

Bab VI Hasil dan Pembahasan

VI.1 Penyiapan bahan

Penyiapan bahan yang dilakukan meliputi pengumpulan bahan dan determinasi. Adapun pengolahan bahan meliputi pengeringan, selanjutnya dilakukan penyerbukan. Determinasi daun gaharu dilakukan di Balitro LIPI, Bogor, Jawa Barat, sebagai bukti kebenaran tanamannya. Dari hasil data determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang diuji merupakan jenis *Aquilaria malacensis* Lam. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

VI.2 Karakterisasi simplisia

Karakterisasi simplisia merupakan parameter standar yang dilakukan untuk memastikan kualitas dan mutu simplisia. Karakterisasi simplisia yang dilakukan meliputi penentuan kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut etanol, kadar sari larut air, kadar air dan susut pengeringan.

Tabel VI.1 Hasil Karakterisasi Simplisia dan Parameter Mutu Ekstrak

Jenis Pemeriksaan	Hasil (%) b/b
Kadar abu total	3,92
Kadar abu tidak larut asam	1,17
Kadar sari larut etanol	9,27
Kadar sari larut air	8,95
Susut pengeringan	9,85
Bobot jenis	0,885 b/v

Berdasarkan hasil karakterisasi simplisia yang telah dilakukan terhadap daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam) diperoleh hasil kadar abu total sebesar 3,92 %, hasil tersebut menunjukkan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Penetapan kadar abu tidak larut asam, dilakukan untuk mengetahui jumlah abu yang diperoleh dari faktor eksternal, bersumber dari pengotor yang berasal dari pasir atau tanah silikat (Depkes RI, 2000). Dari pengujian yang telah dilakukan maka diperoleh kadar abu tidak larut asam sebesar 1,17% b/b.

Penetapan kadar sari larut air dilakukan untuk mengetahui banyaknya senyawa-senyawa di dalam simplisia yang terlarut di dalam air. Berdasarkan pada pengujian yang telah dilakukan didapat kadar sari larut air sebesar 8,62%. Penetapan kadar sari larut etanol, dilakukan untuk mengetahui banyaknya senyawa yang larut di dalam etanol, dimana hasil pengujian menyatakan dalam simplisia daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam) terkandung kadar sari larut etanol sebesar 8,54 %.

Penetapan susut pengeringan simplisia bertujuan untuk memberikan batasan maksimal tentang besarnya air dan senyawa yang hilang pada proses pengeringan. (Depkes RI, 2000). Dimana hasil pengujian menyatakan nilai susut pengeringan daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam) diperoleh 9,85% b/b.

Pada parameter mutu ekstrak dilakukan pemeriksaan bobot jenis adapun tujuan dilakukan pemeriksaan bobot jenis ekstrak adalah memberikan gambaran kandungan kimia yang terlarut pada ekstrak (Depkes RI, 2000). Dimana pada penelitian ini di dapat bobot jenis

ekstrak sebesar 0,885 b/v. Data lengkap perhitungan hasil karakterisasi simplisia dapat dilihat pada Lampiran 6.

VI.3 Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia merupakan tahap awal dalam mengidentifikasi golongan senyawa metaboit sekunder yang terkandung pada tanaman. Dari hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa simplisia daun *Aquilaria malaccensis* Lam yang ditunjukkan pada tabel VI.2 mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, kuinon, tanin, saponin, steroid/triterpenoid.

Tabel VI.2 Hasil Penapisan Fitokimia Simplisia dan Ekstrak

Uji Skrinning Fitokimia	Pengujian	Hasil	Ket
Alkaloid	Kertas saring	Endapan jingga	+
	Mayer	Endapan putih	+
Flavonoid	Dragendorf	Endapan merah bata	+
	+Amil Alkohol	Warna kuning jingga pada lapisan amil alkohol	+
Tannin	FeCl ₃	Warna hijau kehitaman	+
	Gelatin	Endapan putih	+
	Steasny	Warna merah muda setelah dipanaskan	+
Kuinon	NaOH	Warna merah	+
Saponin	HCl 2 N	Busa stabil	+
Steroid/ Triterpenoid	Lieberman-Buchard	Warna hijau kebiruan	+

Keterangan : (+) : mengandung golongan senyawa uji

Berdasarkan hasil penapisan fitokimia yang telah dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak, hasil pengujian alkaloid positif terbukti

terbentuknya endapan pada pengujian menggunakan pereaksi Mayer dan Dragendorff. Hasil positif yang diperoleh pada uji alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih setelah diberikan pereaksi mayer dan warna jingga setelah diberi pereaksi dragendorff. Hasil pengujian flavonoid diperoleh setelah ditambahkan amil alkohol, terbukti mengandung flavonoid ditunjukkan pada bagian amil alkohol terjadi perubahan warna menjadi jingga. Hasil pada pengujian saponin diperoleh hasil positif saponin ditandai dengan terbentuknya busa. Terbentuknya busa menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Untuk membuktikan busa yang terbentuk merupakan hasil dari adanya glukosa dapat ditambahkan HCl encer, jika saponin maka busa akan tetap stabil, pada pengujian ini setelah ditambahkan HCl encer, busa tetap stabil. Pada hasil pengujian kuinon positif terkandung senyawa karena terjadi perubahan warna menjadi merah. Dan hasil pengujian tanin positif terkandung senyawa karena terbentuk endapan putih setelah penambahan gelatin kemudian adanya perubahan warna menjadi hijau kehitaman setelah penambahan pereaksi FeCl_3 . Selanjutnya hasil positif terhadap pengujian steroid ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi hijau kebiruan setelah diberi pereaksi liebermen bouchard. Perubahan warna tersebut dikarenakan terjadinya oksidasi pada golongan senyawa terpenoid/steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi. Data lengkap hasil penapisan fitokimia simplisia dan ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 2.

VI.4 Ekstraksi dan Fraksinasi

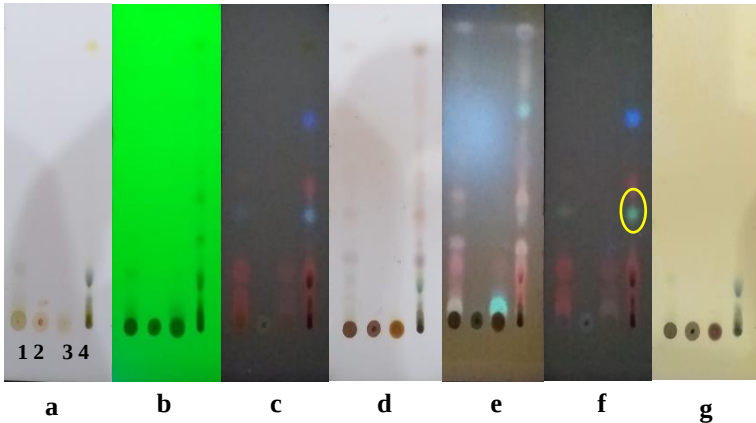
Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan pengulangan 3 kali masing masing 24 jam menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen ekstrak yang didapat dari daun *Aquilaria malaccensis* Lam sebesar 8,54% dari ekstrak kental sebanyak 256,3 gr dan simplisia seberat 3 Kg. Data lengkap perhitungan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 4.

Ekstrak kental dilarutkan dalam methanol 20% dan difraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan pelarut berturut-turut *n*-heksana kemudian etil asetat masing-masing 3 kali. Rendemen fraksi yang diperoleh dari pelarut *n*-heksana sebesar 20,26 %, rendemen fraksi etil asetat sebesar 12,46 % dan fraksi methanol : air sebesar 60,265 % yang didapat dari ekstrak kental seberat 200 gr. Data lengkap perhitungan rendemen fraksi dapat dilihat pada Lampran 5.

VI.5 Pemantauan

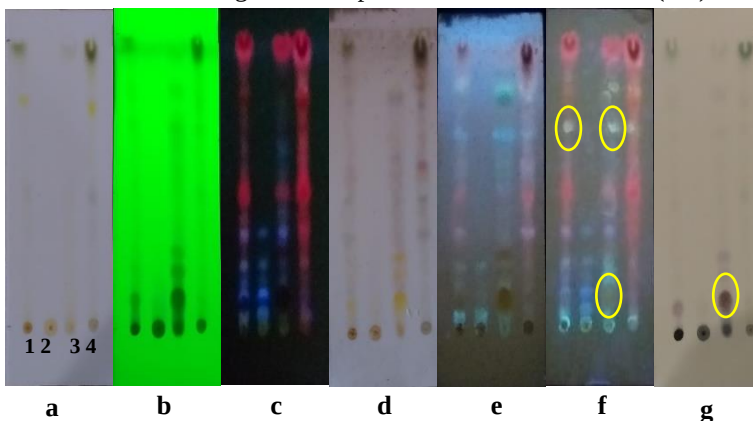
Pada proses pemantauan ekstrak dan fraksi dilakukan analisa secara kualitatif menggunakan metode kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang bertujuan untuk memastikan adanya senyawa yang diinginkan dengan menggunakan fase diam silica gel dan fase gerak polar yaitu Etil asetat : metanol : air (8:1:1), Fase gerak semi polar kloroform : metanol (9:1), Fase gerak non polar N-heksan : Etil asetat (9:1). Hasil pemantauan dapat dilihat pada gambar VI.2

Gambar VI.4 Fase gerak non polar N-heksan : Etil asetat (9:1)



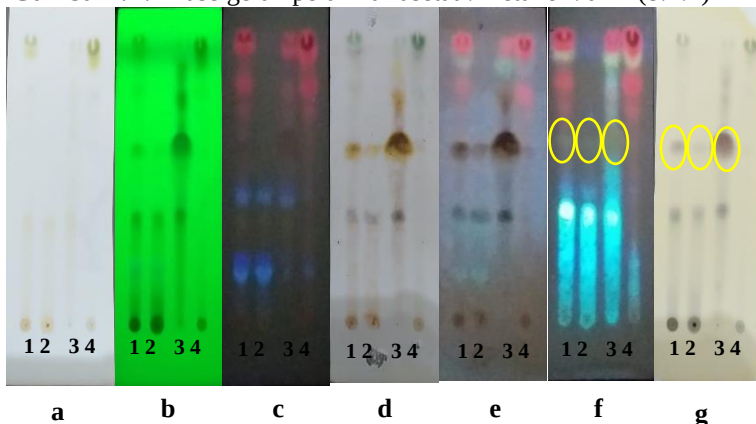
Keterangan : Kromatogram lapis tipis ekstrak dan fraksi, (1) Ekstrak, (2) Fraksi metanol:air, Fraksi etil asetat, Fraksi N-heksan. Fase diam silika gel F₂₅₄, dengan fase gerak non polar N-heksan : Etil asetat (9:1). (a) visual, (b) sinar UV λ 254 nm, (c) sinar UV λ 365 nm, (d) penampak bercak H₂SO₄ visual, (e) penampak bercak H₂SO₄ sinar UV λ 365 nm, (f) penampak bercak AlCl₃ sinar UV λ 365 nm, (g) penampak bercak FeCl₃ visual

Hasil pemantauan KLT ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi metnol:air daun gaharu (*Aquilaria malacensis*) dengan fase gerak non polar N-heksan : Etil asetat (9:1) yang disemprotkan menggunakan penampak bercak spesifik AlCl₃ menunjukkan adanya senyawa aktif flavanoid pada ekstrak dan fraksi N-heksan dibawah sinar UV λ 365 nm yang berupa bercak berwarna kuning. Namun pada penampak bercak FeCl₃ tidak menunjukkan bercak hitam yang diamati pada sinar tampak. Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa senyawa flavonoid yang terkandung bukan merupakan flavonoid golongan fenolat.

Gambar VI.3 Fase gerak semi polar kloroform : metanol (9:1)

Keterangan : Kromatogram lapis tipis ekstrak dan fraksi, (1) Ekstrak, (2) Fraksi metanol:air, Fraksi etil asetat, Fraksi *N*-heksan. Fase diam silika gel F₂₅₄, dengan fase gerak semi polar kloroform : metanol (9:1). (a) visual, (b) sinar UV λ 254 nm, (c) sinar UV λ 365 nm, (d) penampak bercak H₂SO₄ visual, (e) penampak bercak H₂SO₄ sinar UV λ 365 nm, (f) penampak bercak AlCl₃ sinar UV λ 365 nm, (g) penampak bercak FeCl₃ visual.

Hasil pemantauan KLT ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi metanol:air daun gaharu (*Aquilaria malaccensis*) dengan fase gerak semi polar kloroform : metanol (9:1) yang disempatkan menggunakan penampak bercak spesifik AlCl₃ menunjukkan adanya senyawa aktif flavanoid pada ekstrak dan fraksi etil asetat dibawah sinar UV λ 365 nm yang berupa bercak berwarna kuning. Pada penampak bercak FeCl₃ menunjukkan bercak berwarna hitam yang diamati pada sinar tampak diartikan adanya senyawa aktif fenol.

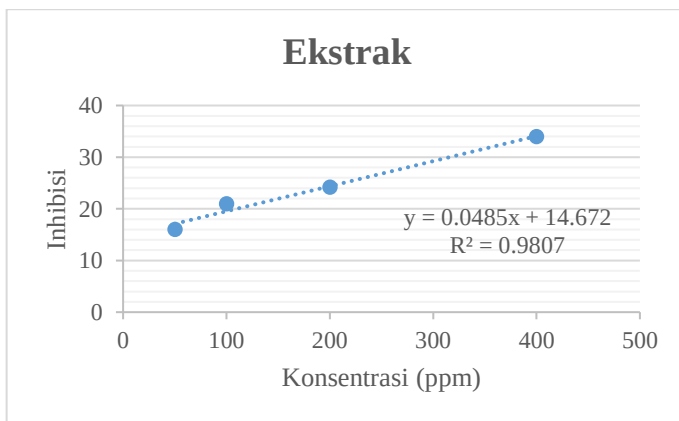
Gambar VI.1 Fase gerak polar Etil asetat : metanol : air (8:1:1)

Keterangan : Kromatogram lapis tipis ekstrak dan fraksi, (1) Ekstrak, (2) Fraksi metanol:air, Fraksi etil asetat, Fraksi N-heksan. Fase diam silika gel F₂₅₄, dengan fase gerak polar Etil asetat : metanol : air (8:1:1). (a) visual, (b) sinar UV λ 254 nm, (c) sinar UV λ 365 nm, (d) penampak bercak H₂SO₄ visual, (e) penampak bercak H₂SO₄ sinar UV λ 365 nm, (f) penampak bercak AlCl₃ sinar UV λ 365 nm, (g) penampak bercak FeCl₃ visual

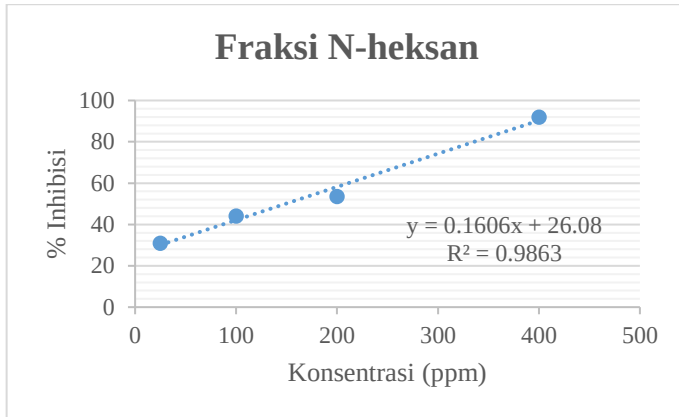
Hasil pemantauan KLT ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi metanol:air daun gaharu (*Aquilaria malacensis*) dengan fase gerak polar Etil asetat : metanol : air (8:1:1) yang disempatkan menggunakan penampak bercak spesifik AlCl₃ menunjukkan adanya senyawa aktif flavanoid pada ekstrak dan fraksi methanol air, fraksi etil asetat dibawah sinar UV λ 365 nm yang berupa bercak berwarna kuning. Pada penampak bercak FeCl₃ menunjukkan bercak berwarna hijau yang diamati pada sinar tampak diartikan adanya senyawa aktif fenol.

VI.6 Uji Aktivitas Sitotoksik Metode MTT Assay

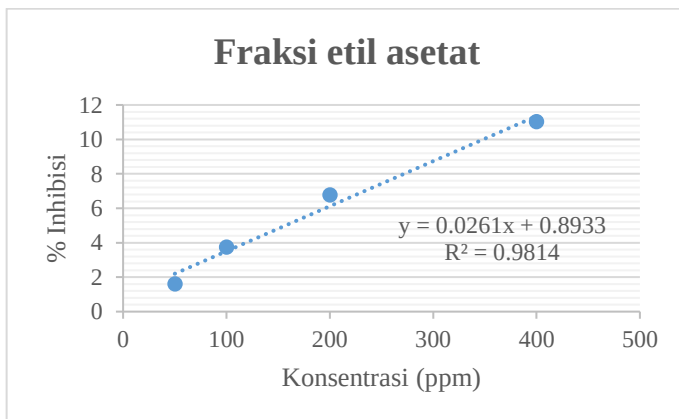
Uji aktivitas sitotoksik pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui toksisitas bahan uji daun (*Aquilaria malacensis* Lam) pada sel. Adapun sel uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel MCF-7 dengan Metode yang digunakan adalah metode MTT assay. Adapun prinsip metode MTT adalah reaksi redoks yang terjadi di dalam sel. Garam tetrazolium berwarna kuning akan direduksi di dalam sel dengan bantuan enzim suksinat dehidrogenase yang kemudian menghasilkan kristal formazan (berwarna ungu), nantinya kristal formazan dibaca absorbannnya dengan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm. Jumlah formazan yang terbentuk proporsional dengan aktifitas enzimatik. Jika intensitas warna ungu semakin pekat, maka jumlah sel hidup semakin banyak (viabilitas sel tinggi).



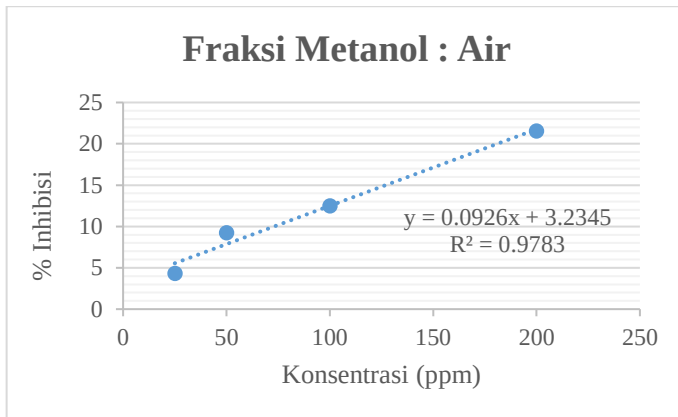
Gambar VI.2 Hasil data Ekstrak yang telah diplotkan pada grafik



Gambar VI.8 Hasil data fraksi N-Heksan yang telah diplotkan pada grafik



Gambar VI.7 Hasil data fraksi Etil asetat yang telah diplotkan pada grafik



Gambar VI.3 Hasil data fraksi Metanol : Air yang telah diplotkan pada grafik

Nilai y yang diperoleh pada pengujian aktivitas sitotoksik pada sampel ekstrak, fraksi methanol:air, fraksi etil asetat, dan fraksi n -heksan daun gaharu (*Aquilaria malacensis*) kemudian dihitung nilai IC_{50} masing masing sampel dengan mengganti nilai y dengan nilai 50.

Tabel VI.3 Nilai IC_{50}

Sampel	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ekstrak	728,412
Fraksi methanol-air	505,026
Fraksi etil asetat	1881,482
Fraksi N-heksan	144,458

Keterangan :

IC_{50} = Konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk dapat menghambat 50% sel kanker.

Berdasarkan hasil pengolahan data IC_{50} ekstrak etanol daun gaharu (*Aquilaria malacensis* Lam) didapat nilai IC_{50} sebesar 728,412 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} fraksi methanol : air sebesar 505,026 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} fraksi etil asetat 1881,482 $\mu\text{g/mL}$ dan IC_{50} fraksi n-heksan sebesar 144,458 $\mu\text{g/mL}$.

Tabel VI.4 Kategori sitotoksisitas menurut *United State National Cancer Institute* (NCI,2001)

No	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Keterangan
1.	≤ 20	Sangat toksik
2.	$21 < IC_{50} < 200$	Moderat/cukup aktif
3.	$201 < IC_{50} < 500$	Lemah
4.	>500	Tidak toksik

Berdasarkan data IC_{50} yang diperoleh aktivitas sitotoksik paling baik ditunjukan pada sampel Fraksi N-heksan daun gaharu dimana Nilai IC_{50} fraksi N-heksan lebih rendah dari fraksi etil asetat, fraksi methanol : air dan ekstrak, dimana semakin rendah nilai IC_{50} , maka semakin baik aktivitas sitotoksik dari sampel hasil pengujiannya. fraksi N-heksan memiliki aktivitas sitotoksik kategori moderat atau cukup aktif. Data lengkap perhitungan pengujian aktivitas sitotoksik dapat dilihat pada Lampiran 8.