

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 kloroform pro analisis MERCK, aquadest, bubuk dan plat silika gel 60 GF₂₅₄ 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.

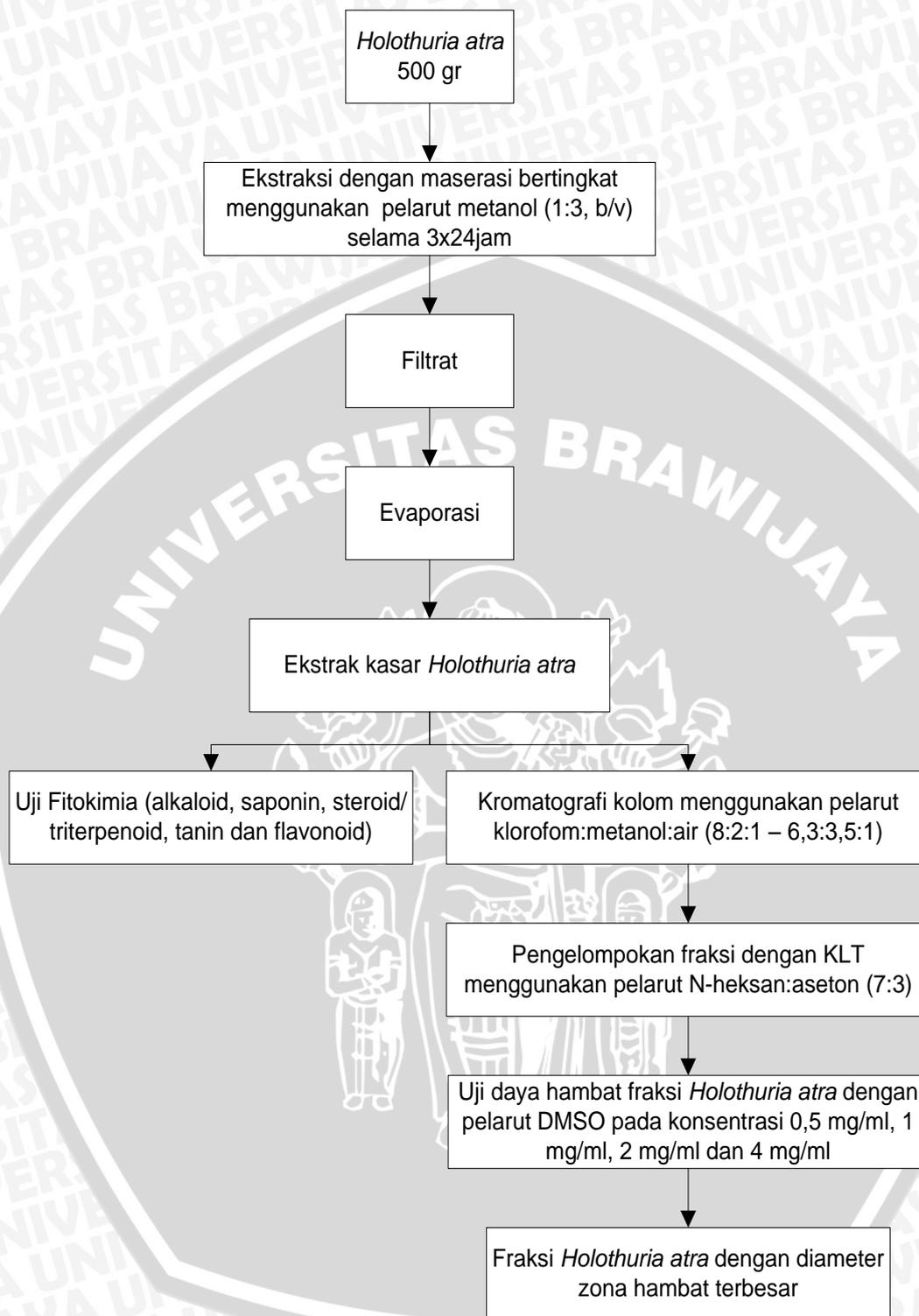
Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap antara lain penelitian pendahuluan yaitu ekstraksi teripang hitam (*Holothuria atra*) dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak yang diperoleh diuji fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada sampel sebagai

identifikasi awal dalam penentuan metode isolasi. Kemudian ekstrak *H. atra* diisolasi dengan kromatografi kolom menggunakan pelarut pengembang tertentu dan dikelompokkan berdasarkan noda yang terbentuk pada kromatografi lapis tipis. Fraksi-fraksi yang telah dikelompokkan 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 1 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:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

Keterangan:

- Y_{ijk} = Hasil pengamatan faktor A taraf ke-i, faktor B taraf ke-j, pada ulangan ke-k
 μ = Rataan umum
 α_i = Pengaruh faktor A pada taraf ke-i
 β_j = Pengaruh faktor B pada taraf ke-j
 $(\alpha\beta)_{ij}$ = Interaksi antara A dan B pada faktor A taraf ke-i, faktor B taraf ke-j
 e_{ijk} = 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 dibersihkan 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° C dan 100 rpm. Ekstrak kasar kemudian diangin-anginkan diatas *waterbath* untuk menguapkan sisa

metanol sehingga ekstrak terbebas dari pelarut. Ekstrak metanol *H. atra* disimpan pada suhu 4° 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 ditetaskan 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 mengelompokkan fraksi-fraksi yang diperoleh. Fraksinasi pada kolom kromatografi menggunakan fase diam *silica gel* 60 GF₂₅₄ 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 bubuk *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 GF₂₅₄ 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 dicelupkan kedalam bejana kromatografi yang berisi fase gerak. Ditunggalkan bejana dan dibiarkan fase gerak naik hingga batas atas plat *silica gel*. Plat selanjutnya disemprot dengan H₂SO₄ 15 % dalam etanol dan dipanaskan. Diamati noda yang terbentuk dan dicatat nilai *R_f*.

– **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 kepadatan 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° dan dibuat olesan kedua, lalu cawan petri diputar lagi 45° dan dibuat olesan ketiga. Cawan petri dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit,

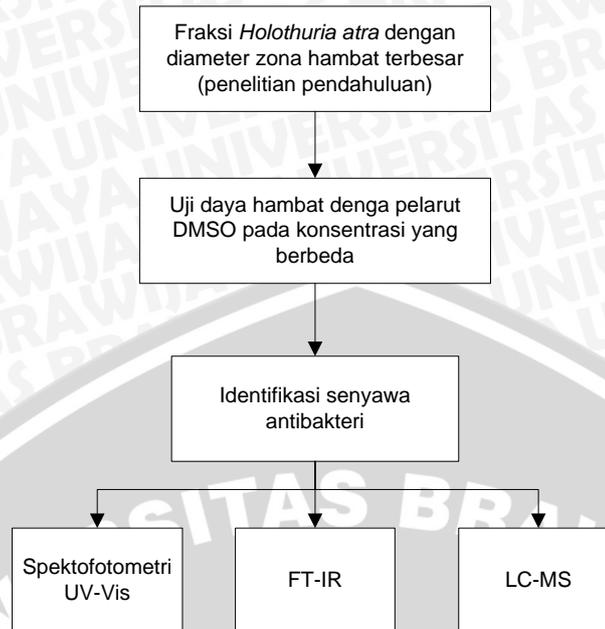
kemudian tempatkan kertas cakram yang sudah direndam sampel dengan berbagai konsentrasi yang diujikan pada permukaan cawan petri. Konsentrasi yang digunakan adalah 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, dan 4 mg/ml. Cawan petri yang sudah ditempelkan kertas cakram diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Setelah 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 kuantitatif 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 konsentrasi 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 2 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:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

- Y_{ij} = Nilai pengamatan dari perlakuan ke- i dan ulangan ke- j .
 μ = Rataan umum
 α_i = Pengaruh perlakuan pada taraf ke- i
 ϵ_{ij} = 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 kepadatan 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° dan dibuat olesan kedua, lalu cawan petri diputar lagi 45° 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° 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 Chromatography 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*. Analisis data pada penelitian pendahuluan menggunakan *Analysis of Variance* (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 Variance* (ANOVA) *One Way* dengan selang kepercayaan 95%, apabila berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT 5 %.