

Bab VI Hasil dan Pembahasan

VI.1. Penyiapan Simplisia

Penyiapan simplisia meliputi pengumpulan bahan, determinasi dan pembuatan simplisia yang dilakukan mulai dari sortasi basah hingga penyimpanan simplisia. Bahan berupa daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam) yang diperoleh dari PT. Mitra Dulur Sejahtera Pabrik Obat Tradisional Palembang. Daun gaharu yang telah diperoleh kemudian di determinasi di Pusat Penelitian Biologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor. Determinasi tanaman bertujuan untuk mengetahui informasi bahwa tanaman uji yang digunakan merupakan tanaman gaharu dengan nama latin *Aquilaria malaccensis* Lam.

Daun gaharu yang didapat kemudian dibersihkan dari pengotor-pengotor yang menempel dan dilanjutkan dengan pencucian pada air mengalir agar semua kotoran pada daun gaharu dapat hilang lalu ditiriskan. Selanjutnya daun gaharu dikeringkan menggunakan oven pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ agar didapatkan simplisia yang tidak mudah rusak dan dapat disimpan dengan waktu yang lebih lama. Lalu simplisia yang telah kering dihaluskan dan serbuk simplisia disimpan diwadahnya yang tertutup rapat.

VI.2. Karakterisasi Simplisia

Tujuan karakterisasi simplisia adalah untuk memastikan kualitas dan mutu dari simplisia yang digunakan. Karakterisasi simplisia meliputi susut pengeringan, kadar air, penetapan kadar abu total, penetapan

kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol. Hasil karakterisasi simplisia dapat dilihat pada tabel.

Tabel VI.1 Hasil Pemeriksaan Karakterisasi Simplisia

Uji Karakterisasi	Hasil (% b/b)
Kadar Abu Total	3,92
Kadar Abu Tidak Larut Asam	1,17
Kadar Sari Larut Air	8,95
Kadar Sari Larut Etanol	9,27
Susut Pengeringan	9.85

Penetapan kadar abu total bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal dari simplisia. Selain kadar abu total, dilakukan juga penetapan kadar abu tidak larut asam yang bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral eksternal dalam bahan. Kadar abu tidak larut asam yang kecil menandakan sedikitnya pengotor seperti pasir ataupun silikat dalam simplisia. Dari penelitian yang dilakukan oleh Purnamasari (2015) didapat kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam secara berturut-turut adalah sebesar 7,78% dan 0,62%. Dari hasil menunjukkan bahwa simplisia yang digunakan pada penelitian ini mengandung kandungan mineral internal dan eksternal yang lebih sedikit.

Penetapan kadar sari larut air dan larut etanol dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui gambaran awal jumlah kandungan suatu senyawa yang larut dalam pelarut organik dan pelarut non organik dimana pada dasarnya bahan dilarutkan didalam pelarut air untuk kadar sari larut

air dan pelarut etanol untuk kadar sari larut etanol. Dari hasil penetapan kadar sari menunjukkan bahwa simplisia daun gaharu lebih mudah larut dalam etanol.

Penetapan susut pengeringan dilakukan untuk memberikan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang atau menguap pada suhu penetapan 105⁰C. Hasil penetapan susut pengeringan simplisia daun gaharu didapatkan nilai sebesar 9,85 % b/b yang menunjukkan bahwa sebanyak 9,85% b/b senyawa dalam bahan hilang pada suhu pengeringan (Departemen kesehatan RI, 2000). Pada hasil susut pengeringan diperoleh hasil yang lebih besar dibandingkan dengan kadar air karena yang menguap pada suhu 105⁰C bukan hanya air saja tetapi adanya senyawa-senyawa volatile dan senyawa yang tidak tahan pada suhu tersebut akan ikut menguap.

VI.3. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia atau penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada simplisia. Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi pengujian alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, dan steroid/triterpenoid. Hasil skrining fitokimia menunjukkan hasil positif pada semua golongan senyawa yang diuji sehingga daun gaharu mengandung senyawa metabolit sekunder yang terdiri dari alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin dan steroid/triterpenoid.

VI.4. Pembuatan Ekstrak

Proses ekstraksi daun gaharu dilakukan dengan metode maserasi. Daun gaharu yang telah diserbukan sebanyak 3000 g diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% selama 3 x 24 jam. Hasil maserasi disaring, sehingga diperoleh ekstrak cair daun gaharu. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan tekanan 175mbar sampai diperoleh ekstrak kental. Pemekatan berarti peningkatan jumlah senyawa terlarut dengan cara penguapan pelarut hingga ekstrak menjadi kental (Departemen kesehatan RI., 2000). Dari proses penguapan pelarut diperoleh ekstrak daun gaharu sebanyak 256,3 g. Salah satu parameter mutu ekstrak adalah rendemen ekstrak yang dihasilkan. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal. Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak (Wijaya dkk., 2018). Rendemen ekstrak daun gaharu diperoleh sebesar 8,54%.

VI.5. Pembuatan Fraksi

Sebanyak 200 g ekstrak kental daun gaharu yang telah diperoleh kemudian dilakukan fraksinasi. Pada prinsipnya fraksinasi merupakan proses penarikan senyawa menggunakan dua pelarut yang berbeda sifat kepolarannya. Fraksinasi dilakukan menggunakan metode Ekstraksi Cair-Cair dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol-air. Ekstrak etanol yang telah diperoleh dilarutkan dalam campuran metanol-air kemudian dilakukan fraksinasi dengan menggunakan n-heksana yang bersifat non polar. Residu metanol-air yang diperoleh selanjutnya difraksinasi dengan etil asetat untuk menarik senyawa

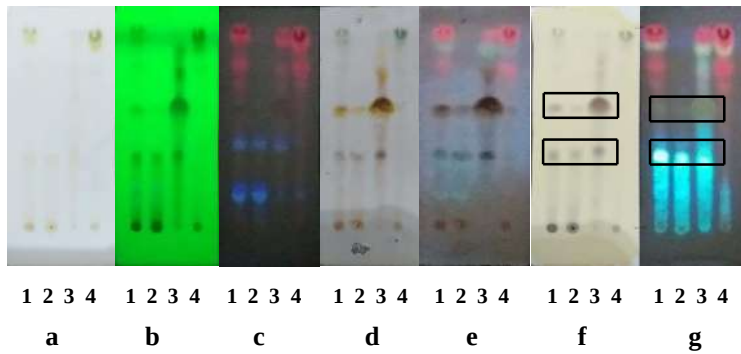
semi polar. Pada tabel VI.4 didapatkan hasil rendemen fraksi daun gaharu sebagai berikut.

Tabel VI.2 Hasil Rendemen Fraksi daun gaharu

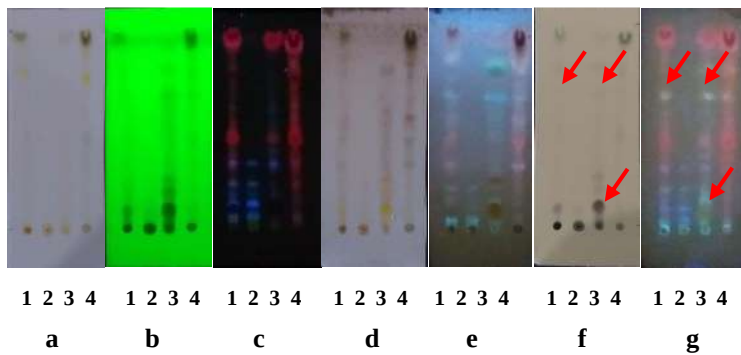
Fraksi	Bobot (g)	Rendemen (%)
n-heksan	40,52	20,26
Etil asetat	24,92	12,46
Metanol-air	120,53	60,27

VI.6. Pemantauan Ekstrak dan Fraksi

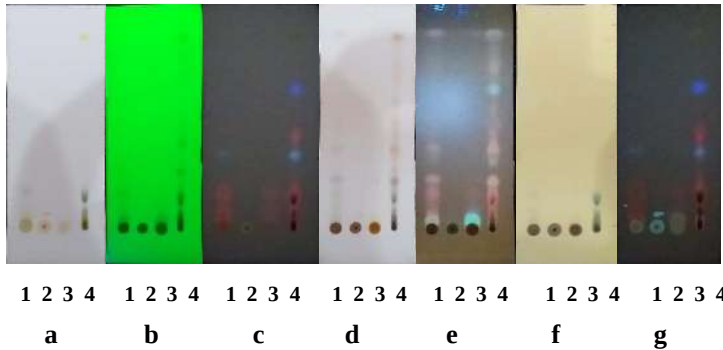
Pemantauan ekstrak dan fraksi dilakukan untuk melihat senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi secara kualitatif dengan menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan pengembang yang sesuai. Fase diam yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄, dan fase geraknya menggunakan tiga eluen dengan tingkat kepolaran yang berbeda untuk melihat spot yang terbentuk pada masing-masing tingkat kepolaran. Fase gerak polar menggunakan etil asetat-metanol-air (8:1:1) pada gambar VI.1 , fase gerak semipolar menggunakan kloroform-metanol (9:1) pada gambar VI.2, dan fase gerak non polar menggunakan perbandingan pelarut n-heksan-etil asetat (9:1) pada gambar VI.3. Pengamatan dilakukan secara visual (a), di bawah lampu UV 254 nm (b), UV 365 nm (c), penampak bercak yang digunakan adalah H₂SO₄ 10 % yang diamati secara visual (d) dan dibawah sinar UV 365 nm (e), FeCl₃ 10 % (f) dan AlCl₃ 5 % (g).



Gambar VI.1 : Fase diam silika gel F_{254} , fase gerak polar (etil aasetat:metanol:air) 8:1:1



Gambar VI.2 : Fase diam silika gel F_{254} , fase gerak semi polar (kloroform:metanol) 9:1



Gambar VI.3 : Fase diam silika gel F_{254} , fase gerak non polar (n-heksan : etil asetat) 9:1

Keterangan : Kromatogram (1) ekstrak etanol daun gaharu, (2) fraksi methanol-air, (3) fraksi etil asetat, dan (4) fraksi n-heksan, visual (a), sinar UV λ 254 nm (b), sinar UV λ 366 nm (c), visual H_2SO_4 10 % (d), sinar UV λ 366 nm H_2SO_4 10 % (e), $FeCl_3$ 10% (f), sinar UV λ 366 nm $AlCl_3$ 5 % (g).

Pemantauan ekstrak menggunakan kromatografi lapis tipis menunjukkan dengan penampak bercak H_2SO_4 10% akan menghasilkan bercak hitam setelah dipanaskan agar bercak yang timbul semakin tampak. Fluoresensi kuning yang timbul setelah disemprot dengan pereaksi $AlCl_3$ menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada ekstrak dan fraksi daun gaharu (Markham, 1988). Terdapat pula bercak yang berfluoresensi berwarna hijau, biru dibawah sinar lampu UV 365 nm setelah disemprotkan penampak bercak $AlCl_3$ (Wagner dkk., 1996). Lalu dengan penampak bercak

FeCl₃ 10% timbul bercak berwarna hitam dengan latar berwarna kuning yang menandakan bahwa ekstrak dan fraksi memiliki senyawa golongan fenol.

VI.7. Pengujian Aktivitas Penghambatan Alfa Glukosidase

Inhibisi terhadap enzim α -glukosidase menyebabkan penghambatan absorpsi glukosa pada penderita DM. Uji penghambatan enzim α -glukosidase dilakukan dengan merujuk pada penelitian (Elya dkk., 2012). Pengujian aktivitas penghambatan alfa glukosidase bertujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan alfa glukosidase oleh ekstrak dan fraksi daun gaharu menggunakan akarbose sebagai standar. Sebelum dilakukan pengujian terlebih dahulu dilakukan optimasi enzim α -Glukosidase untuk mendapatkan konsentrasi yang optimal. Dari hasil variasi konsentrasi enzim 0,4 U/ml enzim α -Glukosidase yang paling optimum dan konsentrasi substrat yang digunakan adalah 15mM.

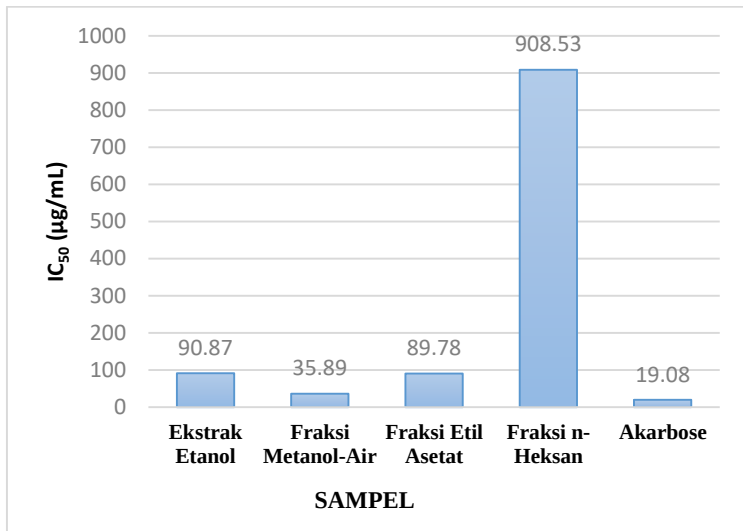
Tabel VI.3 Hasil Optimasi Konsentrasi Enzim

Konsentrasi (U/ml)	Absorbansi	Absorbansi Uji – Absorbansi Blanko
0,2	0,271	0,206
0,3	0,646	0,581
0,4	0,862	0,797
0,5	1,673	1,608
0,6	1,968	1,903
0,7	2,212	2,147
0,8	3,755	3,69
Blanko	0,065	

Hasil optimasi diperoleh konsentrasi optimum dari enzim adalah 0,4U/ml, dan konsentrasi substrat pada 15mM yang menghasilkan absorbansi 0,797 dan akan digunakan untuk pengujian aktivitas penghambatan alfa glukosidase oleh sampel.

Pengujian aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase oleh ekstrak dan berbagai fraksi daun gaharu diamati dengan metode spektrofotometri secara *in vitro* dan pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 405 nm. Prinsip pengujiannya adalah sampel akan menghambat hidrolisis substrat *p*NPG oleh enzim alfa glukosidase. Hidrolisis substrat oleh enzim menghasilkan *p*-Nitrofenol yang berwarna kuning, apabila kemampuan inhibitor dari larutan uji untuk menghambat reaksi semakin besar maka warna kuning yang dihasilkan semakin berkurang (Sugiwati, dkk., 2009).

Uji aktivitas dilakukan pada beberapa konsentrasi sampel dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan konsentrasi sampel terhadap aktivitas penghambatan. Pembuatan seri konsentrasi sampel yaitu dari pengenceran larutan induk sampel 1000 µg/ml. Untuk pengujian ekstrak etanol daun gaharu digunakan konsentrasi yaitu 70-120 µg/mL, 30-50 µg/mL untuk fraksi methanol-air, 50-110 µg/mL untuk fraksi etil asetat, 400-800 µg/mL untuk fraksi n-heksan dan 10-20 µg/mL untuk akarbose sebagai pembanding. Pembuatan seri konsentrasi dibuat meningkat untuk menghasilkan serapan yang linear. Hasil pengujian menghasilkan nilai IC_{50} yang digunakan sebagai parameter untuk pengukuran aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase. Nilai IC_{50} ini menunjukkan konsentrasi dari ekstrak dan fraksi yang mampu menghambat aktivitas enzim α -glukosidase sebesar 50%. Hasil pengujian aktivitas penghambatan ekstrak dan fraksi daun gaharu terhadap enzim α -glukosidase dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar VI.4 Perbandingan aktivitas penghambatan α -glukosidase dari akarbose, ekstrak etanol, fraksi metanol-air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan

Hasil pengujian aktivitas penghambatan dari ekstrak dan fraksi daun gaharu serta standar (akarbose) ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ yaitu ekstrak etanol, fraksi metanol-air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan dan akarbose berturut-turut sebesar 90,87; 35,89; 89,78; 908,53; dan 19,08 µg/mL. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi metanol-air dan fraksi etil asetat memiliki potensi dalam penghambatan enzim α -glukosidase karena berada di bawah 100 µg/mL (Dewiyanti, Filaila and Yuliani, 2012). Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin besar daya penghambatan sampel enzim alfa glukosidase. Hasil uji dari standar yaitu akarbose menunjukkan kemampuan penghambatan yang tinggi Dan sampel uji yang

memberikan daya penghambatan paling baik yaitu fraksi metanol-air yaitu dengan nilai IC_{50} 35,89 $\mu\text{g/mL}$.

Penelitian telah menunjukkan efek hipoglikemik flavonoid memberi efek menguntungkan seperti terhadap manifestasi penyakit, baik melalui kemampuan mereka untuk menghindari penyerapan glukosa atau untuk meningkatkan toleransi glukosa. Flavonoid dianggap sebagai zat alami yang menjanjikan dan secara signifikan menarik untuk memperkaya pilihan terapi saat melawan diabetes (Brahmachari, 2011). Berdasarkan hasil pemantauan, adanya aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase kemungkinan berasal dari keberadaan golongan senyawa flavonoid di dalam ekstrak dan fraksi daun gaharu. Penghambatan yang baik dari fraksi metanol-air diduga karena kandungan senyawa golongan flavonoid pada fraksi metanol-air lebih tinggi dibandingkan pada ekstrak, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan.