## UJI DAYA HAMBAT DARI EKSTRAK TERIPANG (*Paracaudinaaustralis*) TERHADAP BAKTERI *Aeromonashydrophila*

## SKRIPSI PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN DAN KELAUTAN

Oleh : DIAN CAMALIA NIM. 105080301111014



UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
MALANG
2016

## UJI DAYA HAMBAT DARI EKSTRAK TERIPANG (*Paracaudinaaustralis*) TERHADAP BAKTERI *Aeromonashydrophila*

## SKRIPSI PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN

SebagaiSalah Satu Syaratuntuk Meraih GelarSarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya

Oleh : DIAN CAMALIA NIM. 105080301111014



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2016

## SKRIPSI UJI DAYA HAMBAT DARI EKSTRAK TERIPANG (Paracaudina australis) TERHADAP BAKTERI Aeromonas hydrophila

Oleh:

DIAN CAMALIA NIM. 105080301111014

Telah dipertahankan di depan penguji pada tanggal 07 Maret 2016 dan telah dinyatakan memenuhi syarat SK Dekan no. : Tanggal :

Menyetujui,

Dosen Penguji I

Dr. Ir. Owi Setijawati. Mkes NIP. 19611022 198802 2 001 Tanggal: 2 3 MAR 2016 Dosen Pembimbing I

Ir. Danus M. Biotech NIP. 19500531 198103 1 003 Tanggal : 2 3 MAIN 2010

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Yahya. MP NIP. 19630706 199803 1 005

Tanggal: 2 3 Man 2010

Mengetahui,

Ketua Jurusan MSP

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

2 3 MAR 2016

BRAWIJAYA

## **PERNYATAAN ORISINALITAS**

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benarbenar merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah tertulis 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 dengan hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 03 Maret 2016

<u>Dian Camalia</u> NIM. 105080301111014

## **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 sebesarbesarnya kepada:

- 1. Kedua orang tua (Sugito Dulhadi dan Sulasmi), Adek Fahmi, Adek Fajarserta segenap anggota keluarga Bekasi dan Depokyang 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. Yahya. MP 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. Titik Dwi S. MP dan Dr. Ir. Dwi Setijawati. Mkes, selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan saran dalam penyelesaian laporan skripsi ini.
- 5. Keluarga besar bapak Yudi Santoso dan ibu Sri Wahyu Hidayati yang telah memberikan dorongan semangat dan doa serta orang-orang yang sangat baik dan penuh ikhlas membantu penulis dalam menyelesaikan kuliah.
- Hafid Lana Kurniawan yang selalu setia menemani, memberi semangat serta canda tawa kebahagian kepada penulis

- 7. Ary Anggara Putra dan Berlian Septiara yang selalu setia mendampingi penulis dan banyak berkontribusi demi terselesaikannya laporan Skripsi ini.
- 8. Keluarga besar simpan pinjam Fatiah, Fitria, Fauzia, Asriati, Nilam, Pinctada dan Dinaino Begitu besar arti kehidupan dengan kehadiran kalian dan kita yang terhebat.
- Sahabat Rantau Nurul Riyani, Farah zella Ladika, Mustika Annisa, Fitria Amalia dan Ulyvia (alm) yang selalu menemani dan memberikan semangat penulis.
- Sahabat di Bekasi Purwani Ekayanti, Siti Junianty Dan Dinna Permatasari yang selalu memberikan semangat penulis.
- 11. 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.
- 12. 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.Semogalaporan skripsi ini dapat bermanfaat dalam memberikan informasi bagi pihak yang membutuhkan.

Malang, 03 Maret 2016

Penulis

### RINGKASAN

**Dian Camalia (NIM 105080301111014).** Skripsi Tentang Uji Daya Hambat dari Ekstrak Teripang (*Paracaudina australis*) terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* (di bawah bimbingan **Ir. Darius, M. Biotech** dan **Dr. Ir. Yahya. MP)** 

Motile Aeromonas Septicemia (MAS) adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri pathogen pada jenis ikan air tawar. Gejala penyakit yang disebabkan oleh Aeromonas hydrophila ditandai dengan adanya bercak merah pada ikan dan menimbulkan kerusakan pada kulit, insang dan organ dalam. 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 Paracaudina australis.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi isolat *Paracaudina australis* terbaik untuk menghambat bakteri *Aeromonas hydrophila*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Biologi UIN, Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang serta Laboratorium Kimia PUSPITEK LIPI Serpong pada Maret sampai Agustus 2015.

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, uji fitokimia dan isolasi dengan kromatografi kolom. Penelitian utama meliputi uji daya hambat dan identifikasi senyawa menggunakan spektrofotometri UV-Vis, dan LCMS. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan 4 kali ulangan.

Hasil dari penelitian menunjukan bahwakonsentrasi dari fraksi metanol *Paracaudina australis* yang memberikan daya hambat terbaik terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*terdapat pada konsentrasi 2000 ppm dengan zona hambat rata-rata yang dihasilkan yaitu 3,4 mm. Hasil identifikasi senyawa dengan spektrofotometri UV-Vis, dan LC-MS ESI (+) menunjukan bahwa terdapat serapan pada  $\lambda^{max}$  251 nm dan berat molekul sanyawa dugaan LC-MS sebesar 235 m/z (Rt 2,83) dengan rumus molekul  $C_{13}H_{18}N_2O_2$  dan 764 m/z (Rt 6,95) mempunyai rumus molekul  $C_{48}H_{60}O_8$ . Dengan demikian diduga senyawa tersebut adalah senyawa golongan triterpenoid dan alkaloid yang berperan dalam memberikan aktivitas antibakteri.

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut menggunakan isolat murni *Paracaudina australis*dengan konsentrasi yang lebih tinggi, agar dihasilkan daya hambat luas yang dapat bersifat sebagai antibiotik.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Usulan Skripsi dengan judul "Uji Daya Hambat dari Ekstrak Teripang (*Paracaudina australis*) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*". Usulan Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh izin untuk mengerjakan Skripsi di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa laporan ini tidak akan tersusun tanpa bantuan dari berbagai pihak, rasa hormat dan terima kasih penulis sampaikan kepada :

- Ayah dan Ibu tercinta atas segala doa, kasih sayang, pengertian dan pengorbanan tak ternilai yang telah kalian berikan.
- 2. Bapak Darius dan Bapak Yahya selaku Dosen Pembimbing yang telah banyak memberikan bimbingan, pengarahan, dan masukan.
- 3. Pihak-pihak yang memberikan doa dan dukungannya.

Penulis menyadari bahwa dalam usulan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan, sehingga adanya kritik dan saran dari pembaca nantinya kami harapkan dapat menambah kesempurnaan laporan ini. Akhirnya, semoga dapat bermanfaat bagipembaca pada umumnya, terutama para MahasiswaFakultasPerikanan dan IlmuKelautanUniversitasBrawijaya.

Malang, 07 Maret 2016

Penyusun

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	Halama
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	
PERNYATAAN ORISINALITAS	
UCAPAN TERIMAKASIH	iv
RINGKASAN	
KATA PENGANTAR	
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABELDAFTAR GAMBARDAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Hipotesis	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.6 Waktu dan Tempat	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Teripang (Paracaudina australis)	
2.1.1 Kandungan Senyawa Bioaktif Teripang	5
2.2 Pelarut	5
2.2.1 Metanol	6
2.2.2 DMSO(Dimethyl-sulfoxide)	8
2.2.3 Tetraciclyn	8
2 3 Fkstraksi	8
2.4 Aktivitas Antibakteri	9
2.4.1 Uji Aktivitas Antibakteri	
2.4.2 Mekanisme Penghambatan Antibakteri	10
2.4.3Uji Antibakteri	
2.5 Kromatografi Kolom	
2.6 Identifikasi Senyawa Antibakteri	
2.6.1 Spektrofotometer Ultraviolet Visible (UV-VIS)	14
2.6.2 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)	15
A TINU	
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	
3.1.1 Bahan Penelitian	
3.1.2 Alat Penelitian	
3.2 Metode Penelitian	
3.3 Penelitian Pendahuluan	
3.3.1 Prosedur Penelitian Pendahuluan	
3.3.2 Parameter Uji Penelitian Pendahuluan	23

	23
3.4.1 Prosedur Penelitian Utama	
3.4.2 Parameter Uji Penelitian Utama	25
	26
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
	27
	27
4.1.2 Uji Fitokimia <i>Paracaudina australis</i>	28
4.1.3 Isolasi Paracaudina australisdengan Kromatografi Kolom	31
4.2 Penelitian Utama	32
4.2.1 Uji Antibakteri Fraksi P.australis terhadap A. hydrophila	32
4.2.2 Analisa Senyawa Antibakteri Fraksi <i>Paracaudina australis</i>	
4.3 Mekanisme Penghambatan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	
4.5 Mekanisme Penghambatan bakten Aeromonas nyurophila	39
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	47
	71

## RAWITAYA

## **DAFTAR TABEL**

Tabel 1 Jenis Pelarut Untuk Ekstraksi Senyawa Aktif	6
Tabel 2 Karakteristik Pelarut Metanol	7
Tabel 3 Uji Fitokimia Ekstrak Metanol	29
Tabel 4 Fraksi Ekstrak Metanol P. australis Hasil Kromatografi Kolom	32
Tabel 5Klasifikasi Respon Hambat	33
Tabel 6 Uji Daya Hambat Teripang P. australis	34
Tabel 7 Senyawa Dugaan Analisa Lcms	



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Teripang Paracaudina australis	.5
Gambar 2 Bakteri Aeromonas hydropila	. 12
Gambar3 Diagram Alir Penelitian Pendahuluan	20
Gambar4 Diagram Alir Penelitian Utama	23
Gambar5 Ekstrak Paracaudina australis	28
Gambar6 Uji Fiitokimia	29
Gambar 7 Kromatografi Kolom	. 31
Gambar8 Zona Daya Hambat	33
Gambar9 Grafik Hasil Zona Daya Hambat	34
Gambar10.Spectrum UV-Vis	35
Gambar 11. Spectrum Lc	37
Gambar 12.Spectrum Lc Rt 2,83	37
Gambar 13.Spectrum Lc Rt 6,95	. 37
Gambar 14. Struktur Senyawa Alkaloid	. 38
Gambar 15.Struktur Senyawa Triterpen	

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan Rendemen Ekstrak <i>P.Australis</i>	47
Lampiran2 Perhitungan Pengujian Antibakteri Ekstrak P.australis	48
Lampiran3Prosedur Pembuatan DMSO 10 % dan Konsentrasi	48
Lampiran4Prosedur Isolasi Bakteri A.hydrophila	50
Lampiran5 Analisis Keragaman (ANOVA)	51
Lampiran6Hasil Analisa Spectro UV-Vis	52
Lampiran7Hasil Analisa LC-MS	53
Lampiran8 Hasil Analisa LC-MS Rt 2.83	53
Lampiran9 Hasil Analisa LC-MS Rt 6.95	54
Lampiran10Dokumentasi Penelitian	56



## 1. PENDAHULUAN

## 1.1 Latar belakang

Penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri pathogen pada jenis ikan air tawar. Gejala penyakit yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* ditandai dengan adanya bercak merah pada ikan dan menimbulkan kerusakan pada kulit, insang dan organ dalam (Herupradoto, 2010). Pengendalian perluasan penyakit MAS harus dilakukan sedini mungkin untuk mencegah berjangkitnya wabah penyakit yang menyebabkan kerugian ekonomi.

Bakteri Aeromonas hydrophila termasuk patogen oportunistik yang hampir selalu terdapat di air dan seringkali menimbulkan penyakit apabila ikan dalam kondisi yang kurang baik. Gejala klinis yang timbul pada ikan yang terserang infeksi bakteri Aeromonas hydrophila adalah gerakan ikan menjadi lamban, ikan cenderung diam di dasar akuarium, perdarahan pada bagian pangkal sirip ekor dan sirip punggung, dan pada perut bagian bawah terlihat buncit dan terjadi pembengkakan. Ikan sebelum mati naik ke permukaan air dengan sikap berenang yang labil (Rahmaningsih, 2012). Cara penanggulangan penyakit MAS sudah ditemukan dengan pemberian antibiotik. Antibiotik yang sering digunakan untuk melawan Aeromonas hydrophila adalah tetrasiklin. Pemberian bahan kimia ini memang dapat mencegah maupun mengobati penyakit pada ikan bila digunakan dengan dosis yang tepat, akan tetapi bila digunakan tidak terkontrol maka dapat menimbulkan beberapa efek negatif. Residu antibiotik dapat mencemari lingkungan dan juga dapat dijumpai di tubuh ikan, sehingga ikan tidak aman untuk dikonsumsi oleh manusia (Lukistyowati dan Kurniasih, 2011).

Salah satu potensi biota laut yang dapat dijadikan sebagai antibakteri alami adalah teripang. MenurutWibowo *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 berkhasiatmedis sejak dinasti Ming. Teripang mengandung bahan bioaktif (antioksidan) yang berfungsi mengurangi kerusakan sel jaringan tubuh.

Dalam kajiannya tentang bioaktif pada teripang, Pranoto *et* al., (2012) menjelaskan bahwa teripangmemiliki 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 (*Paracaudina australis*) sebagai senyawa antibakteri terhadap bakteri *Aeromonas hidrophyla* masih sangat sedikit. Hal ini menyebabkan perlu dikembangkannya penelitian lanjutan dari khasiat teripang jenis *Paracaudina australis* terutama tentang konsentrasi terbaik ekstrak *Paracaudina australis* dalam menghambat bakteri *Aeromonas hydrophila* dan identifikasi senyawa aktif. Penelitian ini bertujuan untuk pemanfaatan teripang jenis *Paracaudina* 

australissebagai antibakteri alami terhadap Aeromonas hydrophiladengan konstrasi ekstrak yang terbaik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Kajian tentang pemanfaatan *Paracaudina australis* sebagai antibakteri alami dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Pada konsentrasi berapa isolat *Paracaudina australis* dapat menghasilkan antibakteri terbaik terhadap *Aeromonas hydrophila*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

- Mendapatkan konsentrasi isolat *Paracaudina australis* terbaik untuk menghambat *Aeromonas hydrophila* 

## 1.4 Hipotesis

Hipotesis yang menjadi dasar pada penelitian ini adalah :

- Semakin tinggi konsentrasi isolat *Paracaudina australis* dapat menghambat pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* semakin baik.

## 1.5 Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan:

- Memberikan informasi kepada masyarakat tentang kegunaan teripang (Paracaudina australis).

## 1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Ilmu Kelautan 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 Maret sampai Juni 2015.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Teripang (Paracudina autrallis)

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 (Wibowo *et al.*, 1997).

Teripang 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).

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 20-25°C (Wibowo dkk, 1997).

Klasifikasi dari teripang (Paracaudina australis) menurut Zipcodezoo (2014) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia Filum : Echinodermata Kelas : Holothuroidea Ordo : Molpadiida Family : Caudinidae Genus : Paracaudina

**Spesies** : Paracaudina australis



Gambar 1. Paracaudina australis

### Kandungan Senyawa Bioaktif Teripang 2.1.1

Teripang diketahui mengandung berbagai jenis bahan aktif yang sangat berguna bagi manusia (Nurjannah et al., 2009). 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 antinosiseptif (penahan sakit) dan anti-inflamasi (melawan radang dan mengurangi pembengkakan) (Wibowo et al., 1997).

### 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 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 kimiaCH<sub>3</sub>OH. 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<sup>a</sup>, 2014). Karakteristik dari metanol dapat dilihat pada **Tabel 2**.

**Tabel 2.Karakteristik Pelarut Metanol** 

PC1400000
CH₃OH
32.04 g/ mol
Cairan tak berwarna
0.7918 g/ cm <sup>3</sup>
-97 °C
64.7 °C
Tercampur penuh
15.5
0.59 mPa.s (20 <sup>o</sup> c)
1.69 D (gas)
Mudah terbakar (F), Toxic (T)
11°C

Sumber: Wikipedia<sup>a</sup> (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 (DMSO) merupakan salah satu pelarut dalam uji antibakteri maupun uji antifungal suatu ekstrak atau obat baru. Ditambahkan oleh Handayani et al., (2007), DMSO 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.

## 2.2.3 Tetracycline

Antibiotik golongan *tetracycline* yang pertama ditemukan ialah *klortetracycline* yang dhasilkan oleh *Streptomyces aureofaciens*. Kemudian ditemukan *oksitetracycline* dari Sterptomyces rimosus. *Tetracycline* sendiri dibuat secara semisintetik dari klor*tetracycline*,tetapi juga ddapat diperoleh dari species Streptomyces lain. (Tan dan Rahardja, 2008).

Tetracycline merupakan kelompok antibiotika yang dihasilkan oleh jamur Streptomyces aureofaciens atau S. rimosus. Tetracycline merupakan derivat dari senyawa hidronaftalen, dan berwarna kuning. Tetracycline merupakan antibiotika berspektrum luas yang aktif terhadap bakteri gram-positif maupun gram-negatif yang bekerja merintangi sintesa protein. Antibiotik golongan tetracycline yang pertama ditemukan ialah klortetracycline yang dhasilkan oleh Streptomyces aureofaciens. Kemudian ditemukan oksitetracycline dari Sterptomyces rimosus. Tetracycline sendiri dibuat secara semisintetik dari klortetracycline,tetapi juga ddapat diperoleh dari species Streptomyces lain (Subronto, 2001).

## 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 (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).

Ada beberapa cara ekstraksi diantaranya adalah ekstraksi secara refluks, ekstraksi secara sonikasi dan maserasi. Ekstraksi secara refluks membutuhkan peralatan khusus, waktu yang relatif lama, energi dan bahan kimia yang cukup banyak, sehingga diperlukan alternatif ekstraksi yang lebih sederhana, cepat, efisien dan tidak mahal, namun tetap memenuhi kaidah – kaidah analisis. Ekstraksi secara sonikasi sangat tepat diterapkan pada analisa dalam jumlah masif dengan waktu yang terbatas. Sedangkan maserasi merupakan cara yang sangat sederhana dan tidak membutuhkan peralatan khusus sehingga dapat diterapkan di semua laboratorium (Mujahid*et al.*, 2011).

## 2.4 Aktivitas Antibakteri

Menurut Jawetz *et al.*, (1995), 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 cakram diperkenalkan oleh Willian Kirby dan Alfred Bauer pada tahun 1966. Kertas cakram yang sudah direndam dengan zat antimikroba diletakkan di atas lempengan media agar yang sebelumnya sudah disemai dengan mikroorganisme uji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme (Lay, 1994).Menurut Jawetz, *et al.* (1995), semakin besar diameter wilayah jernih maka semakin baik penghambatannya. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi metode Kirby – Bauer (1996) diantaranya adalah konsentrasi mikroba uji, konsentrasi antibiotik yang terdapat dalam cakram, jenis antibiotik, serta pH medium.

## 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 (Lay dan Hastowo, 1992), ada beberapa tahap daya kerja bahan antimikrobial diantaranya adalah penghambatan pertumbuhan analog, penghambatan sintesis dinding sel, penghambatan fungsi membran sel, penghambatan sintesis protein, penghambatan sintesis asam nukleat dan yang terakhir bahan antiviral.

Menurut Pelczar dan Chan (1988), 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: tetracycline.

## 2.4.3 Bakteri Uji

Klasifikasi Aeromonas hydrophilamenurut (Seshadri, 2006) adalah:

Superkingdom : Prokariota Kingdom : Bacteria

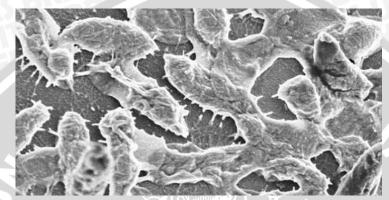
Classis : Proteobakteria

Subclassis : Gammaproteobacteria

Ordo : Aeromonadales Famili : Aeromonadaceae

Genus : Aeromonas

Species : Aeromonas hydrophila



Gambar 2. Aeromonas hydrophila (Google Images<sup>a</sup>, 2015)

Aeromonas hydrophila merupakan bakteri heterotrofik uniseluller, tergolong protista prokariot yang dicirikan dengan tidak adanya membranyang memisahkan inti dengan sitoplasma. Bakteri ini biasanya berukuran0,7 – 1,8 x 1,0 – 1,5 μm dan bergerak menggunakan sebuah polar flagel (Kabata, 1985 dalam Haryani, et al., 2012).

Aeromonas adalah anggota dari famili Aeromonadaceae yangumumnyahidup di air tawar. Aeromonashydrophilajuga ditemukan di tanah, perairan asin dan juga ditemukanpada air minum yang diklorinasi dan non-klorinasi (Al-Fatlawy dan Hazim, 2014).

Menurut Lukistyowati dan Kurniasih (2012), Aeromonas hydrophila termasuk Gram negatif, berbentuk batang pendek, bersifat aerob dan fakultatif anaerob, tidak berspora, motil mempunyai satu flagel, hidup pada kisaran suhu 25-30°C. Serangan bakteri ini dapat mengakibatkan gejala penyakit hemorhagi septicaemia yang mempunyai ciri luka dipermukaan tubuh, insang, ulser, abses, eksopthalmia dan perut gembung serta gastroenteristis, diare dan extra intestinal pada manusia.

Bakteri Aeromonas hydrophila termasuk bakteri Gram negatif, yang sifatnya oksidasi positif dan mampu memfermentasi beberapa jenis gula, seperti glukosa, fruktosa, maltosa dan trehalosa (Rosidah dan Wila, 2012). Bakteri Gram negatif mempunyai lapisan peptidaglikan yang tipis, terdiriatas 1-2 lapis sehingga pori-pori pada dinding sel Gram negatif cukup besar. Permeabilitasnya yang tinggi memungkinkan terjadi perlepasan kompleks ungu kristal-yodium (UK-Y), sehingga bakteri berwarna merah. Bakteri Gram negatif mempunyai dinding sel yang mengandung lipid,lemak, atau substansi seperti lemak dengan persentase yang lebih tinggi. Dalam proses pewarnaan Gram, pencucian dengan alkohol akan menyebabkan lemak tersebut terekstraksi sehingga bakteri berwarna merah atau merah muda karena menyerap zat warna safranin (Firnanda, et al., 2013).

## 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, 2001). 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 (Sa'ad, 2009). Ditambahkan menurut Sastrohamidjojo (2001), 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).

Spektrofotometer UV-Vis sangat bermanfaat dalam penentuan dosis senyawasenyawa 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 (Sastrohamidjojo, 2001).

Menurut Skoog (1996) 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 otomotais.

## 2.6.2 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 menurut Kazakevich dan Lubrutto (2007), pemisahan sampel dimulai dari kromatografi (LC) berdasarkan sifat kepolaran sampel dengan kolom dan fase gerak dalam kolom. Komponen - komponen sampel yang telah terpisah mengalami ionisasi yang kemudian berat molekul sampel dapat diidentifikasi berdasarkan fragmentasi komponen oleh detektor pada spektrometer (MS). Secara umum prinsip dari spektrometer massa dalam menghasilkan spektrum massa melalui empat tahap, yaitu pengenalan sampel, ionisasi molekul sampel untuk mengubah molekul netral menjadi ion dalam

fase gerak, menganalisis massa (memisahkan ion yan dihasilkan oleh rasio massa ke muatan) dan mendeteksi ion yang telah dipisahkan.

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.

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 (*Paracaudina australis*) dari pantai 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 GF254 MERCK, kapas, kertas saring Whatman No 1, alumunium foil, pasir halus dan plastik wrap. Bahan yang digunakan untuk kultur bakteri adalah bakteri *Aeromonas hidrophyla* biakan murni koleksi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, media triptic soya agar MERCK, dan aquades. Untuk menguji daya hambat bakteri, bahan-bahan yang digunakan adalah fraksi metanol *Aeromonas hidrophyla* yang diperoleh dari kromatografi kolom dengan berbagai konsentrasi, biakan *Aeromonas hidrophyla* koleksi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, media *triptic soy agar* MERCK, kertas cakram, cotton swap steril, DMSO 10 % MERCK, antibiotik *tetracyline* dan alkohol 70 %.

## 3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan antara lain pisau, gunting, blender, timbangan analitik, beaker glass 500 ml, beaker glass 1000 ml, Erlenmeyer 500 ml, spatula, sendok, tabung reaksi, sendok bahan, pipet, pipet volume, piper serologis, bola hisap, gelas ukur, inkubator, rotary vacum evaporator, botol vial, corong, cawan petri, autoklaf, oven, pinset, bunsen, sprayer, jangka sorong, alat kromatografi kolom, UV - Vis dan LC – MS.

## 3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Tujuan menggunakan metode eksperimen adalah untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan konsentrasi berbeda pada ekstrak teripang (*Paracaudina australis*) terhadap kemampuan daya hambat antibakteri pada bakteri uji *Aeromonas hydrophhila*. Indikator yang ingin dicapai adalah adanya perbedaan diameter zona bening (zona penghambatan bakteri) pada setiap konsentrasi yang diberikan dimana semakin lebar zona bening, maka semakin efektif senyawa kimia dari sampel yang berhasil diisolasi.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah metanol pro analisis sebagai pelarut pengekstrak bioaktif *Paracaudina australis*, penggunaan *tetraciclyn* sebagai antibiotik dan pemberian konsentrasi yang berbeda pada. Sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah perbedaan lebar diameter daerah hambatan antibakteri yang terlihat sebagai zona bening di sekitar kertas cakram dan dinyatakan dalam satuan mm.

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian adalah rancangan acak lengkap (RAL) sederhana dengan 4 kali ulangan. Faktor yang digunakan adalah perbedaan konsentrasi ekstrak *Paracaudina australis* erbaik (500ppm,1000ppm,1500ppm, dan 2000ppm). Rumus model untuk Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana yang digunakan adalah:

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

## Keterangan:

Yij = Nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.

μ = Rataan umum

αi = Pengaruh perlakuan pada taraf ke-i

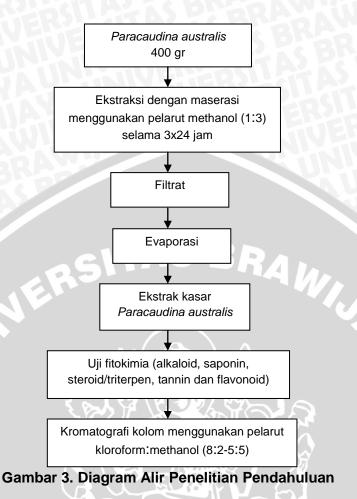
εij = Galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap antara lain penelitian pendahuluan yaitu ekstraksi teripang (*Paracaudina australis*) 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 *Paracaudina australis* 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 *Aeromonas hydrophila*. Hasil penelitian pendahuluan adalah fraksi metanol *Paracaudina australis* yang menghasilkan daya hambat terbaik terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Penelitian utama yaitu uji daya hambat fraksi metanol 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 dan LCMS.

## 3.3 Penelitian Pendahuluan

Kegiatan dalam penelitian pendahuluan meliputi ekstraksi teripang Paracaudina australis, uji fitokimia dan uji kromatografi kolom. Diagram alir proses penelitian pendahuluan dapat dilihat pada **Gambar 3**.



## **Prosedur Penelitian Pendahuluan**

3.3.1

## Ekstraksi Paracaudina australis (Rasyid, 2012; Albuntana et al., 2011)

Sampel segar teripang (Paracaudina australis) 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). 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 kemudaian diangin-anginkan diatas waterbath untuk

menguapkan sisa metanol sehingga ekstrak terbebas dari pelarut. Ekstrak metanol *P. australis* disimpan pada suhu 4° C untuk digunakan pada analisis selanjutnya.

## Uji Fitokimia Ekstrak Metanol Paracaudina australis

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 *Paracaudina australis* dengan Kromatografi Kolom(Han *et al.*, 2012; Matsuno dan Miyuki, 1995)

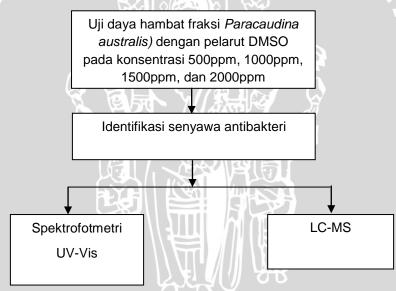
Pemisahan senyawa yang terdapat pada *Paracaudina australis*dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom. Fraksinasi pada kolom kromatografi menggunakan fase diam *silica gel* 60 GF<sub>254</sub>sedangkan fase gerak yang digunakan adalah kloroform:metanol (8:2–5:5). Fase diam dibuat dengan 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-ketuk dan diberi pasir halus sebagai pelapis, selanjutnya ditunggu hingga *silica gel* memadat sempurna. Ekstrak kasar *Paracaudina australis*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.

## 3.3.2 Parameter Uji Penelitian Pendahuluan

Parameter yang digunakan dalam penelitian pendahuluan yaitu parameter kuantitafif berdasarkan data yang diperoleh dari ekstraksi dan uji fitokimia didapatkan senyawa-senyawa yang memiliki potensi menghambat pertumbuhan bakteri. Serta didapatkan ekstrak halus dari kromatografi kolom.

## 3.4 Penelitian Utama

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



Gambar 4. Diagram Alir Penelitian Utama

## 3.4.1 Prosedur Penelitian Utama

Uji Antibakteri Paracaudina australisterhadap Bakteri Aeromonas
 hydrophila dengan Metode Difusi kertas cakram (Hermawan, 2007)

Ekstrak kasar diujikan ke bakteri dengan metode difusi agar. Prosedur pengujian antibakteri penelitian ini menggunakan metode cawan agar difusi. Prinsip uji ini adalah, pada lempeng agar yang telah disemai dengan mikroorganisme

penguji ditempelkan cakram kertas yang berisi berbagai antibiotik. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh antibiotik terlihat sebagai wilayah jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme.

Metode yang digunakan dalam uji aktivitas antimikroba fraksi Paracaudina australis 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 tetracycline. Cawan petri dengan media Tripton Soya Agar disiapkan untuk disebar dengan bakteri uji. Kapas lidi (cotton swab) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji dengan kepadatang sesuai dengan McFarland 10<sup>5</sup>, 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 terbuat dari kertas saring dengan diameter 6mm yang sudah direndam sampel dengan berbagai konsentrasi yang diujikan pada permukaan cawan petri. Konsentrasi fraksi Paracaudina australis yang digunakan adalah 500ppm, 1000ppm, 1500ppm, dan 2000ppm. Sedangan konsentrasi dari antibiotik yang digunakan adalah 50ppm. 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.

### Uji Spektrofotometri Ultraviolet Visible (UV – Vis)

Pengujian spektrofotometer UV-Vis dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Pengujian ini digunakan untuk mengetahui panjang gelombang dan absorbansi sampel yang diamati, kemudian hasilnya digunakan untuk menganalisa karakteristik bioaktif ekstrak *Paracaudina australis*. Pengujian ini menggunakan alat spektrofotometer UV – Vis. Menurut Fatimah *et al.*, (2009), cara analisa dengan alat spektrofotometer UV – Vis adalah mula – mula alat dinolkan dengan cara larutan blanko dimasukkan ke dalam dua buah kuvet lalu ditekan "back correct" dan "run". Setelah alat dalam kondisi nol, salah satu blanko dikeluarkan dan diganti dengan ekstrak *Paracaudina australis*. Kemudian, diatur panjang gelombang antara 200 nm – 500 nm. Maka akan muncul tampilan spektrum panjang gelombang dari ekstrak *Paracaudina australis*.

### Uji Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC – MS)

Pengujian *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry* (LC – MS) dilakukan di Laboratorium Kimia PUSPITEK serpong. Spektroskopi massa adalah alat yang berfungsi untuk menentukan dan mengidentifikasi komponen suatu senyawa. dimana prinsip kerjanya dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massanya sesuai dengan rasio fragmentasinya pada ekstrak *Paracaudina australis*.

### 3.4.2 Parameter Uji Penelitian Utama

Penentuan daya hambat fraksi metanol *Paracaudina australis* terbaik dilakukan mengukur diameter (mm) area 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

BRAWIIAY

antimikroba. Selain itu hasil dari analisa UV-VIS dan LC-MS dijadikan panduan mengidentifikasi senyawa-senyawa pada fraksi *Paracaudina australis* 

### 3.4.3 Analisa Data

Dalam pengolahan data hasil penelitian untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diukur digunakan analisis keragaman (ANOVA). Apabila dari hasil perhitungan didapatkan perbedaan yang nyata (F hitung>F tabel 5%) atau (F hitung>F tabel 1%) perbedaan yang sangat nyata (maka dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk menentukan terbaik.



### 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Penelitian Pendahuluan

Hasil penelitian pendahuluan memperlihatkan ekstrak teripang *Paracaudina* australis dalam menghambat bakteri *Aeromonas hydrophila*. Hal ini dibuktikan dengan adanya senyawa-senyawa (alkaloid, saponin, steroid/terpenoid) yang memiliki potensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui konsentrasi terbaik penghambatan pertumbuhan *Aeromonaas hydrophila* serta identifikasi senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri.

### 4.1.1 Ekstraksi Paracaudina australis

Teripang *Paracaudina australis*segar dengan berat 500 gr setelah disiangi dan dikeringkan dengan oven pada suhu 60°c selama 24 jam memiliki berat konstan 400gr. Selanjutnya daging teripang melalui tahap ekstraksi dengan metode 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 kuning keruhini menandakan senyawa-senyawa bioaktif yang terdapat pada *Paracaudina australis* kemungkinan 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, sehinggametabolit 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 kuningkeruh (Gambar.5) filtrat kemudian dibebaskan dari pelarutnya menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 40°c dan kecepatan putaran 100 rpm. Untuk menghilangkan pelarut yang masih tersisa yaitu dengan menguapkannya didalam waterbath suhu 60°c selama 12 jam.

Diperoleh ekstrak kasar berupa cairan berwarna kuning yang berbau amis.

Berat akhir ekstrak kasar sebesar 16,47 gr sehingga diperoleh % rendemen sebesar 4,118%







a. b. c.

Gambar 5 Ekstrak *Paracaudina australis*: a.) proses maserasi, b.) filtrat hasil

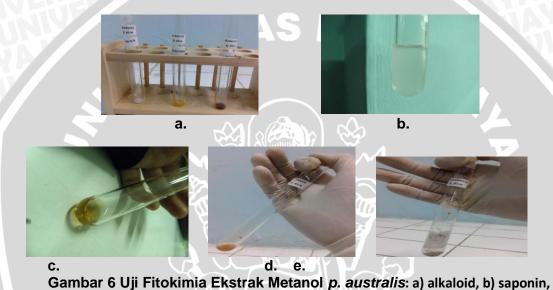
maserasi dan c.) ekstrak kasar

### 4.1.2 Uji Fitokimia Paracaudina australis

Pengujian fitokimia merupakan uji kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder yang diduga terkandung dalam *paracaudina australis*.Uji fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, saponin, steroid/triterpen, flavonoid, dan tannin. Tahap ini akan menentukan perlakuan selanjutnya dalam penentuan isolasi dan pemurnian senyawa *paracaudina australis*.

Hasil uji fitokimia menunjukan adanya senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam tubuh paracaudina australis (Gambar 6). Senyawa-senyawa yang terdeteksi antara lainsteroid 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.



c) teriterpen, d )tanin, e) flavonoid

Tabel 3. Uji Fitokimia Ekstrak Metanol P. australis

Uji	Hasil	Reaksi
Alkaloid	(iii)	
<ul> <li>Pereaksi Mayer</li> </ul>	\#(//	Terdapat endapan putih
<ul> <li>Pereaksi Wagner</li> </ul>	40	Terdapat endapan coklat
<ul> <li>Pereaksi</li> </ul>	+	Terdapat endapan jingga
Dragendroff		
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 1-10cm 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 membrane sterol sehingga terjadi pelepasan protein dan enzim dari sel bakteri.Selain itu saponin berperan dalam menurunkan tegangan permukaan membrane sterol dari dinding sel jamur sehingga permeabilitasnya meningkat.

Positif triterpen ditunjukan dengan terbentuknya cincin coklat keunguan setelah ditetesi dengan asam sulfat pekat. Triterpen 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 menjadisenyawa holothurin yang bersifat toksik terhadap bakteri dan jamur. Ditambahkan oleh Bordbar et al., (2011), teripang kayaakan triterpen glikosida seperti holothurin A dan B dan menunjukan aktivitas antijamur terhadap 20 jenis jamur secara invite. Roihanah et al., (2012) menjelaskan bahwa triterpenoid mampu merusak membrane sel, menonaktifkan enzim dan mendenaturasi protein sehingga dinding sel mengalami kerusakan. Perubahan

permeabilitas membrane sitoplasma memungkinkan ion-ion organic dapat masuk ke dalam sel dan berakibat terhambatnya pertumbuhan atau bahkan dapat mematikan sel bakteri.

### 4.1.3 Isolasi *Paracaudina australis* Dengan Kromatografi Kolom

Isolasi pada penelitian ini bertujuan untuk memisahkan dan memurnikan senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak *paracaudina australis*. Substansi campuran senyawa yang akan dipisahkan menjadi komponen-komponen senyawa yang lebih kompleks. Pemisahan yang dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom.

Dalam kromatografi kolom digunakan fase diam *silica gel* Gf254 dan fase gerak kloroform:metanol (8:2-5:5). Penggunaan fase gerak dilakukan secara bertahap dalam hal konsentrasi campuran (klorofom:metanol) dengan tujuan senyawa-senyawa yang memiliki perbedaan kepolaran akan bergerak keluar secarabergantian sesuai dengan kepolarannya. Proses pemisahan pemurnian dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada **Gambar 7**.



Gambar 7 Kromatografi Kolom paracaudina australis

Hasil dari kromatografi kolom ekstrak metanol paracaudina australis dapat dilihat pada **Tabel 4** 

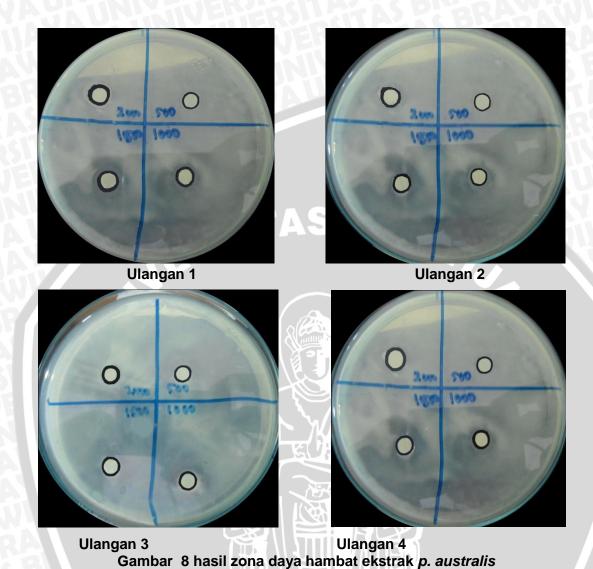
Tabel 4Fraksi Ekstrak Metanol Paracaudina australis Hasil Kromatografi Kolom

No Botol	Warna	Fraksi
1	kuning bening	A
2	kuning bening	
3	kuning bening	
4	kuning bening	
5	kuning bening	
6	kuning bening	

### 4.2 Penelitian Utama

## 4.2.1 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi *Paracaudina australis* Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophilla*

Pengujian aktivitas antibakteri dalam penelitian menggunakan bakteri Aeromonas hydrophila. Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi cakram. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini dibuat bervariasi dengan pembanding kontrol positif antibiotik tetrasiklin. Masing-masing fraksi hasil kromatografi kolom dibuat seri konsentrasi yaitu 500 ppm,1000 ppm,1500 ppm ,dan 2000ppm. Setiap perlakuan dilakukan ulangan sebanyak 4 kali. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi optimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri Aeromonas hidrophyla jika dibandingkan dengan control positif antibiotik Tetrasiklin.



Menurut Windarwati (2011), diameter penghambatan adalah selisih antara diameter areal bening yang terbentuk dengan diameter sumur. Hasil zona bening yang terbentuk menurut (Poeloengan, 2010)

Tabel 5. Klasifikasi Respon Hambatan

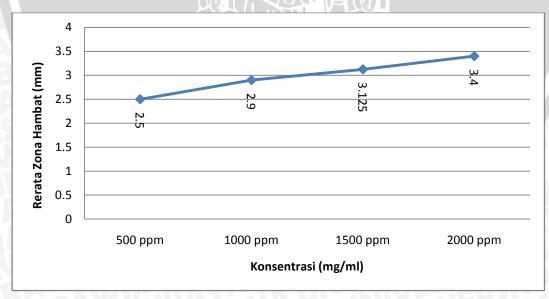
Daya hambat antibakteri	Kategori daya hambat antibakteri
≥ 20 mm	Sangat kuat
10 – 20 mm	Kuat
5 – 10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

Tabel 6. Uii	Daya Hambat	Teripang	<b>Paracaudina</b>	australis
--------------	-------------	----------	--------------------	-----------

KONSENTRASI		ULANGAN	W.H	1-128	TOTAL	RERATA	ST.DEV
(ppm)	1	2	3	4			LAS B
500	2.3	2.3	2.6	2.8	10	2.5	0.244948974
1000	3	2.5	3.2	2.9	11.6	2.9	0.294392029
1500	3.2	3.1	2.9	3.3	12.5	3.125	0.170782513
2000	3.4	3.3	3.4	3.5	13.6	3.4	0.081649658
50TETRACYCLIN	5	4.9	4.5	4.5	18.9	4.725	0.262995564
TOTAL	16.9	16.1	16.6	17	66.6	16.65	VAS

Hasil dari ekstrrak metanol menunjukkan luas zona bening yang terbentuk., besarnya zona bening pada antibiotik tetracycline sebagai kontrol positif lebih baik dalam menghambat bakteri. Bila dilihat dari konsentrasinya, dalam menghambat bakteri Aeromonas hydrrophila konsentrasi 2000 ppm lebih baik dalam menghambat bakteri dengan luas zona bening sebsar 3,4 mm.hal ini dibuktikan oleh grafik BNT 5%.

Data pengamatan zona hambat terbentuk dan uji BNT 5% pada penelitian utama dapat dilihat pada **gambar 9**.



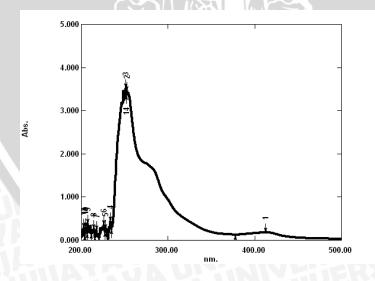
Gambart 9 Grafik Rerata Hasil Zona Daya Hambat Dan Hasil Uji Bnt 5% Fraksi paracaudina australis

Grafik diatas diketahui rata-rata zona hambat yang terbesar dihasilkan oleh konsentrasi 2000ppm yaitu sebesar 3,4 mm. sedangkan rata-rata zona hambat terkecil dihasilkan pada konsentrasi 500ppm yaitu sebesar 2,5 mm. Diperoleh nilai F hitung dari ANOVA sebesar 12,90 lebih besar dari F 5%. Dengan demikian terbukti bahwa konsentrasi 2000 ppm berbeda nyata antara pengaruh pemberian konsentrasi yang berbeda.

Untuk menentukan perlakuan terbaik yang memberikan zona daya hambat terbesar maka dilakukan uji BNT 5% (Lampiran 5) menunjukan konsentrasi 2000 ppm memiliki zona daya hambat terbesar, sehingga dapat disimpulkan konsentrasi 2000ppm adalah konsentrasi terbaik dalam menghambat bakteri *Aeromonas hydrophila* 

### 4.2.2 Analisa Senyawa Antibakter Fraksi Paracaudina australis

Fraksi teraktif ekstrak metanol *paracaudina australis* dianalisa komponen senyawa yang terkandung di dalamnya dengan menggunakan ultra violet (UV-Vis), dan analisis LC-MS.

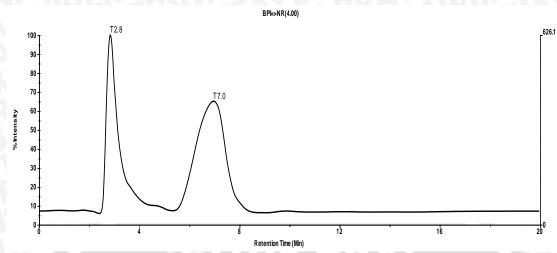


Gambar 10 Spectrum UV-Vis Fraksi Paracaudina australis

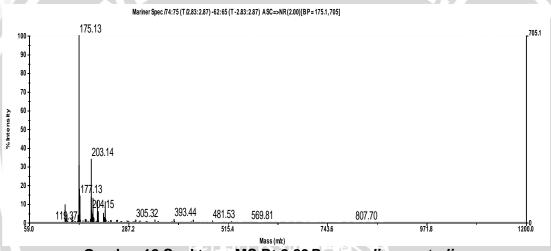
Hasil analisa spektrofotmetri UV-Vis dengan menggunakan pelarut metanol menunjukan terbentuknya 2 puncak pita serapan. Pita serapan yang kuat terjadi pada panjanggelombang 251 nm dengan absorbansi 3,524 dan pada panjang dengan absorbansi 3,449. gelombang 252 Pada panjang tersebutdiduga terjadi transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  hal ini disebabkan oleh kromofor tak terkonjugasi yangmengabsorbansi 200 senyawa sekitar nm. Menurut Harborne(1996) rentang panjang gelombang antara 180 sampai 380 nm termasuk ke dalam senyawa triterpenoid.

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

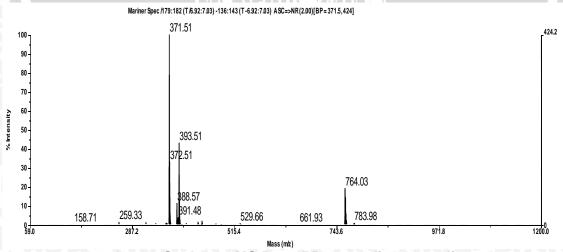
Analisa senyawa antibakteri dengan LC-MS menghasilkan beberapa Retention Time (RT). Hasil pengujian LC-MS dari fraksi tersebut menghasilkan dua Retention Time (RT) diantaranya 2.83 dan 6.95.hasil analisa senyawa antibakteri dengan LC-MS dapat dilihat pada **Gambar 11, 12 dan 13** 



Gambar 11Spektrum LC FraksiParacaudina australis



Gambar 12 Spektrum MS Rt 2,83 Paracaudina australis



Gambar 13 Spektrum MS Rt 6,95 Paracaudina australis

Tabel 7 Senyawa Dugaan Analisa LCMS Fraksi Paracaudina australis

Retention Time	Berat Molekul	Rumus Molekul
2,83	235 [M+H]	$C_{13}H_{18}N_2O_2$
6,95	764[M+]	$C_{48}H_{60}O_8$

Hasil analisa spectrum MS teraktif ekstrak metanol *Paracaudina australis* pada Rt 2,83(Lampiran 7) memiliki berat molekul 235 m/z dengan rumus molekul C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termasuk senyawa cytisine golongan alkaloid piridin dimana struktur ini mengandung 1 atom nitrogen sebagai bagian dari sistem cincin siklik.

**Gambar 14 Struktur Cytisine** 

Pada Rt 6,95 **(Lampiran 9)** di duga senyawa memiliki berat molekul sebesar 764 m/z. berdasarkan penelusuran database massa, senyawa dengan berat molekul 764 m/z dengan rumus molekul  $C_{48}H_{60}O_8$ termasuk dalam golongan triterpenoid pentasiklik.

Gambar 15Struktur Triterpenoid Pentasiklik

### 4.3 Mekanisme Penghambatan Bakteri Aeromonas hydrophila

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan ekstrak *Paracaudina australis* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*, namun efek yang diberikan ektrak *Paracaudina australis* masih lebih kecil dibandingkan antibiotik tetrasiklin.Hal ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor misalnya komponen senyawa antibakteri dan efektivitasnya serta tingkat resistensi dari bakteri uji.

Bakteri uji Aeromonas hydrophila 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 besarsangat lambat dalam menembus membran luar, sehingga bakteri gram negatif relatif sangat tahan terhadap antibiotik. Hal ini yang mungkin terjadi sehingga senyawa antibakteri Paracaudina australis memiliki aktivitas yang lebih rendah dibandingkan tetrasiklin. Namun demikian, Paracaudina australis dapat dikategorikan memiliki potensi sebagai antibakteri alami.

Dalam menghambat pertumbuhnan bakteri Aeromonas hydrophila golongan alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel. Selain itu menurut Harborne (1998) menyatakan ketersediaan alkaloid dapat mengganggu terbentuknya komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga dapat mengakibatkan sel bakteri menjadi lisis.

Sedangkan dalam menghambat pertumbuhan sel bakteri golongan triterpenoid didugamampu 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.



### 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Hasil dari keempat konsentrasi yaitu 500, 1000, 1500 dan 2000 ppm yang digunakan sebagai konsentrasi ekstrak Paracaudina australis, yang menghasilkan daya antibakteri terbaik terdapat pada konsentrasi 2000 ppm. Hal ini ditunjukkan dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 3,4 mm.

Hasil analisis dengan metode LC-MS, diduga terdapat 2 senyawa antibakteri yang terekstrak dari Paracaudina australis, berdasarkan penelusuran database massa, pada Rt 2,83 memiliki berat molekul 235 m/z dengan rumus molekul C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>didiuga senyawa ini termasuk golongan alkaloid. Sedangkan pada Rt 6,95 di duga senyawa memiliki berat molekul sebesar 764 m/z dengan rumus molekul C<sub>48</sub>H<sub>60</sub>O<sub>8</sub> termasuk dalam golongan triterpenoid pentasiklik

### 5.2 Saran

Disarankan pada penelitian selanjutnya agar digunakan ekstrak murni dari Paracaudina australis dengan konsentrasi yang lebih tinggi, agar dihasilkan daya hambat luas yang dapat bersifat sebagai antibiotik.

### 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 KelautanTropis* 3 (1): 65-72.

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.

Fatimah, S., I Haryati., A Jamaludin. 2009. Pengaruh Uranium Terhadap Analisis Thorium Menggunakan Spektrofotometer UV – Vis. Pusat Teknologi Bahan Bakar Nuklir – Batan.Seminar Nasional V.

Firnanda, R.; Sugito; Fakhrurrazi dan D. V. S. Ambarwati. 2013. Isolasi *Aeromonas hydrophila* pada sisik ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberi tepung daun jaloh (Salix tetrasperma Robx). Jurnal Medika Veterinaria 7(1): 22-24.

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.* 

Gholib, D. 2009. Uji Daya Hambat Daun Senggani (*Melastomamala bathricum L.*)Terhadap *Trychophytonmentagrophytes* Dan *Candida albicans*. *Berita BiologiVol* 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 (*Phyllanthusniruri Linn*). *Jurnal Kimia 2 (1) : 31-39*.

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 Sarcophytonsp. yang Difragmentasi dan Tidak Difragmentasi di Perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 67 hlm.

Haryani, A.; Roffi G.; Ibnu D. B. danAyi S. 2012. Uji efektivitas daun papaya (Carica papaya) untuk pengobatan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas koki (Carassius auratus). Jurnal Perikanan dan Kelautan 3(3): 213-220

Herupradoto, B. A. danGandul A. Y. 2010.Karakterisasi protein spesifik *Aeromonas hydrophila* penyebab penyakit Ulser pada ikan mas. Jurnal Veteriner 11(3): 158-162

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

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

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.

Kristanti, A. N., N. S. Aminah, M. Tanjung, dan B. Kurniadi. 2008. BukuAjarFitokimia. PenerbitAirlangga University Press. Surabaya. Hlm 23, 47.

Kusmiyatidan N.W.S Agustini, 2006.Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri Dari Mikro alga *Porphyridiumcruentum.Jurnal Biodiversitas* 8 (1): 48-53.

Kusumaningtyas, E., S. Lusi, dan A. Estie. 2008. Penentuan Golongan Bercak Senyawa Aktif Ekstrak N-Heksan Apinia 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. Sci10 : 3400-3419.* 

Lay, B.W dan S Hastowo. 1992. Mikrobiologi. Rajawali Press. Jakarta.

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

Kazakevich, Y., dan R. LoBrutto. (2007). *Method Validation*. In: LoBrutto, R., dan T. Patel., Editors. HPLC for Pharmaceutical Scentists. New Jersey: Jhon Wiley & Sons, Inc. Hal. 455.

Lukistyowati, I dan Kurniasih. 2011. Kelangsungan Hidup Ikan Mas (*Cyprinus carpio L*) yang diberi Pakan Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*) dan di Infeksi *Aeromonas hydrophila*. Jurnal Perikanan dan Kelautan, 16,1 (2011): 144-160.

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

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

Nimah, S., W.F. Ma'ruf and A. Trianto.2012. UjiAktivitas 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 (*Musmusculus*). 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.

Poelongan,M dan praptiwi . 2010. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Manggis (Garcini amangostana* Linn). Artikel Litbang Keshatan. Vol 20. No. 2.

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*.

Rahmaningsih, S. 2012. Penagruh Ekstrak Sidawayah dengan Konsentrasi yang Berbeda untuk Mengatasi Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophyla* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumber daya Perairan.

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.* 

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* Secaraln Vitro. *J. Exp. Life Sci. 2 (1) : 1-5.* 

Singkoh, 2011. Aktivitas Antibakteri Alga Laut Caulerpa racemosaDari 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. PenerbitLiberty. Yogyakarta.

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.

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

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.

Tjay, T.H dan K Rahardja. 2002. Obat – Obatan Penting Khasiat, Penggunaan dan Efek – Efek Samping. PT. Gramedia, Jakarta.

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, danChristoph Seger. 2008. A Decade OfHplc-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.

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

Zipcodezoo.2012. Klasifikasi *Paracaudina australis* .<u>www.zipcodezoo.com</u>. Diakses pada tanggal 21 Spetember 2015



### **LAMPIRAN**

## Lampiran 1 Perhitungan Rendemen Ekstrak Metanol Paracaudina australis

Berat sampel segar = 500 gram

Berat sampel setelah disiangi = 400 gram

Berat akhir = 16, 47 gram

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

% Rendemen =  $\frac{16,47 \text{ gram}}{400 \text{ gram}} \times 100 \%$ 

% Rendemen =4,118 %

### Lampiran 2Perhitungan Pengujian Antibakteri Ekstrak Paracaudina australis

Media Tsa 
$$= \frac{40}{1000} \times \sum \text{cawan petri x 20 ml}$$
  
 $= \frac{40}{1000} \times 4 \times 20 \text{ ml}$   
 $= 3,2 \text{ gr}$   
NaFis 0,9%  $= \frac{0,9}{100} \times 1 \times 10 \text{ ml}$   
 $= 0,09 \text{ ml}$ 

### Lampiran 3 Prosedur Pembuatan DMSO 10 % dan Konsentrasi

### - Pembuatan DMSO 10 %

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

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

(x)ml = 10 ml

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

### - Pembuatan Konsentrasi

### Pembuatan konsentrasi 2000ppm

$$2000ppm = \frac{2000mg}{1000ml} = \frac{20mg}{100ml}$$

Jadi sebanyak20 mg sampel dilarutkan kedalam 10 ml DMSO 10%

## Pembuatan konsentrasi 1500ppm

$$1500ppm = \frac{1500mg}{1000ml} = \frac{5mg}{10ml}$$

Jadi sebanyak15 mg sampel dilarutkan kedalam 10 ml DMSO 10%

## Pembuatankonsentrasi 1000ppm

$$1000ppm = \frac{1000mg}{1000ml} = \frac{10mg}{100ml}$$

Jadi sebanyak 10 mg sampel dilarutkan kedalam10 ml DMSO 10 %

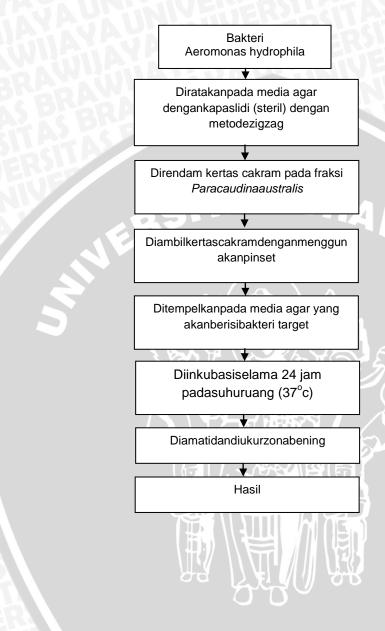
### Pembuatan konsentrasi 500ppm

 $500ppm = \frac{500mg}{1000ml} = \frac{5mg}{100ml}$ 

Jadi sebanyak 5 mg sampel dilarutkan kedalam 10 ml DMSO 10%



### Lampiran 4 Isolasi Bakteri Aeromonas hydropila



## Lampiran 5 Analisis Keragaman (ANOVA)

**Data Hasil Pengamatan Diameter Daya Hambat** 

Perlakuan	U1	U2	U3	U4	Total	Rerata	Std.Dev
500 ppm	2.30	2.30	2.60	2.80	100	2.50	0.244948
1000 ppm	3.00	2.50	3.20	2.90	11.60	2.90	0.294329
1500 ppm	3.20	3.10	2.90	3.30	12.50	3.13	0.170782
2000 ppm	3.40	3.30	3.40	3.50	13.60	3.40	0.081649
Total	11.90	11.20	12.10	12.50	47.70	11.93	

(ANOVA)

Sumber Keragamar	Db C	JK	KT	F hit	F 5 %	F1%
Perlakuan	3	1,74	0,58	12,90	3,49	5,95
Galat	12	0.54	0,045			
Total	15					<b>Y</b>

Dari analisis ragam diketahui bahwa F hit (12,90) > F 5% (3,49) Dengan demikian terdapat hubungan yang sangat berbeda nyata

### Perhitungan dan Notasi BNT 5 %

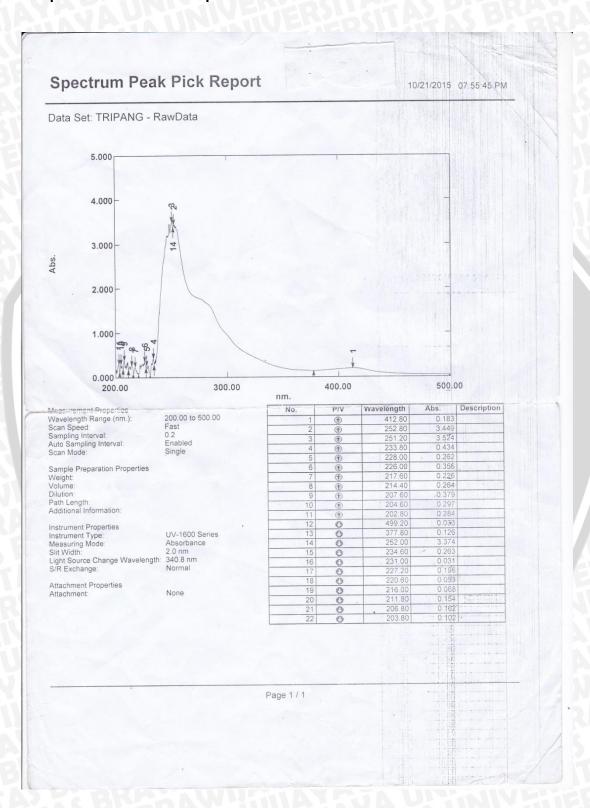
$$BNT5\% = t_{\left(\frac{\alpha}{2},db\right)} \times \sqrt{\frac{2KTGalat}{r}}$$
$$= 2,17 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,045}{4}} = 0,049$$

Rata-Rata	2.50	2.90	3.13	3.40	Notasi
2.50	0			HU	a
2.90	0,04	0.10	<b>NATU</b>		ab
3.13	0,625	0,225	0		b
3.40	0,9	0,5	0,275	// 0 \	bc

Interpretasi:

Dari uji BNT 5% diketahui bahwa perlakuan dengan konsentrasi 2000 ppm berbeda nyata sehingga dapat disimpulkan konsentrasi 2000 ppm adalah konsentrasi terbaik dalam menghambat pertumbuhan *Aeromonas hidrophyla* 

### Lampiran 6 hasil Analisa Spectrofotometri UV-Vis



### Lampiran 7 Hasil Analisa LC-MS

Teripang LC MS –ESI pos ion

Vol injection 2 ul

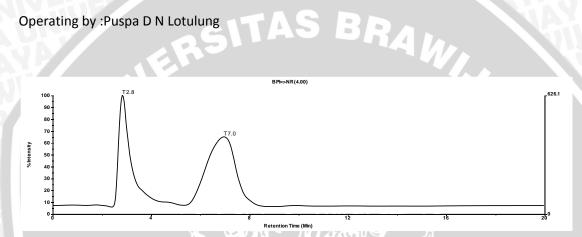
Flow 0.1 ml/min

Collumn C-18 (15mm x 1 mm)

Eluent MeOH

Operating by :Puspa D N Lotulung

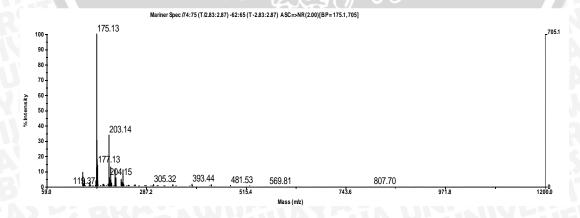


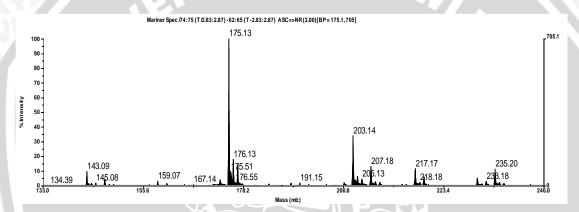


Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	2.833067	2.443683	5.283934	626	9433.65
2	6.956500	5.401100	8.743400	406	13021.37

### Lampiran 8 Hasil Analisa LC-MS

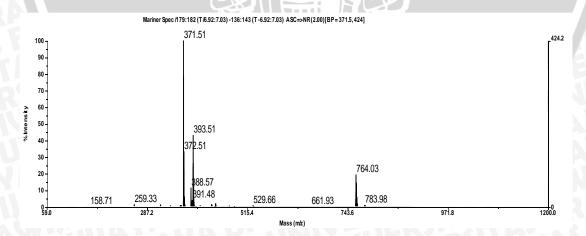
Rt 2.83



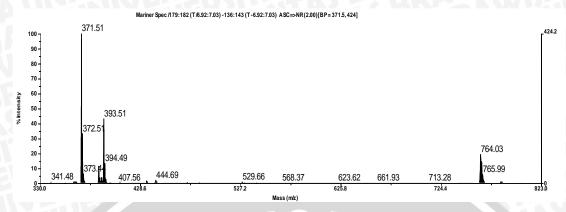


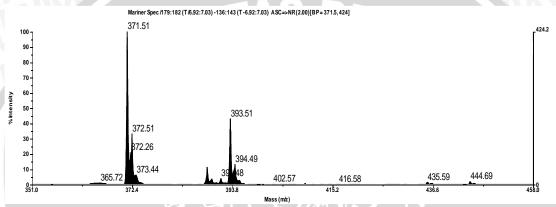
## Lampiran 9 Hasil Analisa LC-MS

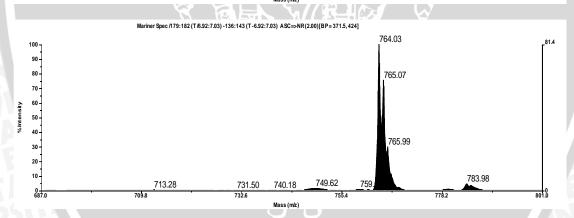
Rt 6.95



BRAWIJAY







## Lampiran 10 Dokumentasi Penelitian



1. Sampel Paracaudina australis



Dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 24 jam



Maserasi dengan metanol (1:3)
 Selama 3x24 jam



4. Penyaringan hasil maserasi



5. Proses evaporator



6. Pelarut diuapakan lagi dengan waterbath pada suhu 60°C



7. Ekstrak kasar *Paracaudina* australis



8. Uji Fitokimia



9. Fraksi hasil kromatografi kolom



10. Uji Cakram



11. Hasil Uji Cakram



12. Diinkubasi selama 24 jam



13. Analisa spektrofotometri Uv-Vis SHIMADZU



14. Analisa LC-MS HITACHI L 6200

