antibiotik *tetrasiklin*. Cawan petri dengan media *Muller Hinton Agar* disiapkan untuk disebar dengan bakteri uji. Kapas lidi (*cotton swab*) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji dengan kepadatang sesuai dengan *McFarland* 0,5, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut. Mikroorganisme kemudian disebar pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar, kemudian cawan petri diputar 90^o dan dibuat olesan kedua, lalu cawan petri diputar lagi 45^o dan dibuat olesan ketiga. Cawan petri dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit,

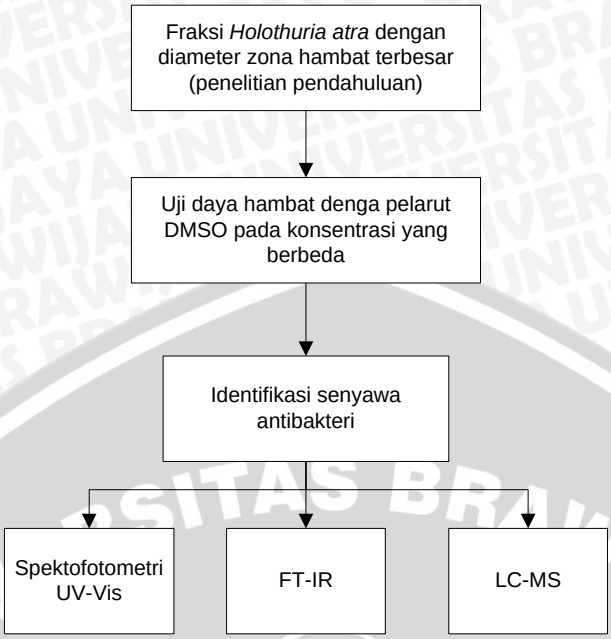
kemudian tempatkan kertas cakram yang sudah direndam sampel dengan berbagai konsentrasi yang diujikan pada permukaan cawan petri. Konsentrasi yang digunakan adalah 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, dan 4 mg/ml. Cawan petri yang sudah ditempelkan kertas cakram diinkubasi pada suhu 37^{o} C selama 24 jam. Setelah bakteri uji sudah tumbuh merata dan terlihat adanya zona jernih di permukaan agar, maka luas zona jernih dapat diukur dengan mengukur diameternya.

3.2.1.2 Parameter Uji Penelitian Pendahuluan

Parameter yang digunakan dalam penelitian pendahuluan yaitu parameter kuantitafif berdasarkan data yang diperoleh dari uji daya hambat fraksi metanol *Holothuria atra* pada konsentrasi berbeda. Penentuan daya hambat dilakukan dengan mengukur diameter (mm) area bening di sekitar kertas cakram menggunakan penggaris atau jangka sorong. Zona bening yang terbentuk menandakan adanya aktivitas antibakteri dari tiap sampel uji. Parameter tersebut yang akan menentukan fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar dan konsetrasi terbaik.

3.2.2 Penelitian Utama

Kegiatan penelitian utama meliputi uji daya hambat fraksi terbaik hasil penelitian pendahuluan dan identifikasi senyawa antibakteri melalui uji spektrofotometri UV-Vis, FTIR dan *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*. Diagram alir penelitian utama dapat dilihat pada **Gambar 4**.



Gambar 4 Diagram Alir Penelitian Utama

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian utama adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 kali ulangan. Faktor yang digunakan adalah perbedaan konsentrasi fraksi *Holothuria atra* terbaik (2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml), antibiotik *tetrasiklin* (kontrol +) dan DMSO 10% (kontrol -). Pengamatan dilakukan terhadap zona hambat bakteri yang terbentuk dari setiap perlakuan. Rumus model untuk Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana yang digunakan adalah:

$$Yij = \mu + \alpha i + \varepsilon ij$$

Keterangan:

Yij = Nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.
μ = Rataan umum
αi = Pengaruh perlakuan pada taraf ke-i
εij = Galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

3.2.2.1 Prosedur Penelitian Utama

– **Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Teraktif *Holothuria* atra terhadap Bakteri *Vibrio cholerae* (Lay, 1994)**

Metode yang digunakan dalam uji aktivitas antimikroba fraksi *Holothuria atra* terbaik hasil penelitian pendahuluan adalah metode difusi kertas cakram. Uji cakram yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba kemudian dibandingkan dengan antibiotik *tetrasiklin* (kontrol +) dan DMSO 10% (kontrol-). Cawan petri dengan media *Muller Hinton Agar* disiapkan untuk disebar dengan bakteri uji. Kapas lidi (*cotton swab*) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji dengan kepadatang sesuai dengan *Mc Farland* 0,5, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut. Mikroorganisme kemudian disebar pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar, kemudian cawan petri diputar 90^o dan dibuat olesan kedua, lalu cawan petri diputar lagi 45^o dan dibuat olesan ketiga. Cawan petri dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit, kemudian tempatkan kertas cakram yang sudah direndam sampel dengan berbagai konsentrasi yang diujikan pada permukaan cawan petri. Konsentrasi yang digunakan adalah 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, antibiotik *tetrasiklin* 4 mg/ml (kontrol +) dan DMSO 10% (kontrol -). Cawan petri yang sudah ditempelkan kertas cakram diinkubasi pada suhu 37^o C selama 24 jam. Setelah bakteri uji sudah tumbuh merata dan terlihat adanya zona jernih di permukaan agar, maka luas zona jernih dapat diukur dengan mengukur diameternya.

– **Identifikasi Senyawa Antibakteri Fraksi Teraktif *Holothuria Atra***

Fraksi *Holothuria atra* yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar diidentifikasi senyawanya menggunakan spektrofotometri UV-Vis, FTIR dan *Liquid Chromatograhpy Mass Spectrometry*. Hasil yang diperoleh kemudian digunakan untuk mendeskripsikan senyawa yang diduga memiliki aktivitas antibakteri.

3.2.2.2 Parameter Uji Penelitian Utama

Penentuan daya hambat fraksi metanol *Holothuria atra* terbaik dilakukan mengukur diameter (mm) areal bening di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong atau penggaris. Zona bening yang berada di sekitar kertas cakram yang terlihat setelah inkubasi menunjukkan adanya aktivitas antimikroba. Selain itu hasil dari analisa spektrofotometri UV-Vis, FT-IR, dan LC-MS dijadikan panduan mengidentifikasi senyawa-senyawa pada fraksi *Holothuria atra*.

3.2.3 Analisis Data

Dalam pengolahan data hasil penelitian untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diukur digunakan *software SPSS 16.0*. Anilisis data pada penelitian pendahuluan menggunakan *Analysis of Varian* (ANOVA) dengan hubungan interaksi yang terjadi pada selang kepercayaan 95%, apabila berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT 5 %. Sedangkan untuk penelitian utama menggunakan *Analysis of Varian* (ANOVA) *One Way* dengan selang kepercayaan 95%, apabila berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT 5 %.

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^{o} C dan kecepatan putaran 100 rpm. Agar seluruh pelarut hilang, hasil pemekatan menggunakan *rotary evaporator* vakum kemudian di panaskan kembali pada suhu 40^{o} 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**).

a. **b.** **c.**

Gambar 5 Ekstraksi *H. atra* : a.) proses maserasi, b.) filtrat hasil maserasi dan c.) ekstrak kasar

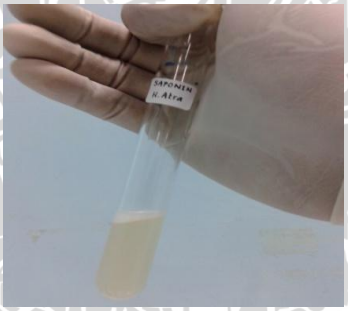
4.1.2 Uji Fitokimia Ekstrak Metanol *Holothuria atra*

Pengujian fitokimia merupakan uji kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder yang diduga terkandung didalam *H. atra*. Uji fitokimia yag 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*.

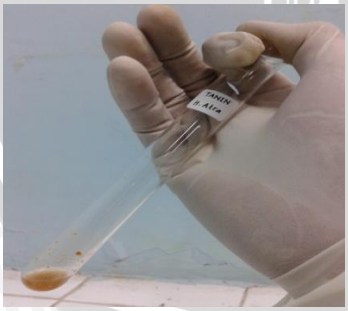
Hasil uji fitokimia menunjukan adanya senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam tubuh *H. atra* (**Gambar 6**). Senyawa-senyawa yang terdeteksi antara lain alkaloid, saponin dan triterpenoid, sedangkan senyawa tanin dan flavonoid tidak terdeteksi (**Tabel 3**). Hasil ini sesuai dengan penelitian 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 steroi/triterpenoid pada teripang. Tidak terdeteksinya flavonoid dan tanin dikarenakan jenis senyawa metabolit sekunder ini sebagaian besar terdapat pada jenis tumbuh-tumbuhan.

a.



b.

c.



d.

e.

Gambar 6 Uji Fitokimia Ekstrak Metanol *H. atra* : a.) alkaloid, b.) saponin, c.) triterpenoid, d.) tanin, dan e.) flavonoid

Tabel 3 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 sempel. Menurut Gholib (2009), alkaloid merupakan senyawa yang dapat berperan sebagai antimikroba, dimana senyawa ini dapat menghambat esterase, DNA dan RNA polymerase 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.

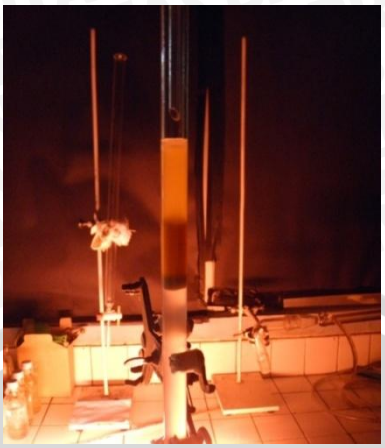
Terdeteksinya saponin ditentukan dengan terbentuknya busa dengan tinggi 1-10 cm dan apabila ditetesi dengan HCl 2N busa tidak hilang maka dapat dinyatakan positif saponin. Saponin merupakan senyawa yang memiliki potensi sebagai antimikroba alami. Menurut Hardiningtyas (2009), saponin dapat berinteraksi 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 shingga permeabilitasnya meningkat.

Positif triterpenoid ditunjukan 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 menunjukan 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 permeabititas 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* GF_{254} 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 pemisahaan dan pemurnian dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada **Gambar 7**.



Gambar 7 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 panjan 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 Rf yang diperoleh. Hasil dari isolasi dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4 Fraksi-Fraksi Ekstrak Metanol *H. atra* Hasil Kromatografi Kolom

No Botol	Warna	KLT		Fraksi
		Rf	Warna*	
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	
8	Jingga bening	0,51	Coklat	
9	Kuning	0,57	Coklat	B
10	Kuning bening	0,57	Coklat	
11	Kuning bening	0,57	Coklat	
12	Kuning bening	0,57	Coklat	

Tabel 5 (lanjutan) Fraksi-Fraksi Ekstrak Metanol *H. atra* Hasil Kromatografi Kolom

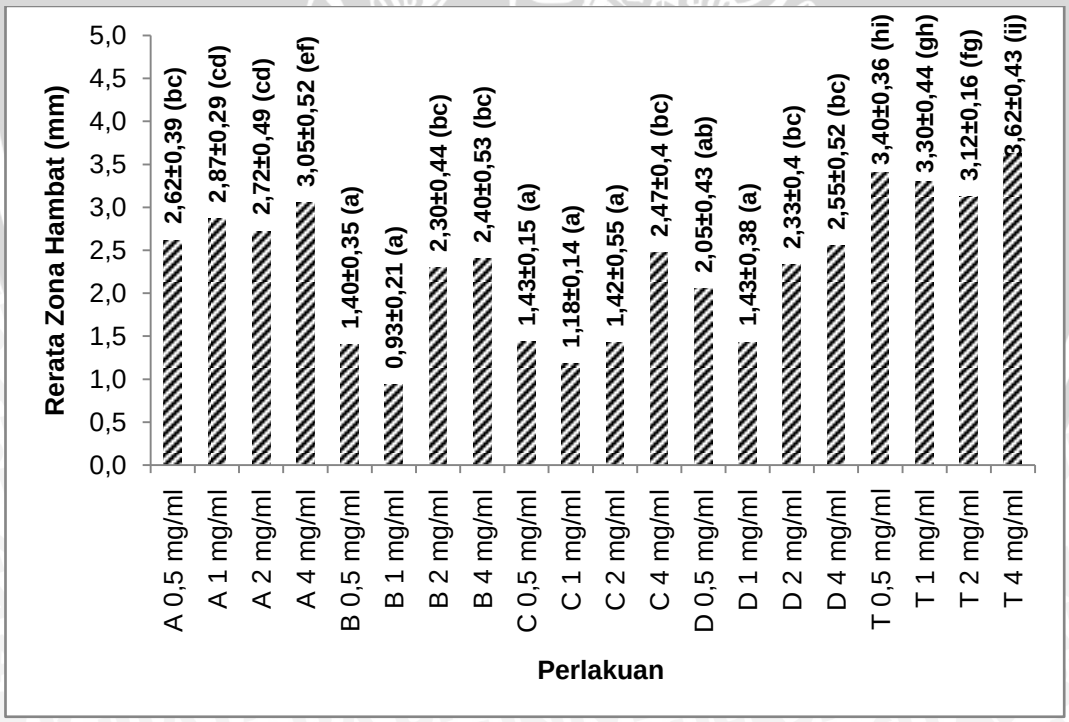
No Botol	Warna	KLT		Fraksi
		Rf	Warna*	
13	Bening	0,23	Coklat	C
14	Bening	0,23	Coklat	
15	Kuning Bening	0,23	Coklat	
16	Bening	0,23	Coklat	
17	Bening	0,23	Coklat	
18	Jingga bening	0,08	Ungu	D
19	Jingga bening	0,08	Ungu	
20	Kuning bening	0,08	Coklat	
21	Kuning bening	0,08	Coklat	
22	Bening	0,14	Coklat	
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 H_2SO_4

Hasil kromatografi lapis tipis (**Lampiran 3**) menunjukan 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 dikelompokan menjadi fraksi besar yaitu fraksi A. Fraksi no 9-12 pada KLT menghasilkan warna coklat dan nilai Rf 0,57. Selanjutnya fraksi-fraksi ini dikelompokan menjadi fraksi B. Fraksi no 13-17 dikelompokan 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. Konsetrasi 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 kontol 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 8 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 ± 0,21 mm. Sedangkan rata-rata zona hambat terbesar dimiliki oleh fraksi A dengan konsentrasi 4 mg/ml yaitu sebesar 3,05 ± 0,52 mm.

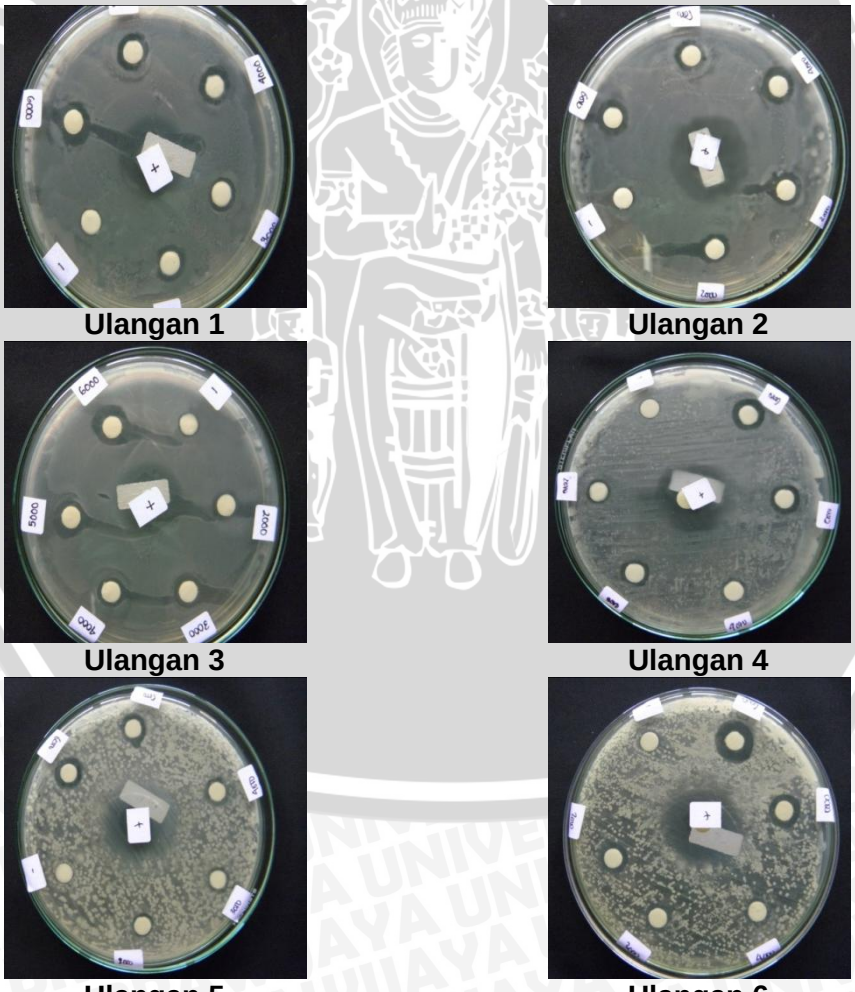
Data dari hasil uji ANOVA dua arah penelitian pendahulan (**Lampiran 4**) antara fraksi dengan konsentrasi yang diberikan diperoleh nilai F hitung sebesar 2,172 dan probabilitasnya sebesar 0,033 lebih kecil dari 0,05. Dengan demikian terbukti bahwa interaksi antara fraksi dan konsentrasi nyata. Dapat 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**) menunjukan perlakuan kombinasi antara fraksi A dengan konsentrasi 4 mg/ml merupakan perlakuan terbaik. Perlakuan ini mampu menghasilkan zona hambat terbesar yaitu 3,05 ± 0,52 mm dan mampu menyetarai hasil perlakuan antibiotik *tetrasiklin* dengan konsentrasi 2 mg/ml sebagai kontrol potitif. 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 menunjukan 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 kontol negatif digunakan DMSO 10%. Hasil pengamatan daya hambat penelitian utama dapat dilihat pada **Gambar 9**.



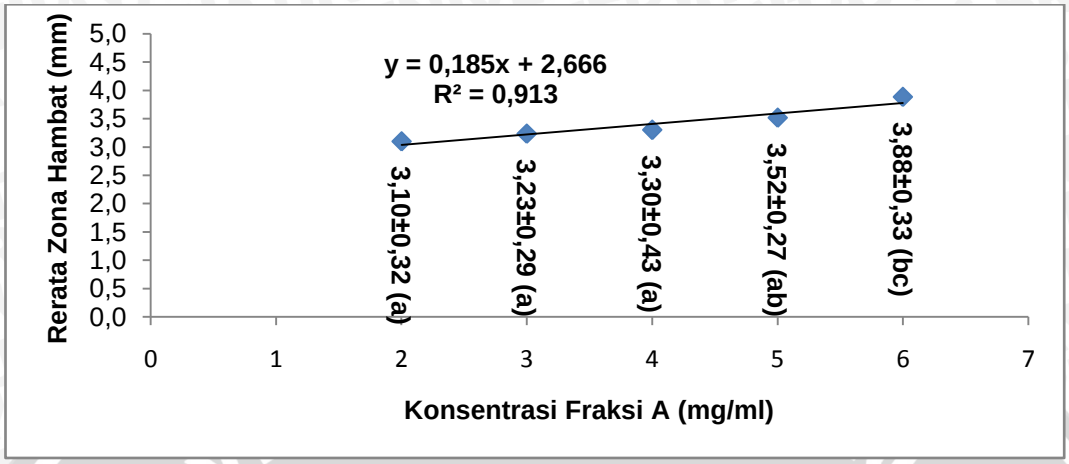
Ulangan 1 **Ulangan 2**

Ulangan 3 **Ulangan 4**

Ulangan 5 **Ulangan 6**

Gambar 9 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 10 Grafik Rerata Hasil Zona Hambat dan Hasil Uji BNT 5 % Fraksi A *H. atra*

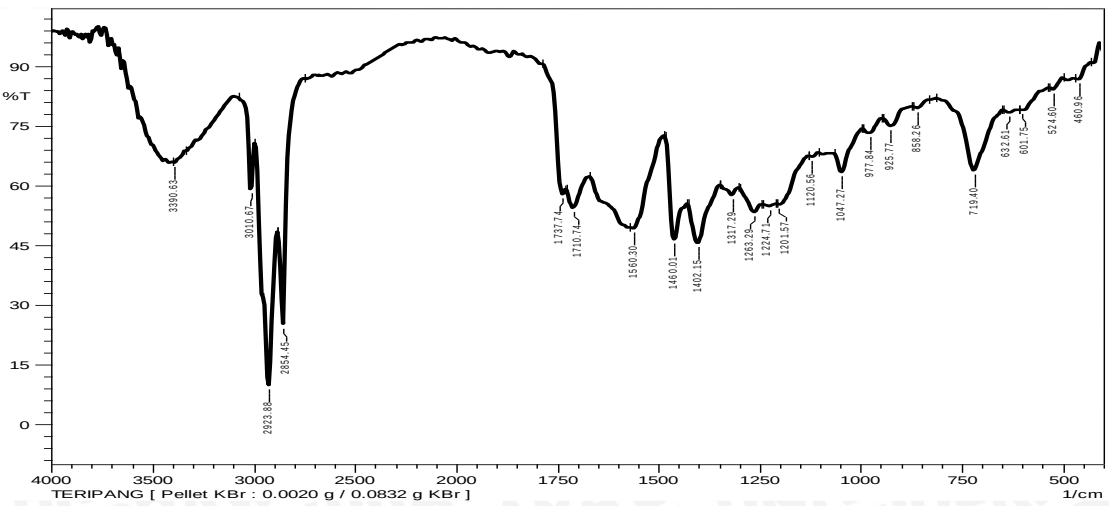
Dari grafik diatas diketahui rata-rata zona hambat yang terbesar dihasilkan oleh fraksi A pada konsentrasi 6 mg/ml yaitu sebesar 3,88 ± 0,33 mm. Sedangkan rata-rata zona hambat terkecil dihasilkan oleh fraksi A pada konsentrasi 2 mg/ml yaitu sebesar 3,10 ± 0,32 mm. Hasil uji ANOVA *One Way* (**Lampiran 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**) menunjukan 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 menunjukan 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 11 Spektrum FT-IR Fraksi A *H. atra*

Tabel 6 Gugus Fungsional Pita Serapan FT-IR Fraksi Teraktif *H. atra*

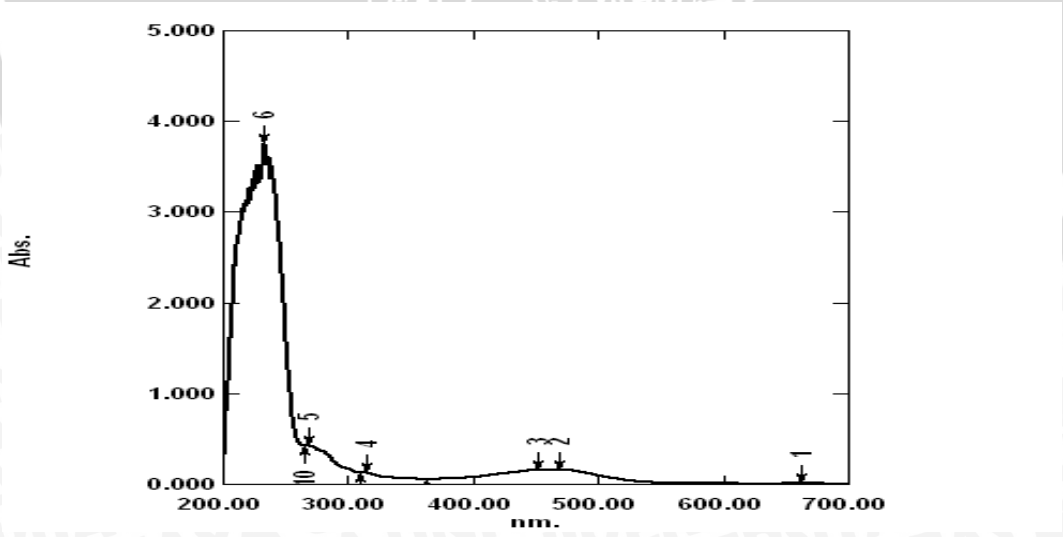
Gugus Fungsional	Daerah serapan: Fraksi A *H.atra*	Daerah serapan: Pustaka (Silverstrein *et al*., 1986; Sastrohamidjojo, 1992)	Jenis Ikatan
O-H	3390,63 cm^{-1}	2400-3400 cm^{-1}	
C-H alifatik	3010,67 cm^{-1}	2850-3159 cm^{-1}	Alkana,
	2923,88 cm^{-1}		Alkena, Aromatik
	2854,45 cm^{-1}		
$-CH_2$, $-CH_3$	1460,01 cm^{-1}	1375-1465 cm^{-1}	Alkana
	1402,15 cm^{-1}		
=C-H	1560.30 cm^{-1}	1475-1600 cm^{-1}	Alkena, Aromatik
	977,84 cm^{-1}	650-1000 cm^{-1}	
	925,77 cm^{-1}		
	858,26 cm^{-1}		
	719,40 cm^{-1}		
C=O	1737,74 cm^{-1}	1700-1750 cm^{-1}	Asam karboksilat,
	1710,74 cm^{-1}		Ester
C-O	1263,29 cm^{-1}	1000-1300 cm^{-1}	Alkohol,
	1224,71 cm^{-1}		Asam karboksilat,
	1201,57 cm^{-1}		Ester
	1120,56 cm^{-1}		
	1047,27 cm^{-1}		

Gambar diatas menunjukan 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 CH_3-CH_2. 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 karbiksilat 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 cm^{-1} (Silverstrein *et al*., 1986; Sastrohamidjojo, 1992) .

Berdasarkan gugus-gugus yang terbentuk dari analisis FTIR, diduga senyawa yang terdapat pada isolat ektrak 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 menunjukan 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) menunjukan 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**.



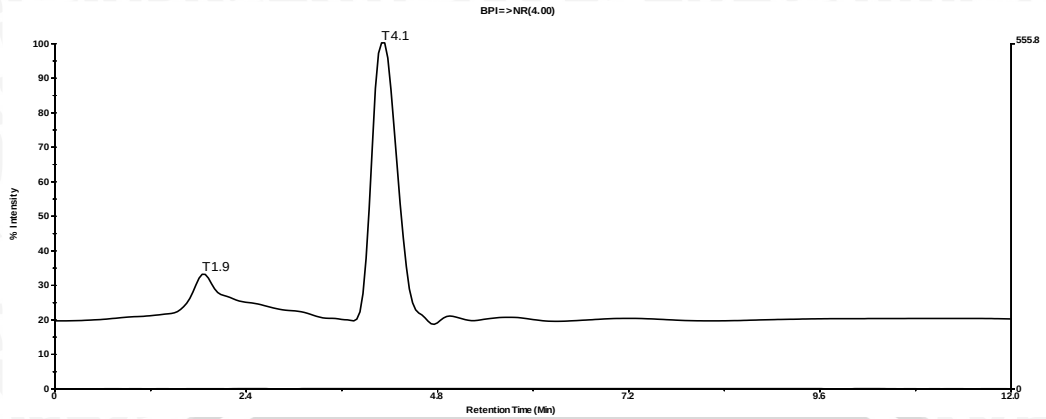
Gambar 12 Spektrum UV-Vis Fraksi A *H. atra*

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

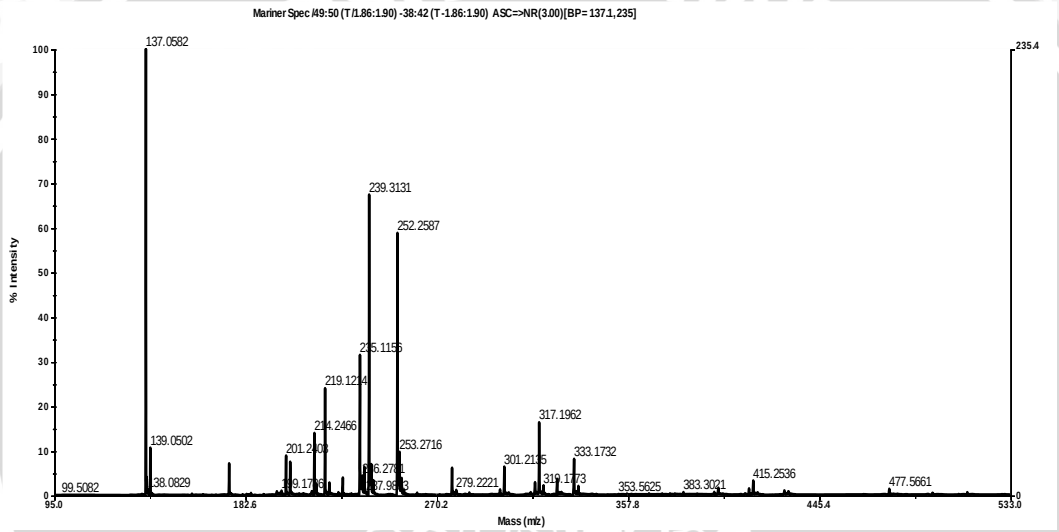
terjadi pada panjang gelombang 233 nm dengan nilai absorbansi sebesar 3,763. Pada panjang gelombang ini diduga terjadi transisi elektron dari π → π* yang disebabkan oleh adanya kromofor C=O . Hal ini diperkuat oleh data spektrofotometri inframerah yang menunjukan adanya gugus fungsi C=O pada daerah serapan 1737,74 cm^{-1} dan 1710,74 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 → π* 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 π → π* akan mengalami kenaikan panjang gelombang dan elektron dengan transisi n → π* akan mengalami penurunan panjang gelombang.

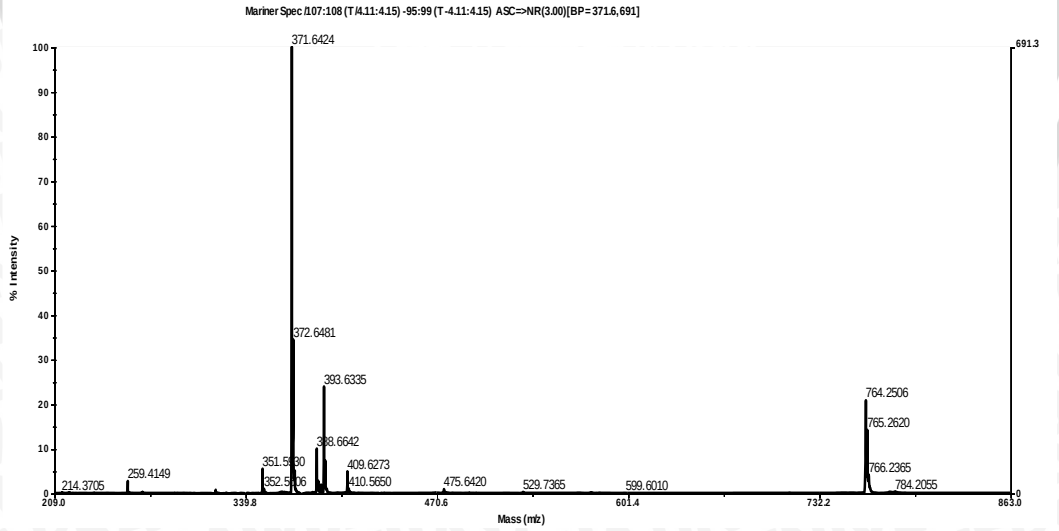
Analisis senyawa dilanjutkan dengan uji LC-MS untuk mengidentifikasi struktur senyawa dan berat molekul yang terdapat pada fraksi teraktif ekstrak metanol *H. atra*. Hasil uji LC-MS dengan metode ESI (+) menunjukan terbentuknya 2 puncak waktu retensi yang berbeda. Waktu retensi dengan intensitas yang 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 13 Spektrum LC Fraksi A *H. atra*



Gambar 14 Spektrum MS Rt 1,9 Fraksi A *H. atra*



Gambar 15 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 7 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)** menunjukan 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 $C_{30}H_{52}O_4$. Senyawa ini termasuk dalam golongan triterpenoid sapogenin tetracyclic.

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 $C_{48}H_{60}O_8$. 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* berdasarakan penelitian yang telah dilakukan, namun efek yang ditimbulkan oleh ektrak 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 cuverian 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 pertumbuhnan 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 dikelompokan 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 tritepenoid pada *H. atra* memilki gugus karbonil O-H, C=O, C-O, ikatan rangkap C=C, metilena dan metil. Selain itu, gugus asam karbiksilat, 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 hidrifilik 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.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil dari penelitian menunjukan bawha fraksi metanol *Holothuria atra* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Vibrio cholerae*. Konsentrasi dari isolat ektrak metanol *Holothuria atra* yang memberikan daya hambat terbaik terhadap pertumbuhan *Vibrio cholerae* terdapat pada fraksi A konsentrasi 6 mg/ml atau 6000 ppm. Hal ini ditunjukan dengan zona hambat rata-rata yang dihasilkan yaitu 3,88±0,33 mm.

Hasil identifikasi senyawa dengan spektrofotometri UV-Vis, FT-IR, dan LC-MS menunjukan bahwa terdapat serapan pada λ^{max} 233 nm dan berat molekul sanyawa dugaan sebesar 476 m/z (Rt 1,9) dan 764 m/z (Rt 4,1). Kemudian gugus-gugus yang terbentuk yaitu O-H, C-O, C=O, C=C, CH_2, dan CH_3. Dengan demikian diduga senyawa tersebut adalah senyawa golongan triterpenoid dan berperan dalam memberikan aktivitas antibakteri.

5.2 Saran

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut menggunakan isolat murni *H. atra* dengan metode MIC dan MBC untuk mengetahui potensi bakteriostatik maupun bakteriosidal. Kemudian mengenai identifikasi senyawa pada *H. atra* disarankan menggunakan analisis NMR sehingga diketahui struktur senyawa secara mutlak.

DAFTAR PUSTAKA

Adnan, M. 1997. Teknik Kromatografi Untuk Analisis Bahan Makanan. Penerbit Andi. Yogyakarta. Hlm 10, 15-16.

Albuntana, A., Yasman, dan W. Wardhana. 2011. Uji Toksisitas Ekstrak Empat Jenis Teripang Suku Holothuridae Dari Pulau Penjaliran Timur, Kepulauan Seribu, Jakarta Menggunakan Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kelautan Tropis 3 (1) : 65-72.*

Anonymous, 2001. Agilent Lc-Ms Primer. USA 5988-2045EN.

Asih, I. A. R., G. Gunawan, dan N. M. D. Ariani. 2010. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Golongan Triterpenoid Dari Ekstrak N-Heksana Daun Kepuh (*Sterculia foetida L.*) Serta Uji Aktivitas Antiradikal Bebas. *Jurnal Kimia 4 (2) : 135-140.*

Bakus, G. J. 1968. Defensive Mechanisms And Ecology Of Some Tropical Holothu-rians. *Journal of Mar. Biol. 2 (1) : 23 – 32.*

Bandaranayake, W. M dan A. D. Rocher. 1999. Role Of Secondary Metabolites And Pigment In Epidermal Tissues, Ripe Ovaries, Viscera, Gut Content And Diet Of The Sea Cucumber *Holothuria Atra*. *Journal of Mar. Biol 133 : 163-169.*

Bordbar, S., F. Anwar, dan N. Saari. 2011. High-Value Components And Bioactives From Sea Cucumbers For Functional Foods. *A Review Journal of Mar. Drugs 9 : 1761–1805.*

Calabria, L. M., S. Piacente, dan I. Kapusta. 2008. Triterpene Saponin From *Silphium radula*. *Journal of Phytochemistry 69 : 961-972.*

Caulier, G., S. van Dyck, P. Gerbaux, I. Eeckhaut, dan P. Flammang. 2011. Review Of Saponin Diversity In Sea Cucumbers Belonging To The Family Holothuriidae. *SPC Beche-de-mer Inf. Bull. 31 : 48–54.*

Chin J.2006. Manual Pemberantasan Penyakit Menular Edisi 17. Infomedika. Hlm 118-129.

Day, R.A and Underwood. 1999. Analisis Kimia Kuantitatif. Terjemahan Pudjaatmaka, A. H. Penerbit Erlangga. Jakarta.

Farrouk, A. H., F. A. H. Ghous and B.H. Ridzwan. 2007. New Species Isolated Fron Malaysian Sea Cucumber With Optimized Secreted Antibacterial Activity. *American Journal of Biochem and Biotech 3 (2) : 60-65.*

Fessenden, R. J dan J. S Fesseden. 1997. Kimia Organik. Terjemahan oleh Pudjaatmaka, A. H. Penerbit Erlangga. Jakarta. 590 hlm.

Gholib, D. 2009. Uji Daya Hambat Daun Senggani (*Melastoma malabathricum L.*)Terhadap *Trychophyton mentagrophytes* Dan *Candida albicans*. *Berita Biologi Vol 9 (5) : 253-262.*

Guenther, E. 1987. Minyak Atsiri Jilid 1. Penerbit UI Press. Jakarta.

Gunawan, I. W. G., I. G. A. Gede Bawa, dan N. I. Sutrisnayanti. 2008. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Terpenoid Yang Aktif Antibakteri Pada Herba Meniran (*Phyllanthus niruri Linn*). *Jurnal Kimia 2 (1) : 31-39.*

Han, H., Y. H. Yi, B. s. Liu, X. H. Wang, dan M. X. Pan. 2008. Leucospilotaside C, A New Sulfated Tritepene Glycoside From Sea Cucumber *Holothuria leucospilota*. *Journal Of Chinese Chemical Letters 19 : 1462-1464.*

Han, H., Y. Yang-hua, L. Ling, L. Bao-shu, L. Ming-ping, dan Z. Hong-wei. 2009. Triterpene Glycosides From Sea Cucumber *Holothuria leucospilota. Chinese Journal Of Natural Medicines 7 (5) : 346-350.*

Han, H., L. Ling, Y. Yang-hua, W. Xiao-hua, dan P. Min-xiang. 2012. Triterpene Glycosides From Sea Cucumber *Holothuria scabra* with Cytotoxic Activity. *Journal of Chinese Herbal Medicines 4 (3) : 183-188.*

Handayani, D. Maipa, D., Marlina, Meilan. 2007. Skrining Aktivitas Antibakteri Beberapa Biota Laut Dari Perairan Pantai Painan, Sumatera Barat.Makalah. Fakultas Farmasi Universitas Andalas. Padang.

Harborne, J.B. 1996. Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Terjemahan Padmawinata, K. Penerbit ITB. Bandung. 354 hlm.

Hardiningtyas, S.D. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak S*arcophyton* sp. yang Difragmentasi dan Tidak Difragmentasi di Perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 67 hlm.

Hasan, I. M. 2002. Pokok-Pokok Materi Metodologi Penelitian Dan Aplikasinya. Ghalia Indonesia. Jakarta.

Hastari, R. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Pelepah Dan Batang Tanaman Pisang Ambon (*Musa paradisiaca var. Sapientum*) Terhadap *Staphylococcus aureus.* Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.

Hikmah. 2007. Pembuatan Metil Ester (Biodiesel) Dari Minyak Dedak Dan Metanol Dengan Proses Esterifikasi Dan Transesterifikasi. Skripsi. Fakultas Teknik Kimia Universitas Diponegoro. Semarang.

Inayah, N., R. Ningsih, dan T. K. Adi. 2012. Uji Toksisitas Dan Identifikasi Awal Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol Dan N-Heksana Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) Kering Pantai Kenjeran Surabaya. *Journal Of Alchemy 2 (1) : 92-100.*

Ismail, H., S. Lemriss, Z. B. Aoun, L. Mhadhebi, A. Dellai, Y. Kacem, P. Boiron, dan A. Bouraoui. 2008. Antifungal Activity Of Aqueous And Methanolic Extracts From The Mediterranean Sea Cucumber, *Holothuria polii. Journal De Mycologie Médicale 18 : 23-26.*

Jawetz, E., J. L. Melnick, and E. Adelberg. 2001. Medical Microbiology 22nd Ed. McGraw-Hill Companies Inc. New York. Hlm 235-237.

Joklik, Willet, dan Amos. 1980. Zinsser Microbiology 17th Ed. Appleton Century-Crofts. Hlm 566-570, 750-754.

Kaswandi M. A, Lian H. H, Nurzakiah S, Ridzwan B. H, Ujang S, Samsudin S, Jasnizat S, Ali A. M. 2000. Crystal Saponin From Three Sea Cucumber Genus And Their Potential As Antibacterial Agents. *9th Scientific Conference Electron Microscopic society 273-276*. Kota Bharu, Kelantan.

Krebs, S. J dan R. K. Taylor. 2011. Protection And Attachment Of *Vibrio cholerae* Mediated By The Toxin-Coregulated Pilus In The Infant Mouse Model. *Journal Of Bacteriology 19 (19) : 5260-5270*.

Kristanti, A. N., N. S. Aminah, M. Tanjung, dan B. Kurniadi. 2008. Buku Ajar Fitokimia. Penerbit Airlangga University Press. Surabaya. Hlm 23, 47.

Kusmiyati dan N.W.S Agustini, 2006. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri Dari Mikroalga *Porphyridium cruentum. Jurnal Biodiversitas 8 (1) : 48-53.*

Kusumaningtyas, E., S. Lusi, dan A. Estie. 2008. Penentuan Golongan Bercak Senyawa Aktif Ekstrak N-Heksan Alpinia Galanga Terhadap *Candida albicans* Dengan Bioautografi Dan Kromatografi Lapis Tipis*. JITV 13 (4) : 323-328.*

Lamothe, R.G. 2009. Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens. *Int. J. Mol. Sci 10 : 3400-3419.*

Lay, B.H. 1994. Analisis Mikroba Di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.

Martoyo, J., N. Aji, T. Winanto. 2006. Budidaya Teripang Cet. 6 Edisi Revisi. Penebar Swadaya. Jakarta.

Maryam, R. 2007. Metode Deteksi Mikotoksin. *Jurnal Mikol Ked Indon 1 (2) : 12-24.*

Maryani, a. 2010. Isolasi Dan Uji Antibakteri Fraksi Etil Asetat Akar Tanaman Akar Purwo (*Eryngium foetidum*) Tergadap Staphylosossus aureus ATCC 25923 Dan Escherichia coli ATCC 25922. Skripsi. Fakultas MIPA Universitas Diponegoro. Semarang.

Matsuno, Takao dan Miyuki Tsushima. 1995. Comparative Biochemical Studies Of Carotenoids In Sea Cucumbers. *Journal of Comp Biochem Physiol 111b (4) : 597-605.*

Muley, B. P., S. S. Khadabadi, dan N. B. Banarase. 2009. Phytochemical Constituens And Pharmacological Activities Of *Calendula officinalis Linn* (Asteraceae). *A Review, Tropical Journal Of Pharmaceutical Research 8 (5) : 455-465.*

Nimah, S., W.F. Ma'ruf and A. Trianto. 2012. Uji Aktivitas Ekstrak Teripang Pasir *(Holothuria scabra)* Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Dan *Bacilluscereus. J. Perikanan 1 (2) : 1-9.*

Nurjanah S., E. G. Said, K. Syamsu, Suprihatin dan E. Riani. 2009. Pengaruh Ekstrak Steroid Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) Terhadap Perilaku Seksual Dan Kadar Testosteron Darah Mencit (*Mus musculus*). Laporan Penelitian. IPB. Bogor.

Pelezar, M.J dan E. C. S Chan. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi Edisi ke-5 Jilid 1. Terjemahan Sri, R.H *et al*. Penerbit Universitas Indonesia Press. Jakarta. 88 hlm.

Pradhika, E. I. 2008. Daya Kerja Antimikroba*. www.*yanpusmeongblog.com*.* Diakses pada Januari 2014.

Pranoto E. N, W. F. Ma'ruf, D. Pringgenies. 2012. Kajian Aktivitas Bioaktif Ekstrak Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) Terhadap Jamur *Candida albican*. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan 1 (1) : 1-8.*

Pratiwi, S. T. 2008. Mikrobiologi Farmasi. Penerbit Erlangga. Jakarta.

Purcell, S. W, Y. Samyn dan C. Conand. 2012. Commercially Important Sea Cucumber Of The World. FAO Species Catalogue for Fishery Purpose No. 6 Rome. Hlm 42-43.

Rasyid, A. 2012. Isentifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Serta Uji Aktivitas Antibakteri Dan Antioksidan Ekstrak Metanol Teripang *Stichopus hermanii*. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kelautan Tropis 4 (2) : 360-368.*

Rita, W. S,. 2010. Isolasi, Identifikasi, Dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Golongan Triterpenoid Pada Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria (Berg.) Roscoe*). *Jurnal Kimia 4 (1) : 20-26.*

Ristiati, N. P. 2000. Pengantar Mikrobiologi Umum. Proyek Pengembangan Sekolah Menengah IBRD Loan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional.

Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi Edisi Ke-6. Terjemahan Padmawinata, K. Penerbit ITB. Bandung. Hlm 152-196.

Rohman.2007. Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar: Yogyakarta.

Roihanah, S, Sukoso, Andayani, S. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria sp*. Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara In Vitro. *J. Exp. Life Sci. 2 (1) : 1-5.*

Rumondang, M., D. Kusrini, dan E. Fachriyah. 2013. Isolasi, Identifikasi, Dan Uji Antibakteri Senyawa Triterpenoid Dari Ekstrak N-Heksana Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). *Journal of Chem Info 1 (1) : 156-164.*

Singkoh, 2011. Aktivitas Antibakteri Alga Laut *Caulerpa racemosa* Dari Perairan Pulau Nain*. Jurnal Perikanan Dan Kelautan Tropis 7 (3) : 123-127.*

Sangi, M., M. R. J. Runtuwene, H. E. I. Simbala, dan V. M. A. Makang. Analisa Fitokimia Tumbuhan Obat Di Kabupaten Minahasa Utara. *Journal Of Chemistry Progress 1 (1) : 47-53.*

Sastrohamidjojo, H. 1985. Kromatografi*.* Penerbit Liberty. Yogyakarta.

Sastrohamidjojo, H. 1991. Spektroskopi*.* Penerbit Liberty. Yogyakarta.

Sastrohamidjojo, H. 1992. Spektroskopi Inframerah*.* Penerbit Liberty. Yogyakarta.

Septiadi, T., D. Pringgenies, dan O. K. Radjasa. 2013. Uji Fitokimia Dan Aktivitas Antijamur Ekstrak Teripang Keling (*Holothuria atra*) Dari Pantai Bandengan Jepara terhadap Bakteri *Candida albicans*. *Journal Of Marine Research 2 (2) : 76-84.*

Setiabudy, R. Dan V.H.S. Gan. 2005. Pengantar Antimikroba Dalam Farmakologi Dan Terapi Edisi Keempat*.* Unirversitas Indonesia, Jakarta.

Setyohadi, R., Sidharta, R., Nandar, D.S.A. 2013. Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia)* Terhadap Ketebalan Epitel Gingiva Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi *Actinobacillus actinomycetemcomitans.* Skripsi. Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang.

Silverstrein, R. M., G. C. Bassler, dan T. C. Morrill. 1986. Spectrometric Identification Of Organis Compounds 4th Edition. Terjemahan Hartono, A. J *et al*. Penerbit Erlangga. Jakarta.

Skoog, D.A. 1998. Principles Of Instrumental Analysis 5th Edition. Brooks Cole-Thomson Learning. USA.

SPC. 2004. Pacific Island Sea Cucumber And Beche-De-Mer Identification Cards. Norwood Pty, Ltd. Australia.

Sugara, 2010 Sugara, T.H. 2010. Karakterisasi Senyawa Aktif Antibakteri Fraksi Etil Asetat Daun Tanaman Bandotan (*Ageratum conyzoides L*.). Skripsi. IPB. Bogor.

Sukadana, I Made dan S. R. Santi. 2011. Senyawa Antibakteri Bis(2-Etilheksil) Ester Dan Triterpenoid Dalam Ekstrak *N*- Heksana Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). *Majalah Obat Tradisional 16 (1) : 1-6.*

Susanto, W. H. 1999. Teknologi Lemak dan Minyak Makan. Jurusan THP Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.

Thanh, N.V., N. H. Dang, P. V. Kiem, N. X. Cuong, H. T. Huong, dan C. V. Minh. 2006. A New Triterpene Glycoside From The Sea Cucumber *Holothuria scabra* Collected In Vietnam. *ASEAN J. Sci. Technol. Dev. 23* : 253–259.

Thompson, J., R. Walker, D. Faulkner. 1985. Screening And Bioassays For Biologically-Active Substances From Forty Marine Sponge Species From San Diego, California, USA. *Journal of Mar. Biol. 88 : 11–21.*

Vogeser, M, dan Christoph Seger. 2008. A Decade Of Hplc-Ms/Ms In The Routine Clinical Laboratory-Goals For Futher Development. *Journal of Chlinical Biochemistry Rev 41 : 649-662.*

Wibowo S, Yunizal, Setiabudi E, Erlina MD, Tazwir. 1997. Teknologi Penanganan dan Pengolahan Teripang (Holothuridea). IPPL Slipi. Jakarta.

Widodo, F.M. 2007. Aktivitas Antijamur Senyawa Bioaktif Ekstrak *Gelidium latifolium* Terhadap *Candida albicans*. *Jurnal Makara Sains 1 (1) : 1-8.*

Wikipedia[a]. 2012. Karakteristik Pelarut Etanol. Diakses pada Januari 2014.

Wikipedia[b]. 2012. KLASIFIKASI *Bacilus cereus*. Diakses pada Januari 2014.

Yuan, Wei-Hua., Y. Y. Hua, X. Mei, Z. Hong-Wei, dan L. Ming-Ping. 2008. Two Antifungal Active Triterpene Glycosides From Sea Cucumber *Holothuria (Microthele) axiloga*. *Chinese Journal Of Natural Medicines 6 (2) : 105-108.*

Yusron, E. 2004. Sumberdaya Teripang Di Perairan Tanjung Pai Padaido Biak Numfor Papua. *Jurnal Makara Sains 8 (3) : 123-127.*

Zhang, Y. S., H.Y. Yi, dan H.F. Tang. 2006. Cytotoxic Sulfated Triterpene Glycosides From The Sea Cucumber *Pseudocolochirus Violaceus*. *Journal of Chemistry & Biodiversity 3 : 807-817.*

Zipcodezoo. 2012. Klasifikasi *Holothuria atra*. www.zipcodezoo.com. Diakses pada tanggal 21 Spetember 2014.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan Rendemen Ekstrak Metanol *Holothuria atra*

Berat sampel segar = 500 gram

Berat sampel setelah disiangi = 400 gram

Berat akhir = 16,87 gram

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\ \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{16{,}87 \text{ gram}}{400 \text{ gram}} \times 100\ \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 4.21\ \%$$

Lampiran 2 Prosedur Pembuatan DMSO 10 % dan Konsentrasi

- **Pembuatan DMSO 10 %**

DMSO 100 % x 1 ml stok=DMSO 10 % x (x) ml

$$(x)ml = \frac{DMSO\ 100\ \% \times 1\ ml}{DMSO\ 10\ \%}$$

(x)ml = 10 ml

Jadi sebanyak 1 ml DMSO 100 % dilarutkan dengan aquadest hingga volume 10 ml.

- **Pembuatan Konsentrasi**

Stok Fraksi A 10000 ppm

$$1\ ppm = \frac{1\ mg}{1000\ ml}$$

$$10000\ ppm = \frac{10000\ mg}{1000\ ml}$$

$$= \frac{100\ mg}{10\ ml}$$

Jadi sebanyak 100 mg fraksi A dilarutkan dengan 10 ml DMSO 10 %.

Pembuatan konsentrasi 6000ppm (6 mg/ml)

10000 ppm x 1 ml stok=6000 ppm x (x) ml

$$(x)ml = \frac{10000\ ppm \times 1\ ml}{6000\ ppm}$$

(x)ml= 1,67 ml

Jadi sebanyak 1 ml stok Fraksi A 10000 ppm dilarutkan dengan DMSO 10 % hingga volume 1,67 ml.

Lanjutan Lampiran 2

Pembuatan konsentrasi 5000ppm (5 mg/ml)

10000 ppm x 1 ml stok=5000 ppm x (x) ml

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

(x)ml= 2 ml

Jadi sebanyak 1 ml stok Fraksi A 10000 ppm dilarutkan dengan DMSO 10 % hingga volume 2 ml.

Pembuatan konsentrasi 4000ppm (4 mg/ml)

10000 ppm x 1 ml stok=4000 ppm x (x) ml

$$(x)ml = \frac{10000\ ppm \times 1\ ml}{4000\ ppm}$$

(x)ml= 2,5 ml

Jadi sebanyak 1 ml stok Fraksi A 10000 ppm dilarutkan dengan DMSO 10 % hingga volume 2,5 ml.

Pembuatan konsentrasi 3000ppm (3 mg/ml)

10000 ppm x 1 ml stok=3000 ppm x (x) ml

$$(x)ml = \frac{10000\ ppm \times 1\ ml}{3000\ ppm}$$

(x)ml= 3,33 ml

Jadi sebanyak 1 ml stok Fraksi A 10000 ppm dilarutkan dengan DMSO 10 % hingga volume 3,33 ml.

Lanjutan Lampiran 2

Pembuatan konsentrasi 2000ppm (2 mg/ml)

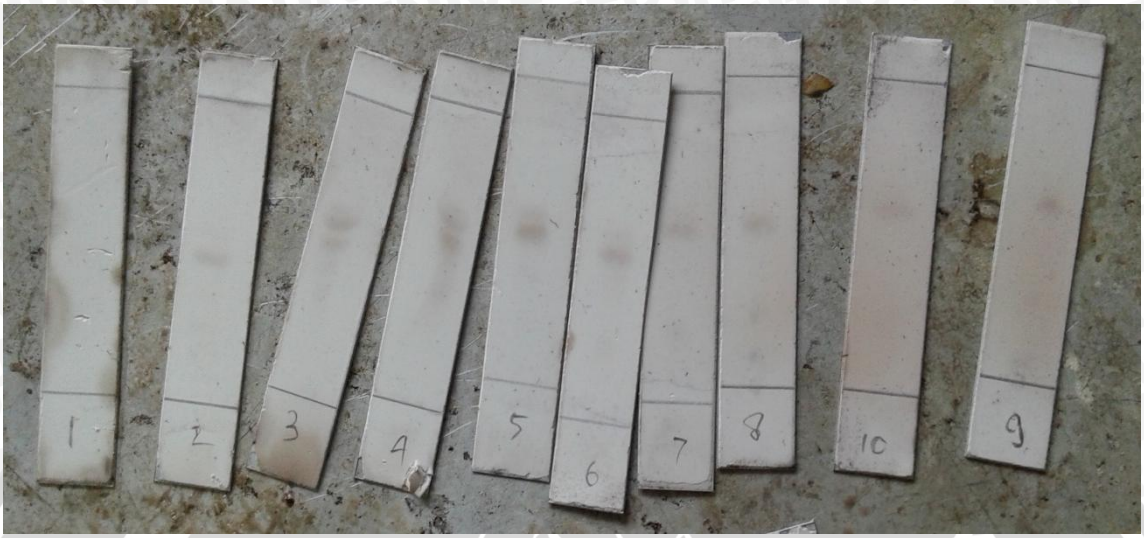
10000 ppm x 1 ml stok=2000 ppm x (x) ml

$$(x)ml = \frac{10000\ ppm \times 1\ ml}{2000\ ppm}$$

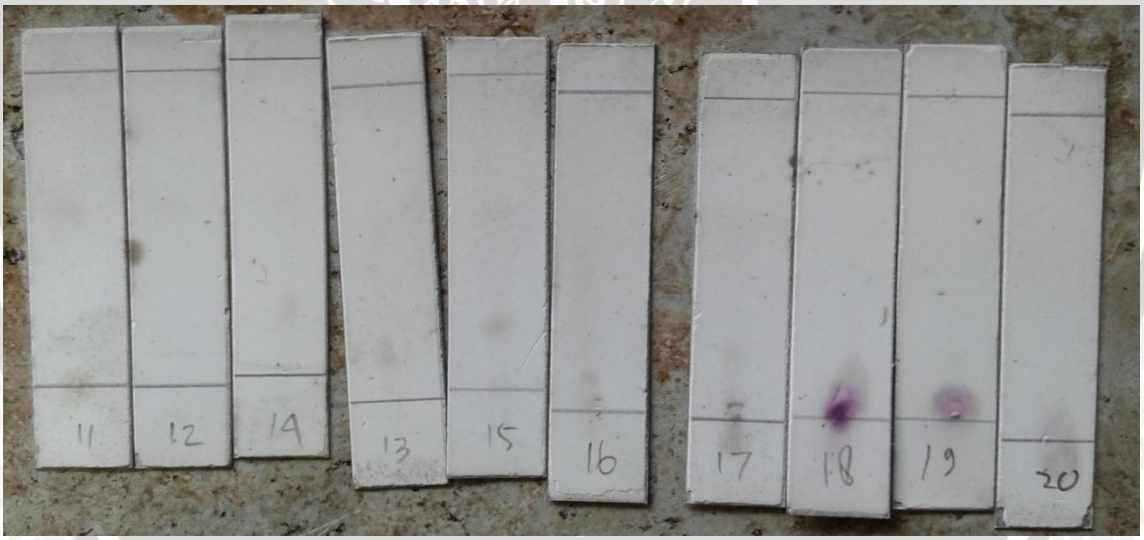
(x)ml= 5 ml

Jadi sebanyak 1 ml stok Fraksi A 10000 ppm dilarutkan dengan DMSO 10 % hingga volume 5 ml.

Lampiran 3 Hasil Kromatografi Lapis Tipis

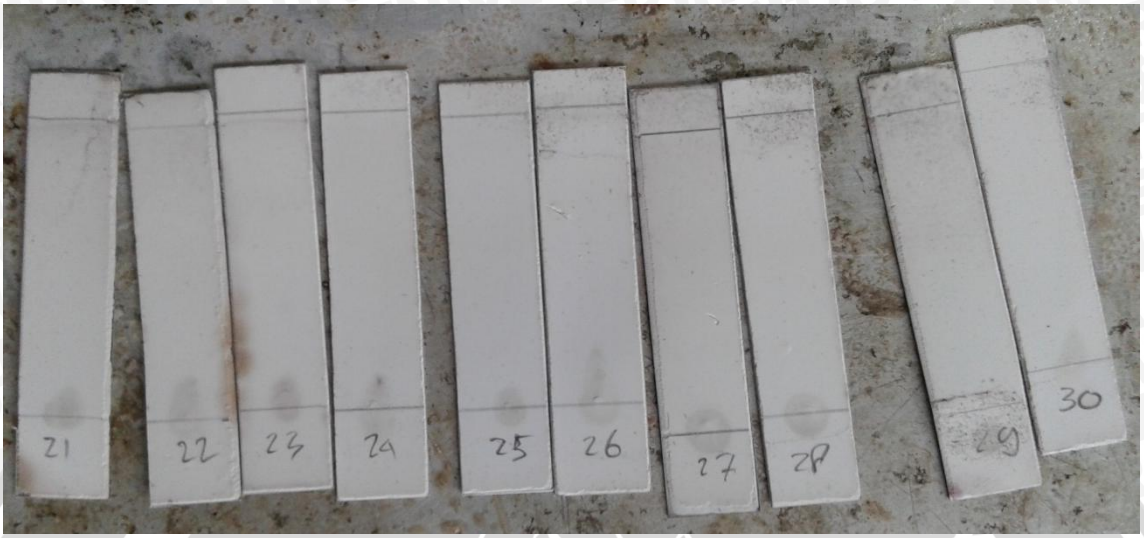


Fraksi No 1-9



Fraksi No 11-20

Lanjutan Lampiran 3



Fraksi No 21-30

Fraksi No 31-32

Lampiran 4 Analisis Keragaman (ANOVA) Penelitian Pendahuluan

- **Data Hasil Pengamatan Diameter Daya Hambat**

Sampel	Konsentrasi	U1	U2	U3	Total	Rerata	Std.Dev
Fraksi A	0,5 mg/ml	2,50	3,05	2,30	**7,85**	**2,62**	**0,39**
	1 mg/ml	3,20	2,70	2,70	**8,60**	**2,87**	**0,29**
	2 mg/ml	2,15	3,00	3,00	**8,15**	**2,72**	**0,49**
	4 mg/ml	2,45	3,40	3,30	**9,15**	**3,05**	**0,52**
Fraksi B	0,5 mg/ml	1,60	1,00	1,60	**4,20**	**1,40**	**0,35**
	1 mg/ml	1,10	0,70	1,00	**2,80**	**0,93**	**0,21**
	2 mg/ml	2,00	2,10	2,80	**6,90**	**2,30**	**0,44**
	4 mg/ml	3,00	2,20	2,00	**7,20**	**2,40**	**0,53**
Fraksi C	0,5 mg/ml	1,40	1,60	1,30	**4,30**	**1,43**	**0,15**
	1 mg/ml	1,35	1,10	1,10	**3,55**	**1,18**	**0,14**
	2 mg/ml	1,10	2,05	1,10	**4,25**	**1,42**	**0,55**
	4 mg/ml	2,70	2,70	2,00	**7,40**	**2,47**	**0,40**
Fraksi D	0,5 mg/ml	1,60	2,10	2,45	**6,15**	**2,05**	**0,43**
	1 mg/ml	1,10	1,85	1,35	**4,30**	**1,43**	**0,38**
	2 mg/ml	1,90	2,70	2,40	**7,00**	**2,33**	**0,40**
	4 mg/ml	2,30	3,15	2,20	**7,65**	**2,55**	**0,52**
Tetrasiklin	0,5 mg/ml	3,30	3,10	3,80	**10,20**	**3,40**	**0,36**
	1 mg/ml	3,00	3,10	3,80	**9,90**	**3,30**	**0,44**
	2 mg/ml	3,00	3,05	3,30	**9,35**	**3,12**	**0,16**
	4 mg/ml	3,70	3,15	4,00	**10,85**	**3,62**	**0,43**
Total		**44,45**	**47,80**	**47,50**	**139,75**		

- **Analysis of Variance (ANOVA)**

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hit	F 5 %	F 1 %
Sampel	4	26,05	6,51	40,90	2,61	3,83
Konsentrasi	3	6,17	2,06	12,91	2,84	4,31
Interaksi	12	4,15	0,35	2,17	2,00	2,66
Galat	40	6,37	0,16			
Total	59	42,74				

Interpretasi :
Dari analisis ragam diketahui bahwa F hit Interaksi (2,17) > F 5% (2,00) dan probabilitas (0,03) < 0,05, maka interaksi antara sampel dan konsentrasi nyata.

Lanjutan Lampiran 4

- **Perhitungan dan Notasi BNT 5 %**

$$BNT\ 5\% = t_{(\frac{\alpha}{2},db)} \times \sqrt{\frac{2KTGalat}{r}} = 2,02 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,16}{3}} = 0,66$$

Perlakuan	Rerata	0,93	1,18	1,40	1,42	1,43	1,43	2,05	2,30	2,33	2,40	2,47	2,55	2,62	2,72	2,87	3,05	3,12	3,30	3,40	3,62	Notasi
B1 mg/ml	0,93	0,00																				a
C1 mg/ml	1,18	0,25	0,00																			a
B 0,5 mg/ml	1,40	0,47	0,22	0,00																		a
C 2 mg/ml	1,42	0,49	0,24	0,02	0,00																	a
D 1 mg/ml	1,43	0,50	0,25	0,03	0,01	0,00																a
C 0,5 mg/ml	1,43	0,50	0,25	0,03	0,01	0,00	0,00															a
D 0,5 mg/ml	2,05	1,12	0,87	0,65	0,63	0,62	0,62	0,00														ab
B 2 mg/ml	2,30	1,37	1,12	0,90	0,88	0,87	0,87	0,25	0,00													bc
D 2 mg/ml	2,33	1,40	1,15	0,93	0,91	0,90	0,90	0,28	0,03	0,00												bc
B 4 mg/ml	2,40	1,47	1,22	1,00	0,98	0,97	0,97	0,35	0,10	0,07	0,00											bc
C 4 mg/ml	2,47	1,54	1,29	1,07	1,05	1,04	1,04	0,42	0,17	0,14	0,07	0,00										bc
D 4 mg/ml	2,55	1,62	1,37	1,15	1,13	1,12	1,12	0,50	0,25	0,22	0,15	0,08	0,00									bc
A 0,5 mg/ml	2,62	1,69	1,44	1,22	1,20	1,19	1,18	0,57	0,32	0,29	0,22	0,15	0,07	0,00								bc
A 2 mg/ml	2,72	1,79	1,54	1,32	1,30	1,29	1,29	0,67	0,42	0,39	0,32	0,25	0,17	0,10	0,00							cd
A 1 mg/ml	2,87	1,94	1,69	1,47	1,45	1,44	1,44	0,82	0,57	0,54	0,47	0,40	0,32	0,25	0,15	0,00						cd
A 4 mg/ml	3,05	2,12	1,87	1,65	1,63	1,62	1,62	1,00	0,75	0,72	0,65	0,58	0,50	0,43	0,33	0,18	0,00					ef
T 2 mg/ml	3,12	2,19	1,94	1,72	1,70	1,69	1,69	1,07	0,82	0,79	0,72	0,65	0,57	0,50	0,40	0,25	0,07	0,00				fg
T 1 mg/ml	3,30	2,37	2,12	1,90	1,88	1,87	1,87	1,25	1,00	0,97	0,90	0,83	0,75	0,68	0,58	0,43	0,25	0,18	0,00			gh
T 0,5 mg/ml	3,40	2,47	2,22	2,00	1,98	1,97	1,97	1,35	1,10	1,07	1,00	0,93	0,85	0,78	0,68	0,53	0,35	0,28	0,10	0,00		hi
T 4 mg/ml	3,62	2,69	2,44	2,22	2,20	2,19	2,19	1,57	1,32	1,29	1,22	1,15	1,07	1,00	0,90	0,75	0,57	0,50	0,32	0,22	0,00	ij

Ket : Selisih rerata dengan warna biru menandakan berbeda nyata.

Interpretasi :
Dari uji BNT 5% diketahui bahwa perlakuan fraksi A dengan konsentrasi 4 mg/ml merupakan perlakuan yang mampu menyetarai perlakuan kontrol tertrasiklin dengan konsentrasi 2 mg/ml.

Lampiran 5 Analisis Keragaman (ANOVA) Penelitian Utama

- **Data Hasil Pengamatan Diameter Daya Hambat**

Perlakuan	U1	U2	U3	U4	U5	U6	Total	Rerata	Std.Dev
2 mg/ml	3,40	3,00	3,10	2,60	3,00	3,50	**18,60**	**3,10**	**0,32**
3 mg/ml	3,00	3,60	3,60	3,20	3,00	3,00	**19,40**	**3,23**	**0,29**
4 mg/ml	3,50	3,80	3,40	2,60	3,50	3,00	**19,80**	**3,30**	**0,43**
5 mg/ml	3,50	3,20	3,80	3,20	3,60	3,80	**21,10**	**3,52**	**0,27**
6 mg/ml	4,00	3,50	4,20	3,60	3,70	4,30	**23,30**	**3,88**	**0,33**
Total	**17,40**	**17,10**	**18,10**	**15,20**	**16,80**	**17,60**	**102,20**		

- **Analysis of Variance (ANOVA)**

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hit	F 5 %	F 1 %
Perlakuan	4	2,25	0,56	5,04	2,76	4,18
Galat	25	2,79	0,11			
Total	29	5,04				

Dari analisis ragam diketahui bahwa F hit (5,04) > F 1% (4,18) dan probabilitas (0,00) < 0,01, maka sangat nyata. Dengan demikian terdapat hubungan yang sangat berbeda nyata dimana paling sedikit ada sepasang nilai tengah konsentrasi yang sama.

- **Perhitungan dan Notasi BNT 5 %**

$$BNT\ 5\% = t_{(\frac{\alpha}{2},db)} \times \sqrt{\frac{2KTGalat}{r}} = 2,06 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,11}{6}} = 0,40$$

Perlakuan	Rata-Rata	3,100	3,233	3,300	3,517	3,883	Notasi
2 mg/ml	**3,100**	0					**a**
3 mg/ml	**3,233**	0,133 tn	0				**a**
4 mg/ml	**3,300**	0,2 tn	0,067 tn	0			**a**
5 mg/ml	**3,517**	0,417 *	0,284 tn	0,217 tn	0		**ab**
6 mg/ml	**3,883**	0,783 *	0,65 *	0,583 *	0,366 tn	0	**bc**

Interpretasi :
Dari uji BNT 5% diketahui bahwa perlakuan konsentrasi 5 mg/ml dan 6 mg/ml memiliki potensi yang sama namun perlakuan konsentrasi 6 mg/ml dapat dikatakan merupakan perlakuan terbaik.

Lanjutan Lampiran 5

- **Polinomial Orthogonal**

Respon	Perlakuan dan Totalnya					
	2 mg/ml	3 mg/ml	4 mg/ml	5 mg/ml	6 mg/ml	∑
	18,60	19,40	19,80	21,10	23,30	
	Koefisien Polinomial Orthogonal					$\sum K_i^2$
Linier	-2	-1	0	1	2	10
Kuadratik	2	-1	-2	-1	2	14
Kubik	-1	2	0	-2	1	10
Kuartik	1	-4	6	-4	1	70
	Konsentrasi Polinomial Orthogonal x Total					$\sum K_i^2 T_i$
Linier	-37,20	-19,40	0,00	21,10	46,60	11,10
Kuadratik	37,20	-19,40	-39,60	-21,10	46,60	3,70
Kubik	-18,60	38,80	0,00	-42,20	23,30	1,30
Kuartik	18,60	-77,60	118,80	-84,40	23,30	-1,30

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	2,25	0,56	5,04	2,76	4,18
Linier	1	2,05	2,05	18,40	4,24	7,77
Kuadratik	1	0,16	0,16	1,46	4,24	7,77
Kubik	1	0,03	0,03	0,25	4,24	7,77
Kuartik	1	0,004	0,004	0,04	4,24	7,77
Galat	25	2,79	0,11			
Total	29	5,04				

Interpretasi :
Dari analisis ragam diketahui bahwa F hitung (18,40) tingkat linier > F 1% (7,77), maka kurva linier sangat cocok untuk menggambarkan pengaruh konsentrasi terhadap besarnya zona hambat yang dihasilkan.

Regresi Linier

Perlakuan (mg/ml)	x	(x-x)	$(x-x)^2$	Y	(y-ȳ)	$(y-ȳ)^2$	(x-x)(y-ȳ)
2	2	-2	4	3,10	-0,31	0,10	0,62
3	3	-1	1	3,23	-0,18	0,03	0,18
4	4	0	0	3,30	-0,11	0,01	0,00
5	5	1	1	3,52	0,11	0,01	0,11
6	6	2	4	3,88	0,47	0,22	0,95
Total	**20,00**	**0,00**	**10,00**	**17,03**	**-0,02**	**0,37**	**1,85**
Rerata	**4,00**	**0,00**	**2,00**	**3,41**	**0,00**	**0,07**	**0,37**

Lanjutan Lampiran 5

$$\boldsymbol{b} = \frac{\boldsymbol{\Sigma(x - x)(y - \bar{y})}}{\boldsymbol{\Sigma(x - x)^2}} = \frac{\boldsymbol{1,85}}{\boldsymbol{10}} = \boldsymbol{0,185}$$

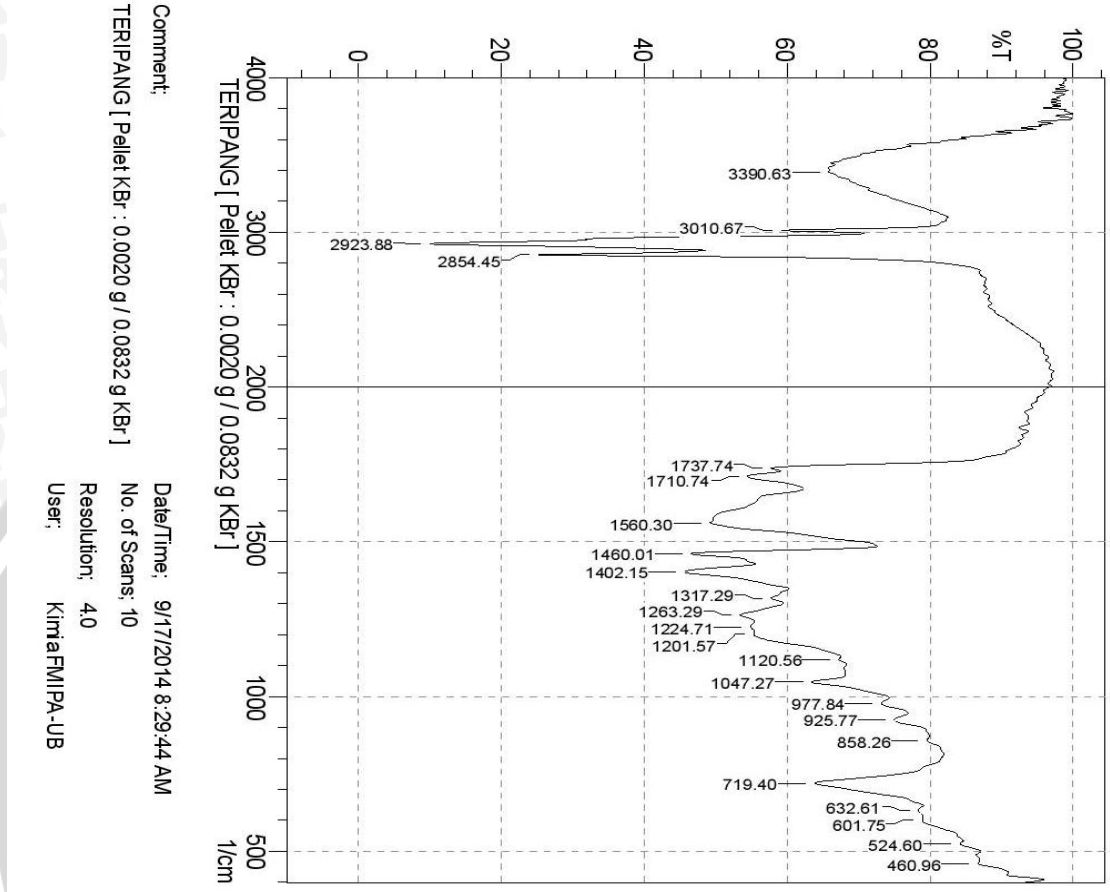
$$\boldsymbol{a} = \dot{\mathrm{Y}} - \boldsymbol{b}\dot{\mathrm{X}} = \boldsymbol{3,41} - (\boldsymbol{0,185} \times \boldsymbol{4}) = \boldsymbol{2,667}$$

Maka dipeloleh persamaan regresi linier :

$$\hat{\mathrm{Y}} = \boldsymbol{2,667} + \boldsymbol{0,185X}$$

Interpretasi :
Dengan demikian setiap terjadi kenaikan konsentrasi 1 mg/ml akan terjadi peningkatan zona hambat sebesar 0,185 mm. Kemudian pada saat konsentrasi 0 mg/ml nilai zona hambat sebesar 2,667 mm.

Lampiran 6 Hasil Analisa FT-IR



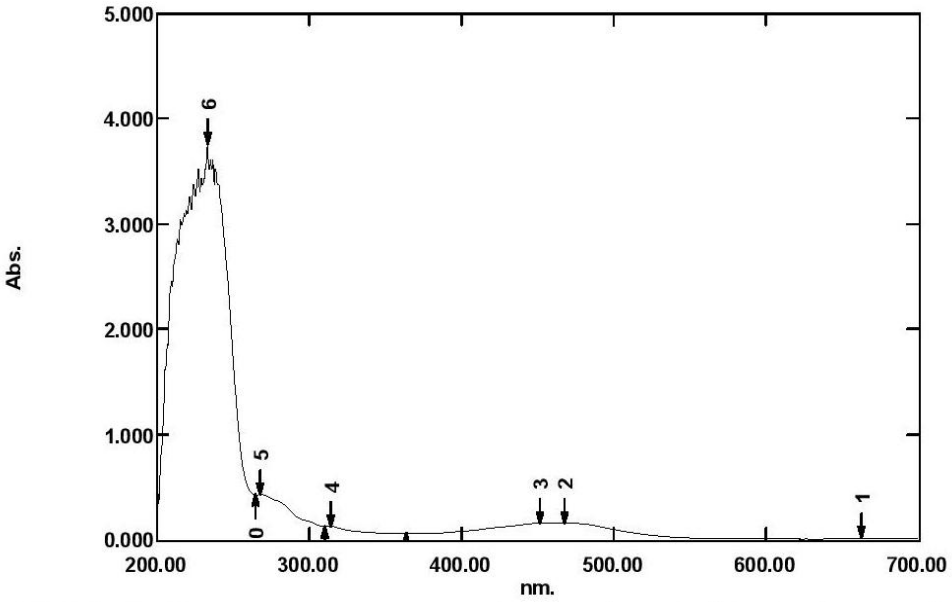
	Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are
1	460.96	86.66	1.091	468.67	432.03	1.942	0.071
2	524.6	84.197	1.143	534.25	499.53	2.403	0.107
3	601.75	78.927	0.514	607.54	536.17	6.247	0.105
4	632.61	78.342	0.694	648.04	609.46	4.015	0.071
5	719.4	63.807	16.449	811.98	649.97	20.773	5.454
6	858.26	79.565	0.894	871.76	831.26	3.854	0.087
7	925.77	74.993	2.708	945.05	873.69	7.916	0.411
8	977.84	73.156	2.07	995.2	946.98	6.137	0.292
9	1047.27	63.465	6.366	1066.56	997.13	11.37	1.135
10	1120.56	67.217	0.558	1128.28	1105.14	3.933	0.048
11	1201.57	55.325	1.011	1207.36	1130.21	16.635	0.405
12	1224.71	54.853	0.55	1242.07	1209.28	8.478	0.069
13	1263.29	53.41	3.354	1299.93	1244	14.219	0.689
14	1317.29	57.736	2.023	1348.15	1301.86	10.655	0.344
15	1402.15	45.594	11.416	1427.23	1350.08	21.705	3.367
16	1460.01	46.497	18.719	1483.16	1429.15	14.285	3.503
17	1560.3	49.219	2.993	1569.95	1485.09	18.896	0.655
18	1710.74	54.427	5.643	1728.1	1672.17	13.208	1.088
19	1737.74	57.738	5.424	1787.89	1730.03	7.144	0.416
20	2854.45	25.07	31.345	2881.45	2750.3	26.678	6.526
21	2923.88	10	28.52	2950.89	2883.38	41.975	14.78
22	3010.67	59.191	13.976	3074.32	2993.32	10.767	1.634
23	3390.63	65.797	0.572	3400.27	3336.62	11.091	0.158

Lampiran 7 Hasil Analisa Spektrofotometer UV-Vis

Spectrum Peak Pick Report

09/17/2014 08:19:12 PM

Data Set: TERIPANG - RawData - E:\FPIK\ARY\TERIPANG.spc



Measurement Properties
Wavelength Range (nm.): 200.00 to 700.00
Scan Speed: Fast
Sampling Interval: 0.5
Auto Sampling Interval: Enabled
Scan Mode: Single

Sample Preparation Properties
Weight:
Volume:
Dilution:
Path Length:
Additional Information:

Instrument Properties
Instrument Type: UV-1600 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 2.0 nm
Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
S/R Exchange: Normal

Attachment Properties
Attachment: None

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	↑	663.00	0.008	
2	↑	468.00	0.156	
3	↑	452.00	0.157	
4	↑	314.00	0.127	
5	↑	268.00	0.429	
6	↑	233.00	3.763	
7	↓	622.50	0.006	
8	↓	363.50	0.057	
9	↓	310.00	0.123	
10	↓	265.00	0.425	

Lampiran 8 Hasil Analisa LC-MS

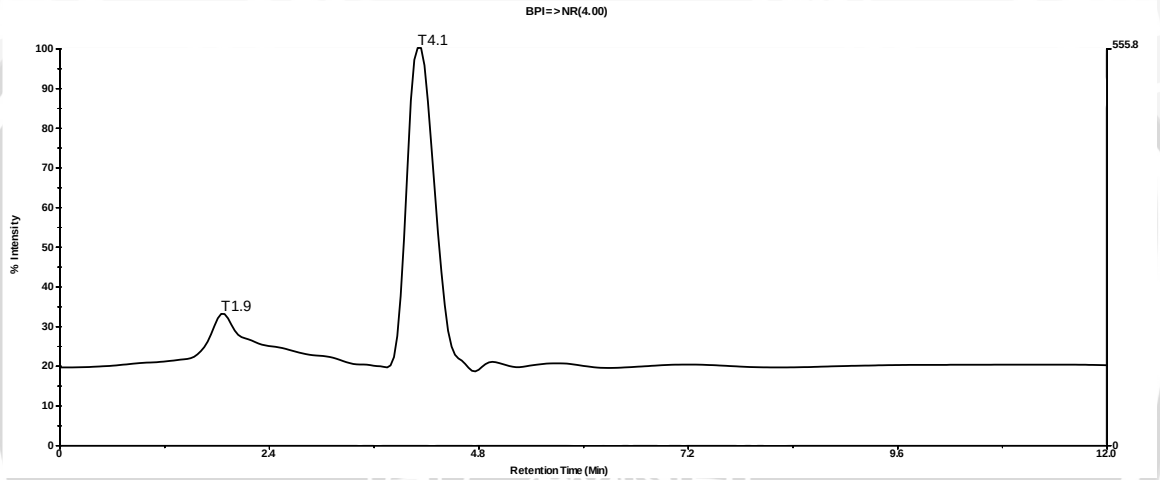
Teripang LC MS –ESI pos ion

Vol injection 20 ul

Flow 1 ml/min

Eluent MeOH

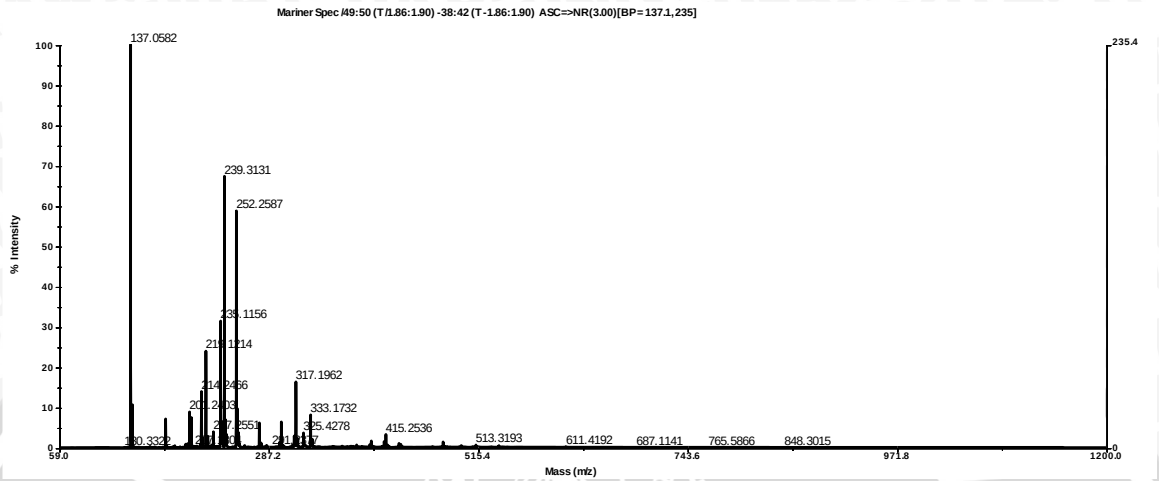
Operating by : Puspa D N Lotulung

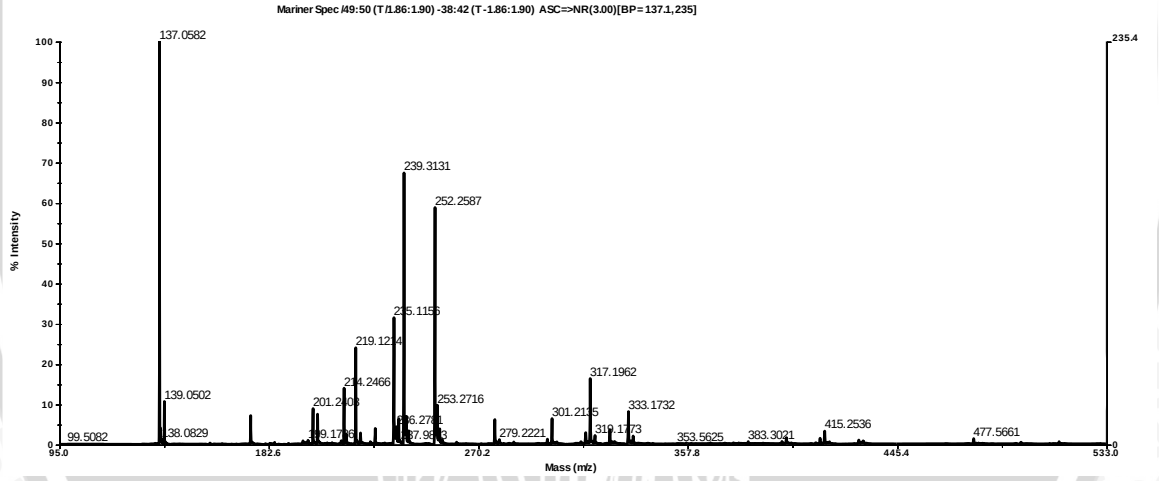


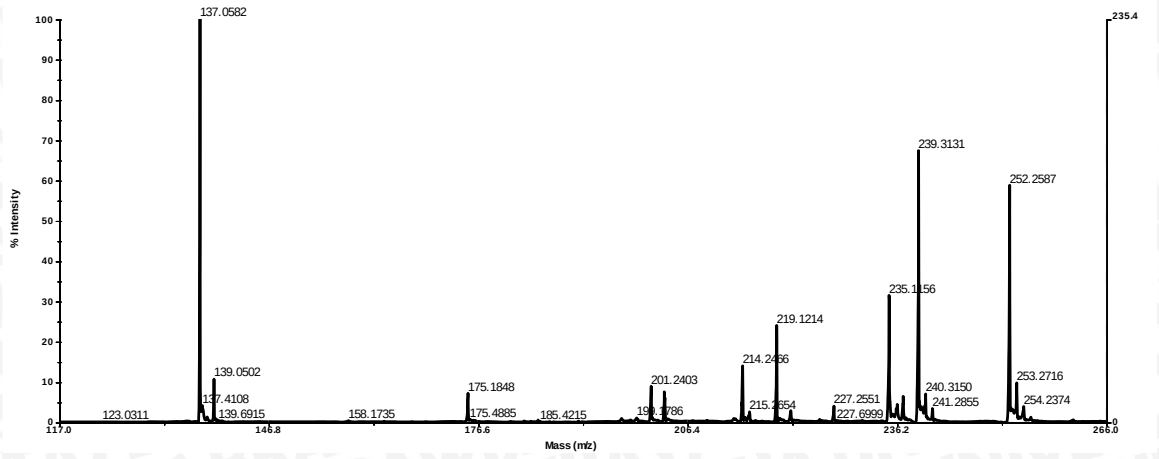
Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	1.858833	0.539100	3.683117	183	1514.68
2	4.110233	3.799300	4.731800	556	4323.51

Lanjutan Lampiran 8

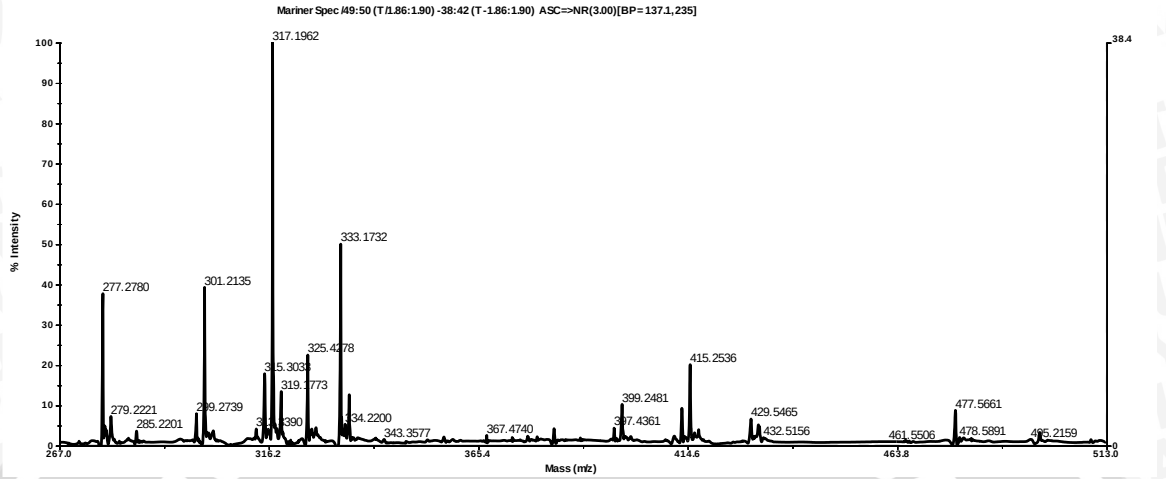
Rt 1.85



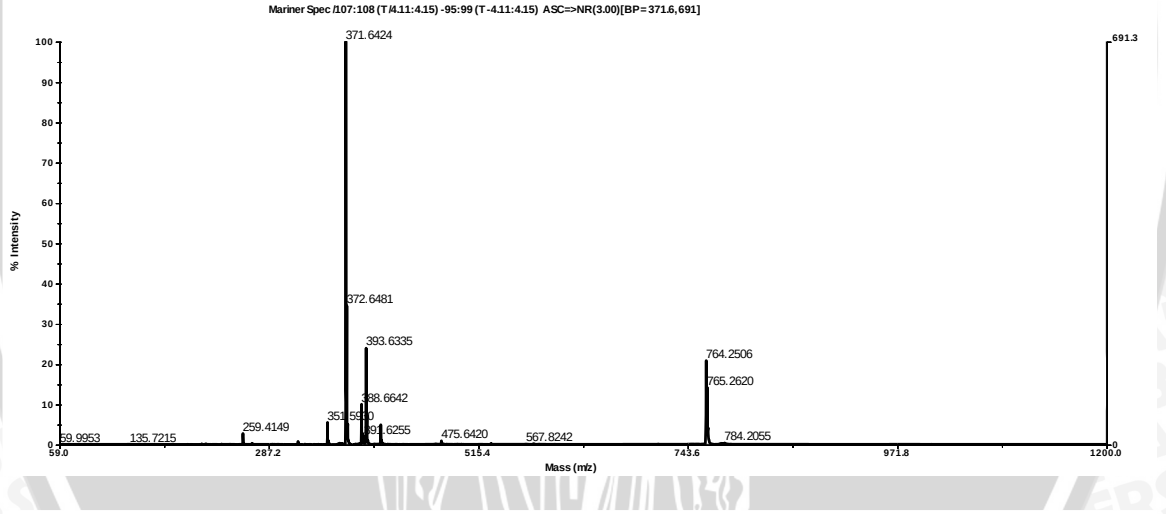


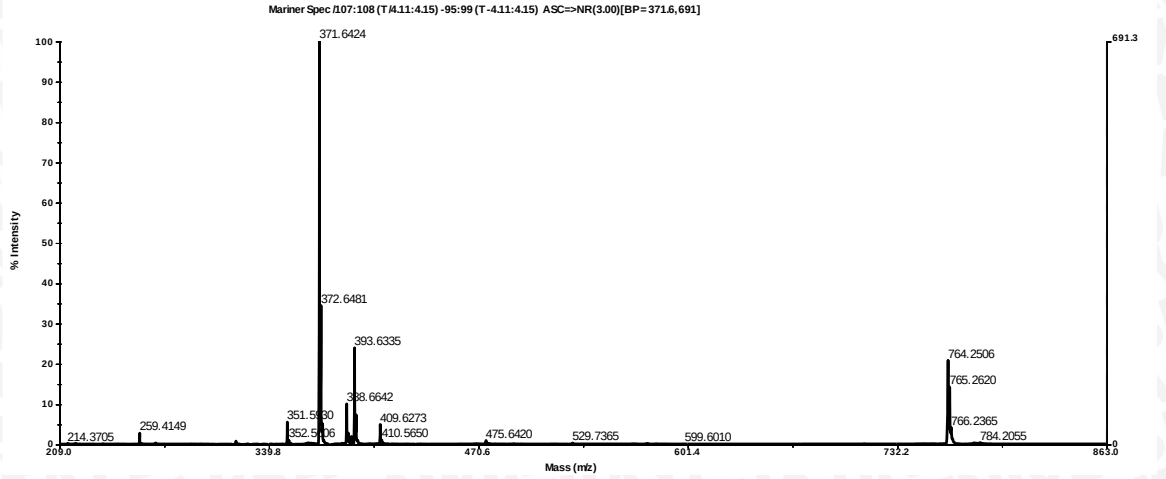


Lanjutan Lampiran 8

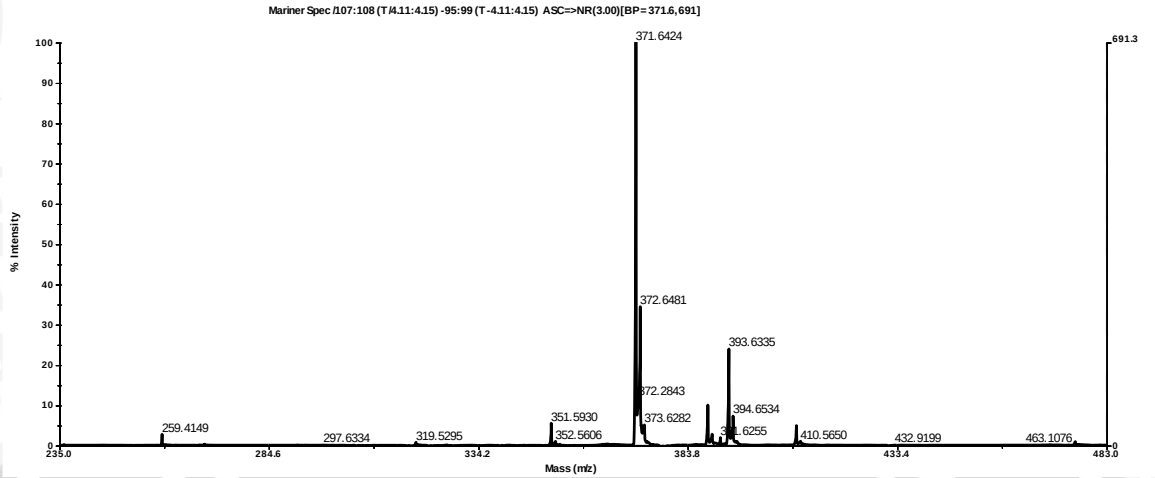


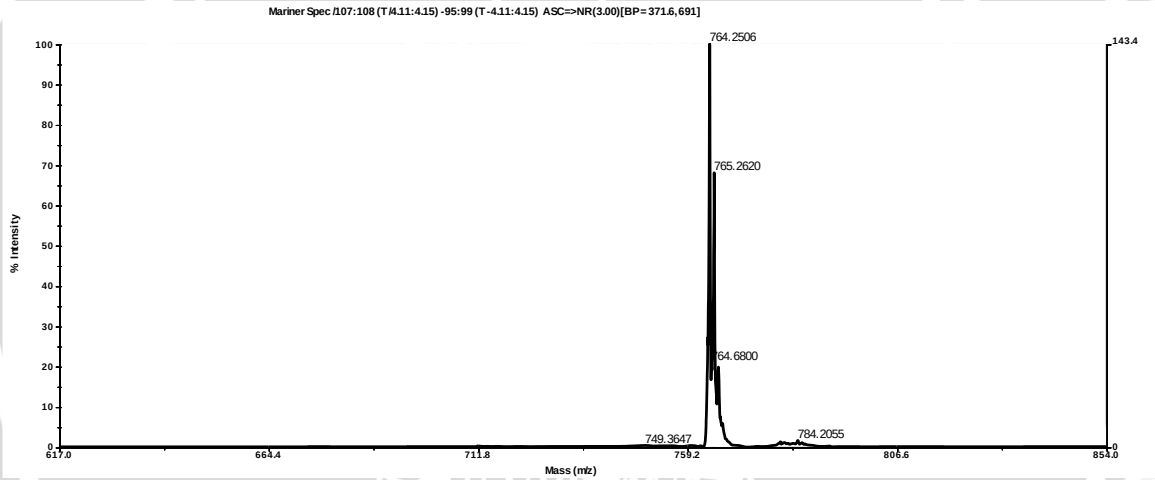
Rt 4.1



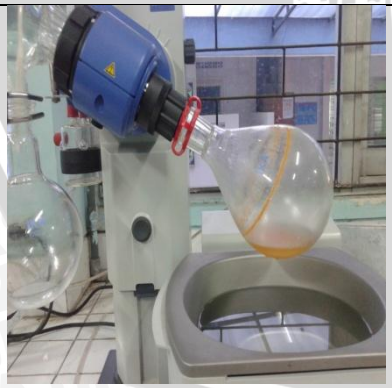


Lanjutan Lampiran 8

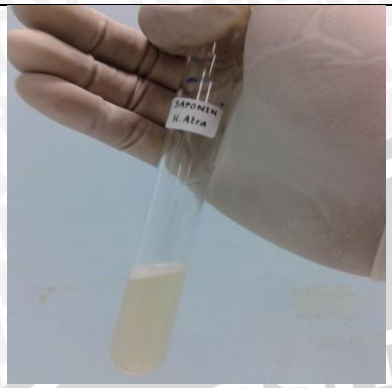
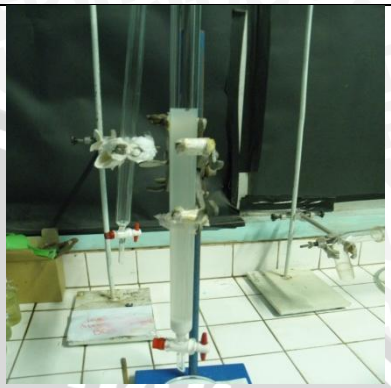




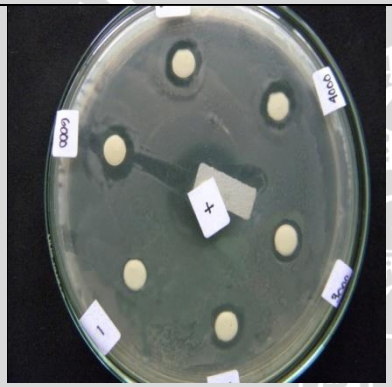
Lampiran 9 Dokumentasi Penelitian

<table>
<tr>
<td>
1. Sampel segar H. atra</td>
<td>
2. H. atra dipotong kecil-kecil dan diangin-anginkan</td>
</tr>
<tr>
<td>
3. Maserasi dengan metanol (1:3)</td>
<td>
4. Penyaringan hasil maserasi</td>
</tr>
<tr>
<td> 
5. Pemisahan pelarut dengan vacuum rotary evaporator</td>
<td>
6. Ekstrak kasar H. atra</td>
</tr>
</table>

Lanjutan Lampiran 9

 7. Uji fitokimia	 8. Isolasi dengan kromatografi kolom
 9. Fraksi hasil kromatografi kolom	 10. Pengelompokan fraksi dengan kromatografi lapis tipis
 11. Noda hasil KLT	 12. Pembuatan konsentrasi fraksi

Lanjutan Lampiran 9

13. Uji daya hambat	14. Inkubasi pada suhu 37^{o} C selama 24 jam
	
15. Pengamatan daya hambat	16. Analisa spektrofotometri Uv-Vis SHIMADZU
17. Analisa spektrofotoetri FT-IR SHIMADZU	18. Analisa LC-MS HITACHI L 6200