

Bab VI Hasil dan Pembahasan

VI.1 Penyiapan Bahan

Penyiapan bahan dilakukan dengan mengumpulkan bahan berupa daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) yang diperoleh dari PT. Mitra Dulur Sejahtera, Pabrik Obat Tradisional (HERBAL), Palembang. Daun gaharu yang telah diperoleh kemudian dibersihkan dari pengotor-pengotor yang melekat, setelah itu di cuci dengan air yang mengalir. Kemudian daun gaharu dikeringkan menggunakan oven pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ agar dapat disimpan dengan waktu yang lebih lama, serta bahan disimpan diwadah yang tertutup rapat.

VI.2 Determinasi Bahan

Daun gaharu yang diperoleh selanjutnya dilakukan determinasi tanaman dengan tujuan untuk memastikan kebenaran identitas tanaman yang akan digunakan. determinasi tanaman dilakukan di Pusat Penelitian Biologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor dengan hasil determinasi yang menunjukkan bahwa tanaman yang diteliti merupakan tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk). Hasil determinasi daun gaharu di lampirkan pada lampiran B.

VI.3 Karakterisasi Simplisia

Tujuan dilakukan karakterisasi simplisia adalah untuk mengetahui kualitas dan mutu dari simplisia. Karakterisasi simplisia meliputi pemeriksaan penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar sari larut etanol, penetapan kadar sari

larut air, dan susut pengeringan. Hasil karakterisasi simplisia dapat dilihat pada tabel VI.1.

Tabel VI.1. Hasil Karakterisasi Simplisia

Uji Karakterisasi Simplisia	Hasil Pengamatan % (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 Pengetringan	9,85

Parameter kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam memiliki tujuan yaitu untuk memberikan gambaran kandungan mineral dan senyawa anorganik pada bahan dengan prinsip bahan dipanaskan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik (Departemen Kesehatan RI, 2000). Pada tabel VI.1 diperoleh nilai parameter kadar abu total sebesar 3,92 % dan kadar abu tidak larut asam sebesar 1,17 %.

Parameter kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol memiliki tujuan yaitu untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan dengan prinsip melarutkan bahan dengan pelarut (alkohol atau air) untuk ditentukan jumlah solut yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetri (Departemen Kesehatan RI, 2000). Pada tabel VI.1 diperoleh nilai parameter kadar sari larut air sebesar 8,95 %, sedangkan kadar sari larut etanol sebesar 9,27 %. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang terdapat dalam simplisia

lebih banyak tersari di pelarut etanol dibandingkan dengan pelarut air.

Parameter susut pengeringan memiliki tujuan yaitu untuk memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan dengan prinsip pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C selama 30 menit atau sampai berat konstan, yang dinyatakan sebagai nilai persen (Departemen Kesehatan RI, 2000). Pada tabel VI.1 diperoleh nilai parameter susut pengeringan sebesar 9,85 % yang menunjukkan adanya komponen lain yang menguap ketika pengeringan pada suhu 105°C seperti minyak atsiri.

VI.4 Karakterisasi Ekstrak

Tujuan dilakukan karakterisasi ekstrak adalah untuk mengetahui kualitas dan mutu dari ekstrak. Karakterisasi ekstrak yang dilakukan meliputi pemeriksaan bobot jenis. Hasil karakterisasi ekstrak dapat dilihat pada tabel VI.2.

Tabel VI.2. Hasil Karakterisasi Ekstrak

Uji Karakterisasi Ekstrak	Hasil Pengamatan
Pemeriksaan Bobot Jenis	0,8854 g/mL

Parameter pemeriksaan bobot jenis memiliki tujuan yaitu memberikan batasan tentang besarnya massa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang (Departemen Kesehatan RI, 2000). Pada tabel VI.2 diperoleh nilai parameter bobot jenis sebesar 0,8854 g/mL.

VI.5 Skrining Fitokimia

Tujuan dilakukan skrining fitokimia adalah untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada simplisia dan ekstrak. Hasil yang diperoleh dapat digunakan sebagai informasi awal kandungan senyawa kimia yang terdapat pada simplisia dan ekstrak. Skrining fitokimia meliputi analisis senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid/steroid, tanin, kuinon dan saponin.

Tabel VI.3. Hasil Pemeriksaan Skrining Fitokimia Simplisia

Uji Skrining Fitokimia	Pengujian	Hasil	Ket.
Alkaloid	Kertas saring	Endapan jingga	+
	Mayer	Endapan putih	+
	Dragendorf	Endapan merah bata	+
Flavonoid	+ amil alkohol	Warna kuning jingga pada lapisan amil alkohol	+
Triterpenoid / steroid	Liebermann-	Warna biru hijau	+
	Burchard	(+ steroid)	
Tanin	Gelatin	Endapan	+
	FeCl ₃	Warna hijau kehitaman	+
	Steasny	Endapan merah	+
Kuinon	NaOH	Warna merah	+
Saponin	HCl 2 N	Busa stabil	+

Ket : + = terdapat senyawa yang diuji

Berdasarkan tabel VI.3 daun gaharu mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, steroid, tanin, kuinon, dan saponin.

Tabel VI.4. Hasil Pemeriksaan Skrining Fitokimia Ekstrak

Uji Skrining Fitokimia	Pengujian	Hasil	Ket.
Alkaloid	Kertas saring	Endapan jingga	+
	Mayer	Endapan putih	+
	Dragendorf	Endapan merah bata	+
Flavonoid	+ amil alkohol	Warna kuning jingga pada lapisan amil alkohol	+
Triterpenoid / steroid	Liebermann- Burchard	Warna hijau (+ steroid)	+
Tanin	Gelatin	Endapan	+
	FeCl ₃	Warna hijau kehitaman	+
	Steasny	Endapan merah	+
Kuinon	NaOH	Warna merah	+
Saponin	HCl 2 N	Busa stabil	+

Ket : + = terdapat senyawa yang diuji

Berdasarkan tabel VI.4 ekstrak gaharu mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, steroid, tanin, kuinon, dan saponin.

Hasil positif alkaloid pada uji Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih terhadap sampel simplisia dan ekstrak daun gaharu. Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan logam. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion K⁺ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marliana dkk., 2005).

Hasil positif alkaloid pada uji dragendorf juga ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning terhadap sampel simplisia dan ekstrak daun gaharu. Endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Dragendorff, bismut nitrat dilarutkan dalam HCl agar tidak terjadi reaksi hidrolisis karena garam-garam bismut mudah terhidrolisis membentuk ion bismutit (BiO^+). Agar ion Bi^{3+} tetap berada dalam larutan, maka larutan itu ditambah asam sehingga kesetimbangan akan bergeser ke arah kiri. Selanjutnya ion Bi^{3+} dari bismut nitrat bereaksi dengan kalium iodida membentuk endapan hitam bismuth (III) iodida yang kemudian melarut dalam kalium iodida berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam (Marliana dkk., 2005)

Hasil penapisan fitokimia kuinon pada simplisia dan ekstrak daun gaharu menunjukkan hasil yang positif. Pemeriksaan kuinon dilakukan dengan reaksi warna. Warna merah yang dihasilkan dikarenakan adanya penambahan gugus hidroksil pada struktur senyawa. Hal ini menunjukkan bahwa sampel simplisia dan ekstrak daun gaharu terdapat gugus kromofor.

Hasil Flavonoid terhadap sampel simplisia dan ekstrak daun gaharu ditandai dengan adanya perubahan warna pada lapisan amil alkohol. Penambahan serbuk magnesium dan asam klorida pada pengujian flavonoid akan menyebabkan tereduksinya senyawa flavonoid yang ada sehingga menimbulkan reaksi warna merah yang merupakan ciri adanya flavonoid.

Pengujian triterpenoid / steroid didasarkan pada kemampuan senyawa untuk membentuk warna H_2SO_4 dalam asam asetat

anhidrida. Warna merah jingga atau ungu untuk terpenoid dan hijau biru untuk steroid (Harborne, 1984). Hasil yang diperoleh pada pengujian simplisia dan ekstrak daun gaharu menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya warna hijau yang menunjukkan adanya kandungan steroid.

Hasil positif tanin pada sampel simplisia dan ekstrak daun gaharu ditandai dengan adanya endapan, dimana tanin akan mengendapkan protein pada gelatin. Tanin bereaksi dengan gelatin membentuk kapolimer mantap yang tidak larut dalam air (Harborne, 1996). Hasil positif pada penambahan FeCl_3 menunjukkan adanya deoksi gula untuk glikosida. Warna merah yang terbentuk kompleks. Atom oksigen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada gugus gula bisa mendonorkan elektronnya pada Fe^{3+} membentuk kompleks (Marliana dkk., 2005). Hasil positif juga pada penambahan reagen *Steasny* ditandai dengan adanya endapan merah yang menunjukkan adanya tanin katekat.

Hasil positif saponin pada sampel simplisia dan ekstrak daun gaharu menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Penambahan HCl 2N bertujuan untuk menambah kepolaran sehingga gugus hidrofil akan lebih stabil dan buih yang terbentuk menjadi stabil (Simaremare, 2014).

VI.6 Pembuatan Ekstrak

Daun gaharu yang telah diserbukan sebanyak 3000 g kemudian diekstraksi dengan cara maserasi dengan perbandingan 1:10. Prinsip maserasi yaitu cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk kedalam sel. Metode maserasi dipilih karena mudah dilakukan,

menggunakan alat yang sederhana serta dapat menghindari kerusakan komponen senyawa yang tidak tahan panas. Maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam dengan pelarut etanol 96 %. Pelarut etanol 96 % dipilih untuk proses ekstraksi karena kadar sari larut etanol daun gaharu lebih besar dari nilai kadar sari larut air. Setelah diperoleh ekstrak cair maka dilakukan pemekatan ekstrak. Pemekatan berarti peningkatan jumlah senyawa terlarut dengan cara penguapan pelarut hingga ekstrak menjadi kental (Departemen Kesehatan RI, 2000). Pemekatan dilakukan menggunakan alat *Rotary vaporator* suhu 40°C dan didapat ekstrak kental sebanyak 256,3 g. Pada tabel VI.5 menunjukan rendemen ekstrak

Tabel VI.5. Hasil Rendemen Ekstrak Daun Gaharu

Simplisia	Hasil Rendemen (%)
Ekstrak etanol	8,54

VI.7 Pembuatan Fraksi

Ekstrak kental yang telah diperoleh kemudian dilakukan fraksinasi. Fraksinasi dilakukan menggunakan metode Ekstraksi Cair-Cair dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol-air. Ekstraksi Cair-Cair merupakan metode pemisahan berdasarkan partisi antarfase. Ketika fase yang mengandung zat terlarut (metanol-air) dicampur fase kedua (*n*-heksana dan etil asetat), maka zat terlarut akan memisah dan berada diantara dua fase, dimana fase berisi senyawa berbobot jenis lebih besar berada dibawah. Zat terlarut yang mudah terekstraksi dalam pelarut organik adalah molekul-molekul netral yang berikatan secara kovalen dengan substituen yang bersifat non polar atau agak polar. Sementara itu, senyawa-senyawa polar dan

juga senyawa-senyawa yang mudah mengalami ionisasi akan tertahan dalam fase air (Gandjar dan Rohman, 2007). Bobot ekstrak yang difraksinasi sebesar 200 gram ekstrak dan didapat fraksi n-heksan sebesar 40,52 g, fraksi etil asetat sebesar 24,92 g dan fraksi metanol-air sebesar 120,53 g. Pada tabel VI.6 didapatkan hasil rendemen fraksi daun gaharu.

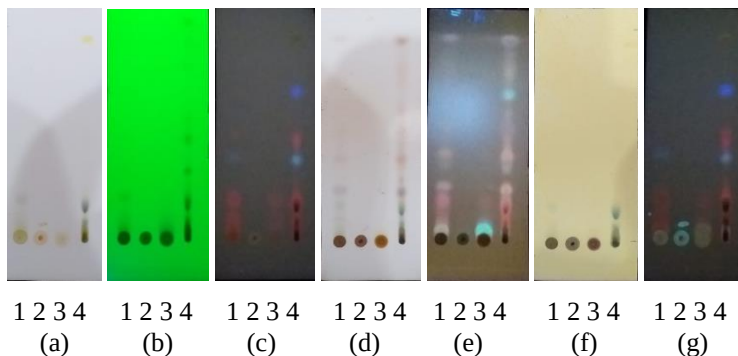
Tabel VI.6. Hasil Rendemen Fraksi Daun Gaharu

Simplisia	Hasil Rendemen (%)
Fraksi n-heksan	20,26
Fraksi etil asetat	12,46
Fraksi metanol-air	60,26

VI.8 Pemantauan Ekstrak dan Fraksi

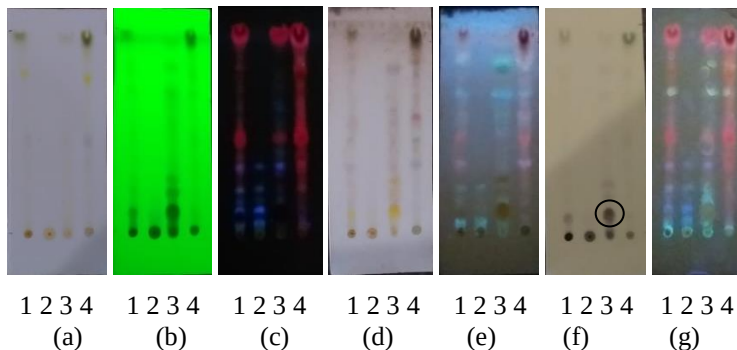
Pemantauan ekstrak dan fraksi dilakukan dengan tujuan untuk analisis dan identifikasi senyawa kimia secara kualitatif (Gandjar dkk., 2007). Pemantauan ekstrak dan fraksi dilakukan menggunakan metode KLT dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak n-heksan : etil asetat (9 : 1), kloroform : metanol (9 : 1) dan etil asetat : metanol : air (8 : 1 : 1). Tiga macam fase gerak dengan kepolaran berbeda digunakan dengan tujuan untuk membandingkan bercak yang timbul pada masing-masing fase gerak. Bercak dapat dilihat dengan menggunakan fluoresensi sinar ultraviolet dan mereaksikanya dengan penampak bercak. Fluoresensi terjadi karena penyerapan sinar ultraviolet oleh zat terlarut, kemudian zat terlarut tersebut akan memancarkan sinar kembali (Gandjar dkk., 2007). penampak bercak yang digunakan adalah H₂SO₄ 10 % (dalam

metanol), FeCl_3 10 % (dalam metanol) dan AlCl_3 5% (dalam metanol).



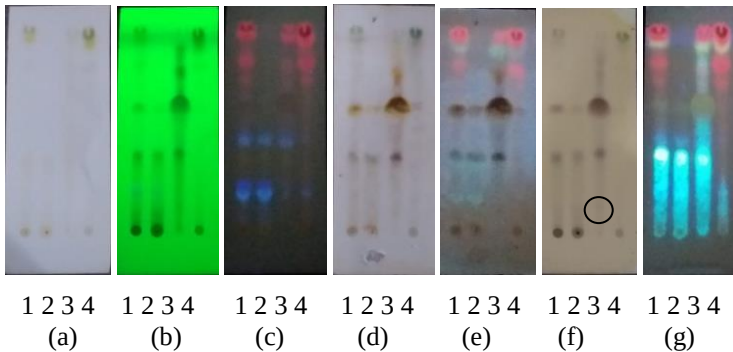
Gambar VI.1 : Kromatogram ekstrak etanol 96 % daun gaharu (1), fraksi metanol-air daun gaharu (2), fraksi etil asetat (3), fraksi *n*-heksana daun gaharu (4), fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak *n*-heksan : etil asetat (9 : 1), visual (a), sinar UV λ 254 nm (b), sinar UV λ 365 nm (c), visual H_2SO_4 10 % (d), sinar UV λ 365 nm H_2SO_4 10 % (e), visual FeCl_3 10 % (f), sinar UV λ 365 nm AlCl_3 5 % (g).

Pada gambar VI.1 setelah plat KLT disemprotkan penampak bercak FeCl_3 terdapat spot berwarna coklat kehitaman dengan latar berwarna kuning pada fraksi *n*-heksana pada bagian bawah, diduga pada fraksi *n*-heksana terdapat senyawa fenolat, sedangkan pada plat KLT dengan penampak bercak AlCl_3 muncul fluoresensi berwarna biru pada fraksi *n*-heksana bagian tengah dan atas, untuk ekstrak etanol dan fraksi etil asetat muncul fluoresensi berwarna kuning kehijauan berada di titik penotolan dan fraksi metanol-air muncul fluoresensi berwarna biru di titik penotolan. Diduga pada ekstrak etanol, fraksi metanol-air, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana terdapat senyawa flavonoid.



Gambar VI.2 : Kromatogram ekstrak etanol 96 % daun gaharu (1), fraksi metanol-air daun gaharu (2), fraksi etil asetat (3), fraksi *n*-heksan daun gaharu (4), fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak kloroform : metanol (9 : 1), visual (a), sinar UV λ 254 nm (b), sinar UV λ 365 nm (c), visual H₂SO₄ 10 % (d), sinar UV λ 365 nm H₂SO₄ 10 % (e), visual FeCl₃ 10 % (f), sinar UV λ 365 nm AlCl₃ 5 % (g).

Pada gambar VI.2 setelah plat KLT disemprotkan penampak bercak FeCl₃ terdapat spot berwarna coklat kehitaman dengan latar berwarna kuning pada ekstrak etanol dan fraksi metanol-air pada bagian bawah, diduga pada ekstrak dan fraksi etil asetat terdapat senyawa fenolat, sedangkan pada plat KLT dengan penampak bercak AlCl₃ muncul fluoresensi berwarna biru dan kuning kehijauan pada ekstrak etanol, untuk fraksi metanol-air fluoresensi berwarna biru, untuk fraksi etil asetat fluoresensi berwarna kuning kehijauan, dan untuk fraksi *n*-heksana fluoresensi berwarna kuning, diduga pada ekstrak etanol, fraksi metanol-air, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana terdapat senyawa flavonoid.



Gambar VI.3 : Kromatogram ekstrak etanol 96 % daun gaharu (1), fraksi metanol-air daun gaharu (2), fraksi etil asetat (3), fraksi *n*-heksan daun gaharu (4), fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak etil asetat : metanol : air (8 : 1 : 1), visual (a), sinar UV λ 254 nm (b), sinar UV λ 365 nm (c), visual H₂SO₄ 10 % (d), sinar UV λ 365 nm H₂SO₄ 10 % (e), visual FeCl₃ 10 % (f), sinar UV λ 365 nm AlCl₃ 5 % (g).

Pada gambar VI.3 setelah plat KLT disemprotkan penampak bercak FeCl₃ terdapat spot berwarna coklat kehitaman dengan latar berwarna kuning pada ekstrak etanol, fraksi metanol-air dan fraksi etil asetat pada bagian bawah sampai tengah, diduga pada ekstrak ekstrak etanol, fraksi metanol-air dan fraksi etil asetat terdapat senyawa fenolat, sedangkan pada plat KLT dengan penampak bercak AlCl₃ muncul fluoresensi berwarna hijau pada ekstrak etanol, fraksi metanol-air dan fraksi etil asetat selain itu muncul fluoresensi berwarna biru pada ekstrak etanol, fraksi metanol-air, fraksi, etil asetat dan fraksi *n*-heksana dengan intensitas warna yang terang, diduga pada ekstrak etanol, fraksi metanol-air, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana terdapat senyawa flavonoid.

VI.9 Pengujian Difusi Cakram Kertas

Tabel VI.7. Hasil Pengujian Difusi Cakram Kertas

Konsentrasi Sampel (ppm)	Diameter Zona Hambat (mm)			D rata2 (mm)
	1	2	3	
Ekstrak etanol				
500.000	-	-	-	-
250.000	8,5	8,9	7,9	8,43
125.000	7,8	8,1	7,2	7,7
Kontrol (+)	16,0	16,9	16,3	16,4
Kontrol (-)	-	-	-	-
Fraksi <i>n</i> -heksana				
500.000	7,9	7,0	-	4,96
250.000	-	-	-	-
125.000	-	-	-	-
Kontrol (+)	16,7	16,8	16,3	16,6
Kontrol (-)	-	-	-	-
Fraksi etil asetat				
500.000	14,9	14,9	14,6	14,8
250.000	11,8	11,9	10,6	11,43
125.000	9,3	9,9	9,2	9,46
Kontrol (+)	16,4	16,8	16,2	16,46
Kontrol (-)	-	-	-	-
Fraksi metanol-air				
500.000	9,1	9,8	8,9	9,26
250.000	8,9	8,8	8,8	8,83
125.000	7,0	7,1	7,1	7,06
Kontrol (+)	12,9	16.2	16,3	15,13
Kontrol (-)	-	-	-	-

Keterangan : - → Tidak terdapat diameter zona hambat

Pada tabel VI.7, pengujian aktivitas antibakteri dilakukan terhadap ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi metanol-air daun gaharu terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram

kertas dengan konsentrasi induk larutan uji 500.000 ppm dan konsentrasi tetrasiklin sebagai pembanding 10 ppm . Nilai KHM pada ekstrak sebesar 125.000 ppm, nilai KHM pada fraksi *n*-heksana sebesar 500.000 ppm, fraksi etil asetat sebesar 125.000 ppm, fraksi metanol-air sebesar 125.000 ppm dengan nilai KHM pada antibiotik sebesar 10 ppm. Berdasarkan hasil pengamatan, fraksi etil asetat memiliki nilai KHM terbaik diantara ekstrak, fraksi *n*-heksana dan fraksi metanol-air, sehingga dapat dikatakan bahwa fraksi yang paling potensial yaitu fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat diuji kembali menggunakan metode mikrodilusi dengan konsentrasi induk 125.000 ppm.

VI.10 Pengujian Mikrodilusi

Mikrodilusi merupakan salah satu metode dilusi. Metode dilusi dapat memperkirakan konsentrasi pada suspensi kaldu, sehingga digunakan untuk penentuan nilai KHM. Pada umumnya, berbagai konsentrasi senyawa yang diuji dicampurkan dengan media berisi bakteri, kemudian diinkubasi. Konsentrasi terendah pada zat uji yang tidak terdeteksi pertumbuhan mikroorganisme, maka itulah nilai KHM (Choma dkk., 2011).

Pada tabel VI.8 dengan konsentrasi larutan induk fraksi etil asetat dibuat sebesar 125.000 ppm, nilai KHM pada fraksi etil asetat sebesar 3900 ppm dan nilai KHM pada antibiotik sebesar 1,25 ppm, maka ditentukan nilai KBM. Nilai KBM ditentukan dengan metode difusi agar. Terbentuknya zona bening pada media terjadi karena zat uji berdifusi kedalam agar dan menghambat perkecambahan dan pertumbuhan mikroorganisme, kemudian hasil tersebut diinkubasi dan zona penghambatan pertumbuhan dapat terukur (Choma dkk.,

2011). Berdasarkan hasil pengamatan, tidak terdapat zona bening pada media agar yang menunjukkan tidak terdapat KBM, yang artinya pada konsentrasi yang digunakan hanya dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Tabel VI.8. Hasil Pengujian Mikrodilusi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
G	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
H	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Keterangan :

(+) : Ada pertumbuhan bakteri

(-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri

Kolom 1 : Kontrol negatif (Media *MHB*)

Kolom 2 : Kontrol positif (Media *MHB* + Bakteri)

Kolom 3-12 : Media *MHB* + Bakteri + larutan Uji

Baris A – E : Fraksi Etil Asetat

Baris F – H : Antibiotik (Tetrasiklin)

Konsentrasi fraksi (3-12) : 120 ppm, 240 ppm, 480 ppm, 970 ppm.
1.950 ppm, 3.900 ppm, 7.800, 15.600 ppm, 31.250 ppm, 62.500 ppm.

Konsentrasi antibiotik (3-12) : 0,0975 ppm, 0,0195 ppm, 0,039 ppm,
0,078 ppm, 0,156 ppm, 0,312 ppm,
0,625 ppm, 1,25 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm.

VI.11 Bioautografi Fraksi Aktif

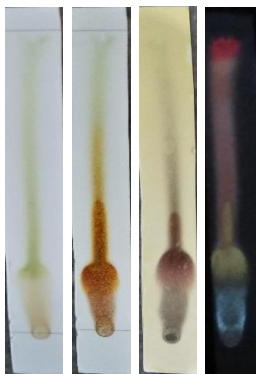
Setelah didapatkan nilai KHM dan KBM pengujian dilanjutkan dengan menggunakan metode bioautografi. Metode bioautografi merupakan metode yang spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil kromatografi lapis tipis (KLT) yang mempunyai

aktivitas sebagai antibakteri (Novitasari dkk., 2015). Fraksi etil asetat dengan konsentrasi 125.000 ppm ditotol pada plat KLT kemudian dielusi dengan fase gerak kloroform : metanol (9 : 1), lalu dikontakan ke media yang berisi bakteri. Dipilihnya metode bioautografi kontak karena lebih mudah, sederhana dan paling sering digunakan. dengan bioautogrfi kontak diperoleh proses perpindahan senyawa aktif ke dalam medium agar yang dapat menghasilkan zona hambatan dan kemampuan membedakan antara senyawa aktif dengan nilai Rf yang sama (Khaerati dkk., 2011). Setelah plat dikontakan dengan media, plat diangkat lalu diinkubasi. Pada gambar VI.4, terdapat bercak yang memiliki zona bening pada media agar dengan rf 0,15. Dengan nilai rf tersebut, bercak yang sama dengan nilai rf 0,15 adalah bercak yang ada pada plat yang direaksikan dengan H₂SO₄ 10 %, FeCl₃ 10 %, dan AlCl₃ 5 % pada gambar VI.5.



(1) (2)

Gambar VI.4 : Kromatogram fraksi daun gaharu (1), hasil kontak antara plat dengan media agar yang telah diinokulasi (2).



(1) (2) (3) (4)

Gambar VI.5 : Kromatogram fraksi daun gaharu visual (1), Kromatogram visual H_2SO_4 10 % (2) Kromatogram visual FeCl_3 10 % (3) kromatogram sinar UV λ 365 nm AlCl_3 5 % (4).

Penampak bercak H_2SO_4 merupakan penampak bercak universal yang dapat memunculkan semua jenis senyawa dengan mengoksidasi solut-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam. Penampak bercak FeCl_3 merupakan penampak bercak spesifik, sehingga senyawa yang bersifat sebagai antibakteri adalah senyawa golongan fenolat atau polifenol. Senyawa polifenol merupakan senyawa tumbuhan yang mengandung cincin aromatis dengan satu atau lebih gugus hidroksil dan dengan penambahan FeCl_3 akan memberikan bercak warna hitam dengan latar belakang berwarna kuning. Aktivitas antibakteri polifenol dikarenakan adanya gugus hidroksil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme denaturasi protein bakteri. Polifenol terdiri atas golongan fenol sederhana dan asam fenolat, kuinin, flavonin, flavonoid dan flavonols, tanin serta kumarin (Ulfa dkk., 2013). Penampak bercak AlCl_3 merupakan penampak bercak spesifik untuk

mendeteksi senyawa flavonoid. Dari hasil pengamatan kromatogram pada sinar UV λ 365 nm terdapat fluoresensi biru dan kuning kehijauan, menurut literatur disebutkan bahwa identifikasi flavonoid akan memberikan warna kuning setelah penggunaan penampak bercak $AlCl_3$ (Mulyani dan laksana, 2011). Maka diduga bahwa pada kromatogram hasil elusi KLT yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan menghasilkan zona hambat pada media bakteri merupakan senyawa flavonoid.

VI.12 Pembuatan Sediaan Gel

Bentuk sediaan yang dibuat dalam penelitian ini adalah hidrogel. Hidrogel dipilih karena daya sebar hidrogel pada kulit baik, tidak menghambat fungsi fisiologis kulit, memberikan efek dingin, serta mudah dicuci dengan air (Voigt, 1994). Formula gel fraksi daun gaharu terdiri dari fraksi daun gaharu 2%, carbomer 940, propilen glikol, metil paraben, propil paraben, NaOH, dan akuades. Sediaan gel yang dibuat selanjutnya akan diuji bioautogtafi kontak untuk mengetahui senyawa yang bertindak sebagai antibakteri pada sediaan gel.

Fraksi daun gaharu berfungsi sebagai zat aktif yang memiliki aktivitas antibakteri. Pembuatan gel fraksi daun gaharu ini menggunakan Carbopol sebagai *gelling agent* yang merupakan bahan pembentuk gel. Carbopol sering digunakan sebagai *gelling agent* karena carbopol dapat memberikan karakteristik gel yang baik. Gel carbopol juga memiliki stabilitas yang baik terhadap panas (Osborne dan Amann, 1990). Penggunaan carbopol pada sediaan gel fraksi gaharu yaitu 2 %. Propilen glikol sebagai humektan yang akan menjaga kestabilan sediaan dengan cara mengabsorbsi lembab dari

lingkungan dan mengurangi penguapan air dari sediaan. Selain menjaga kestabilan sediaan, secara tidak langsung humektan juga mempertahankan kelembaban kulit sehingga kulit tidak kering. Metil paraben dan propil paraben berfungsi sebagai pengawet. Pengawet diperlukan dalam formulasi gel mengingat bahwa tingginya kandungan air dalam sediaan gel yang dapat menyebabkan terjadinya kontaminasi mikroba. NaOH digunakan sebagai pembasa untuk menetralkan carbomer. Akuades berfungsi sebagai pelarut dalam formulasi gel.



Gambar VI.6
Gel fraksi etil asetat 2%

VI.13 Bioautografi Sediaan Gel

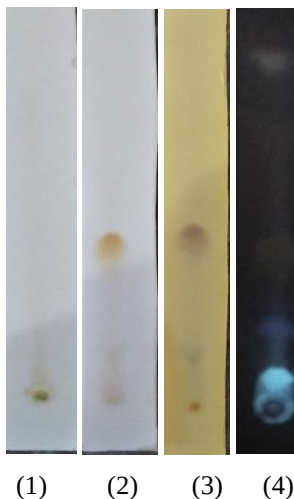
Metode bioautografi merupakan metode yang spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil kromatografi lapis tipis (KLT) yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri (Novitasari dkk., 2015). Sediaan gel fraksi daun gaharu 2 % ditotol pada plat KLT kemudian dielusi dengan fase gerak kloroform : metanol (9 : 1), lalu dikontakan ke media yang berisi bakteri. Dipilihnya metode bioautografi kontak karena lebih mudah, sederhana dan paling sering digunakan. dengan bioautogrfi kontak diperoleh proses perpindahan senyawa aktif ke dalam medium agar yang dapat menghasilkan zona

hambatan dan kemampuan membedakan antara senyawa aktif dengan nilai Rf yang sama (Khaerati dkk., 2011). Setelah plat dikontakan dengan media, plat diangkat lalu diinkubasi. Pada gambar VI.7, terdapat bercak yang memiliki zona bening pada media agar dengan rf 0,12, nilai rf hasil KLT sediaan gel lebih rendah dari nilai rf hasil KLT fraksi etil asetat. Dengan nilai rf tersebut, bercak yang sama dengan nilai rf 0,12 adalah bercak yang ada pada plat yang direaksikan dengan H_2SO_4 10 %, FeCl_3 10 %, dan AlCl_3 5 % pada gambar VI.8.



(1) (2)

Gambar VI.7 : Kromatogram gel fraksi etil asetat daun gaharu (1), hasil kontak antara plat dengan media agar yang telah diinokulasi (2).



Gambar VI.8 : Kromatogram fraksi daun gaharu visual (1), Kromatogram visual H_2SO_4 10 % (2) Kromatogram visual FeCl_3 10 % (3) kromatogram sinar UV λ 365 nm AlCl_3 5 % (4).

Penampak bercak H_2SO_4 merupakan penampak bercak universal yang dapat memunculkan semua jenis senyawa dengan mengoksidasi solut-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam. Penampak bercak FeCl_3 merupakan penampak bercak spesifik, sehingga senyawa yang bersifat sebagai antibakteri adalah senyawa golongan fenolat atau polifenol. Senyawa polifenol merupakan senyawa tumbuhan yang mengandung cincin aromatis dengan satu atau lebih gugus hidroksil dan dengan penambahan FeCl_3 akan memberikan bercak warna hitam dengan latar belakang berwarna kuning. Aktivitas antibakteri polifenol dikarenakan adanya gugus hidroksil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme denaturasi protein bakteri. Polifenol terdiri atas golongan fenol sederhana dan asam fenolat, kuinin, flavonin,

flavonoid dan flavonols, tanin serta kumarin (Ulfa dkk., 2013). Penampak bercak AlCl_3 merupakan penampak bercak spesifik untuk mendeteksi senyawa flavonoid. Dari hasil pengamatan kromatogram pada sinar UV λ 365 nm terdapat fluoresensi biru, diduga bahwa pada kromatogram hasil elusi KLT yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan menghasilkan zona hambat pada media bakteri merupakan senyawa flavonoid.