

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Determinasi Bahan

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun gaharu (*Aquilaria malaccensis*), yang diperoleh dari daerah Daik Lingga, KEPRI (Kepulauan Riau). Determinasi dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, dengan tujuan untuk memastikan kebenaran dari jenis tumbuhan yang dipakai dalam penelitian.

4.2. Penyiapan Bahan

Penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan, dan pembuatan simplisia yang meliputi sortasi basah, pencucian, pengeringan, sortasi kering, dan penyimpanan bahan. Daun gaharu yang telah dikumpulkan dibersihkan terlebih dahulu dengan mencucinya dengan air mengalir. Setelah dicuci bersih, bahan ditiriskan, kemudian dikeringkan dengan cara kering angin. Bahan yang telah kering dihaluskan menjadi serbuk kemudian disimpan di dalam wadah kedap udara dan terlindung dari cahaya matahari.

4.3. Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap daun yang masih segar. Daun diamati secara langsung menggunakan penggaris. Bagian yang diamati meliputi

bentuk daun, macam daun, tepi daun, dasar daun, ujung daun, lebar dan panjang daun(WHO, 2011:11).

4.4. Pemeriksaan Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan untuk melihat struktur dan fragmen-fragmen khas yang terdapat dibawah mikroskop serta karakteristik penanda lain. Pemeriksaan struktur daun dilakukan untuk melihat stomata, trikoma, epidermis, mesofil (palisade dan spons), dan berkas pembuluh (WHO, 2011:11-13).

4.4.1. Struktur daun gaharu

Pereaksi kloral hidrat, I₂KI, floroglusinol secukupnya (1 tetes) diletakkan pada kaca objek lalu ditambahkan irisan tipis daun gaharu, ditutup dengan kaca penutup, dan diamati di bawah mikroskopik. Untuk floroglusinol, sebelum ditutup dengan kaca penutup, dikeringkan dahulu kemudian diberi HCl.

4.4.2. Fragmen serbuk simplisia daun gaharu

Pereaksi seperti pada 4.4.1 secukupnya (1-2 tetes) diletakkan pada kaca objek, kemudian ditambahkan serbuk simplisia, ditutup dengan penutup kaca objek dan diamati di bawah mikroskop.

4.5. Parameter Standar Spesifik Simplisia dan Ekstrak

4.5.1. Organoleptik

Parameter organoleptik dilakukan dengan menggunakan pancaindra, dimana bahan dideskripsikan berdasarkan warna, bau, rasa dengan meminta bantuan 5 orang responden (Depkes RI, 2000:31).

4.5.2. Senyawa terlarut dalam pelarut tertentu

Parameter ini menyatakan jumlah senyawa terlarut dalam pelarut tertentu, bertujuan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan. (Depkes RI, 2000:31).

a. Kadar senyawa larut air

Lima gram bahan simplisia atau ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air kloroform LP menggunakan labu bersumbat sambil dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Filtrat disaring, kemudian sebanyak 20 mL diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000:33).

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{Berat sari larut air}}{\text{Berat bahan awal}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

b. Kadar senyawa larut etanol

Lima gram bahan simplisia atau ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (95%) menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian didiamkan selama 18 jam. Filtrat disaring dengan cepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudian 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol 95%, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000:31-33).

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{Berat sari larut etanol}}{\text{Berat bahan awal}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

4.6. Parameter Standar Simplisia (Non Spesifik)

4.6.1. Kadar air

Sejumlah 200 mL toluena dan 2 mL air dimasukkan ke dalam labu destilasi. Labu dipanaskan hingga larutan mendidih selama 2 jam. 20 gram simplisia dimasukkan ke dalam labu destilasi yang telah berisi toluena yang dijenuhkan dan ditambahkan batu didih untuk mempercepat proses pemanasan. Jika telah mendidih kecepatan penyulingan diatur 2 tetes/detik hingga sebagian air tersuling, selanjutnya kecepatan dinaikkan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, kondensor dibilas dengan toluena dan destilasi dilanjutkan selama 5 menit kemudian pemanasan

dihentikan. Tabung penerima pada suhu kamar didinginkan dan diusahakan tidak ada lagi tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima. Air dan toluena dibiarkan memisah pada tabung penerima, kemudian berapa volume air yang terukur dicatat dan dihitung kadar air dalam persen (%). (Depkes RI, 2000:16).

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(\text{ml air} \times \text{Bj air (g/ml)})}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

4.6.2. Kadar abu

Parameter kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal hingga terbentuknya simplisia.

a. Kadar abu total

Dua gram serbuk daun gaharu digerus, ditimbang lalu dimasukkan secara merata ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara. Kemudian dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan lalu ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, maka panas air ditambahkan, lalu disaring menggunakan kertas saring bebas abu. Sisa kertas dan kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan, lalu dipijarkan hingga bobot tetap, kemudian ditimbang. Kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara dihitung (WHO, 2011:29).

$$\text{Kadar Abu(\%)} = \frac{\text{Berat abu}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

b. Kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, di didihkan dengan 25 mL asam sulfat encer P selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, lalu disaring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, kemudian dipijarkan hingga bobot tetap, ditimbang. Kadar abu tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara dihitung (WHO, 2011:29).

$$\text{Kadar Abu}(100\%) = \frac{\text{Berat abu total} - \text{Berat abu larut asam}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

4.6.3. Susut pengeringan

Sebanyak 2 gram ekstrak dimasukkan ke dalam krus silikat yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang serbuk diratakan dalam krus hingga isi merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm – 10 mm. Jika ekstrak yang diuji merupakan ekstrak kental digunakan batang pengaduk untuk meratakan. Kemudian dimasukkan ke dalam ruang pengering, tutupnya dibuka, dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Setiap pengeringan, krus dibiarkan dingin dalam keadaan tertutup di dalam eksikator hingga suhu kamar. Jika ekstrak sulit kering atau mencair pada pemanasan, ditambahkan 1 g silika pengering yang telah ditimbang setelah dikeringkan dan disimpan di dalam eksikator pada suhu kamar. Silika tersebut dicampurkan secara merata pada ekstrak

pada saat panas, kemudian dikeringkan kembali pada suhu penetapan hingga bobot tetap (WHO, 2011:31).

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{\text{Berat awal} - \text{Berat zat yang dipanaskan}}{\text{Berat zat awal}} \times 100\%$$

4.7. Parameter Standar Non Spesifik Ekstrak

4.7.1. Parameter bobot jenis

Digunakan piknometer dan harus dalam keadaan bersih, kering serta telah dikalibrasi terlebih dahulu dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C. Ekstrak cair suhu 20°C dimasukkan ke dalam piknometer, suhu piknometer yang telah terisi diatur hingga mencapai 25°C, kelebihan ekstrak cair dibuang lalu piknometer ditimbang. Bobot piknometer kosong dikurangi dengan bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25°C.

$$\text{Berat jenis ekstrak cair} \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{W3 - W1}{W2 - W1}$$

Keterangan: W3: Bobot piknometer terisi ekstrak cair, W2: Bobot piknometer terisi air, W1: Bobot piknometer kosong (Depkes RI, 2000:14).

4.8. Penapisan Fitokimia

4.8.1. Senyawa alkaloid

Sebanyak 2 gram serbuk daun gaharu ditempatkan ke dalam mortar, lalu ditambahkan 5 mL amonia 25%, dicampur dengan 20 mL kloroform kemudian digerus kembali dengan kuat. Campuran disaring kemudian filtrat larutan organik diambil sebagai larutan A. Sebagian filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan asam klorida 10% v/v. Lalu fraksi air dipisahkan sebagai larutan B. Larutan A diteteskan pada kertas saring, lalu disemprot dengan pereaksi Dragendroff, dan terbentuknya warna merah atau jingga pada kertas menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid. Larutan B dibagi menjadi 2 bagian di dalam tabung reaksi, tabung pertama ditambahkan pereaksi Dragendroff, dan tabung kedua ditambahkan pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan merah bata dengan pereaksi Dragendroff atau endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid (Farnsworth, 1966:245)

4.8.2. Senyawa polifenolat

Sebanyak 1 gram serbuk daun gaharu ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Kepada filtrat ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida dan timbulnya warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru-hitam hingga hitam menandakan positif

fenolat atau timbul endapan coklat menunjukkan adanya fenolat (Farnsworth, 1966:264).

4.8.3. Senyawa flavonoid

Sebanyak 1 gram serbuk daun gaharu ditempatkan pada gelas kimia, lalu ditambahkan 100 mL air panas dan didihkan selama 10 menit. Selanjutnya campuran disaring dan filtrat ditampung sebagai larutan C yang nantinya akan digunakan untuk pemeriksaan golongan senyawa flavonoid, saponin, dan kuinon. Larutan C sebanyak 5 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida pekat. Campuran ditambahkan amilalkohol, dikocok dengan kuat lalu dibiarkan hingga terjadi pemisahan. Terbentuknya warna dalam lapisan amilalkohol menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid (Farnsworth, 1966:263).

4.8.4. Senyawa saponin

Lima mL larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok selama 10 detik. Dibiarkan selama 10 menit, kemudian diamati. Terbentuknya busa 1 cm yang stabil didalam tabung reaksi menunjukkan adanya golongan senyawa saponin. Busa tersebut masih tetap ada setelah ditambahkan beberapa tetes asam klorida (Farnsworth, 1966:257).

4.8.5. Senyawa kuinon

Lima mL larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan beberapa tetes larutan Natrium hidroksida 1 N. Terbentuknya warna kuning hingga merah menandakan adanya golongan senyawa kuinon (Farnsworth,1966:265).

4.8.6. Senyawa tanin

Sebanyak 1 gram serbuk daun gaharu ditambahkan 100 mL air panas, kemudian dididihkan selama 15 menit. Campuran kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian di dalam tabung reaksi. Filtrat pertama ditambahkan larutan besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru atau hitam kehijauan menunjukkan adanya golongan senyawa tanin. Filtrat kedua ditambahkan larutan gelatin 1%, terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya golongan tannin. Filtrat ketiga ditambahkan 15 mL pereaksi Steasny, lalu dipanaskan diatas penangas. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan adanya tannin katekat. Hasil uji filtrat ketiga disaring, kemudian dijenuhkan dengan ditambahkan natrium asetat, kemudian beberapa tetes larutan besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tanin galat (Farnsworth,1966:264).

4.8.7. Senyawa monoterpen dan sesquiterpen

Sebanyak 1 gram serbuk digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat yang didapat ditempatkan di dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap hingga kering, lalu ditambahkan vanilin 10% dalam asam klorida pekat dan timbulnya warna-warna menandakan positif mengandung senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Depkes RI, 1977:132).

4.8.8. Senyawa triterpenoid dan steroid

Serbuk daun 1 gram di gerus dengan eter lalu disaring. Filtrat yang didapat ditempatkan dalam cawan penguap lalu dibiarkan mengering, kemudian ditambahkan laruta pereaksi Lieberman-Burchard. Terbentuknya warna merah ungu menandakan adanya senyawa terpenoid, sedangkan bila warnanya hijau-biru menandakan positif adanya steroid (Farnsworth, 1966:257-259).

4.9. Metode Ekstraksi

Daun gaharu sebanyak masing-masing 200 gram diekstraksi secara dekokta dan seduhan masing-masing dengan menggunakan pelarut air sebanyak 2 liter. Untuk dekokta pelarut air dipanaskan pada suhu 90°C kemudian ditambahkan simplisia yang telah dirajang kasar, dipanaskan selama 30 menit, Untuk metode seduhan dengan menggunakan pelarut air yang kemudian dipanaskan hingga mendidih lalu dituangkan ke simplisia yang telah dirajang kasar selama 5-10 menit.

4.10. Uji Aktivitas Anti Bakteri

4.10. Uji Aktivitas Anti Bakteri

4.10.1. Sterilisasi alat dan bahan

Agar tidak terjadi kontaminasi pada saat melakukan uji difusi, alat dan bahan harus disterilisasi terlebih dahulu. Proses sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

4.10.2. Pembuatan medium agar dan difusi bakteri

Nutrient Agar (NA) sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam beaker gelas kemudian ditambahkan 250 mL aquadest, kemudian dipanaskan diatas *hotplate* dengan *stirrer* hingga warna berubah menjadi kuning jernih (Oktavianus, 2013:21). Untuk suspensi bakteri, inokula *Escherichia coli* diambil menggunakan jarum ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi *Nutrient Broth* (NB) lalu di vortex selama 3 menit dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator bersuhu 37°C. Setelah dilakukan inkubasi bakteri tersebut di ukur transmitannya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 530 nm hingga transmittan dari bakteri mencapai 25%.

Ekstrak hasil ekstraksi secara dekokta dan seduhan ditimbang masing-masing sebanyak 1 gram kemudian ditambahkan DMSO (Dimethyl Sulfoxide) hingga 10 mL dimasukkan ke dalam labu takar untuk membuat larutan stok 10%. Larutan stok tersebut kemudian diencerkan hingga konsentrasi 6%, 5%, 4%, 3%. Sebelum

didapatkan konsentrasi tersebut, dilakukan terlebih dahulu orientasi konsentrasi yaitu dimulai dari 10% hingga 0,25%.

4.10.3. Pengujian aktivitas anti bakteri

Suspensi bakteri sebanyak 10 μ L dimasukkan ke dalam cawan petri kemudian ditambahkan *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 20 mL dan digoyang-goyangkan agar homogen dan dibiarkan hingga medianya memadat. Media agar didalam cawan petri dilubangi menjadi empat sumur. Masing-masing sumur tersebut diisi dengan antibiotik pembanding sebagai kontrol positif, DMSO sebagai kontrol negative, konsentrasi terkecil dari sediaan sampai konsentrasi terbesar dari sediaan. Setelah siap cawan petri di inkubasi dalam inkubator 37°C selama 24 jam. Kemampuan ekstrak dari dekokta dan seduhan sebagai antibakteri akan ditunjukkan dengan adanya daya hambat (zona bening) di sekitar lubang sumur. Dilakukan pengukuran dengan jangka sorong untuk mendapatkan nilai dari zona bening yang dihasilkan. Setelah didapatkan daya hambat dibandingkan kemampuan daya hambat antara metode dekokta dan seduhan dari tiap konsentrasinya.

4.11. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak dekokta dan seduhan masing-masing dianalisis dengan cara ditotolkan pada plat silika gel GF 254 dengan menggunakan mikrokapiler pada garis 1 cm di bagian bawah plat. Plat KLT kemudian dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang berisi etil asetat, air, dan asam format (9,8 :0,09: 0,09) yang telah dijenuhkan

terlebih dahulu kemudian disemprot dengan penampang bercak FeCl_3 dan penampang bercak H_2SO_4 . Harga Rf dihitung dengan membandingkan jarak bercak terhadap garis batas pelarut (Harborne, 1996:14).

4.12. Penetapan Kadar Tanin

4.12.1. Penetapan panjang gelombang maksimum asam tanat

Sebanyak 500 mg asam tanat dilarutkan dengan air 100 ml di dalam labu ukur dan dibuat dalam beberapa konsentrasi. Larutan tersebut dipipet 0,1 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur yang telah berisi 7,5 mL aquadest, lalu ditambahkan 0,5 mL pereaksi Folin Ciocalteu dan 1 mL Na_2CO_3 35%, setelah itu ditambahkan air sampai volume 10 mL, dan di *vortex* selama 5 menit agar didapatkan larutan yang homogen. Larutan didiamkan selama 30 menit kemudian absorbansinya diamati dengan spektrofotometer uv-sinar tampak pada panjang gelombang 400-900 nm. Panjang gelombang yang memberikan nilai absorbansi paling besar ditetapkan sebagai panjang gelombang maksimum asam tanat (Tamiselvi *et al.*,2012:3261).

4.12.2. Penetapan kadar tanin total

Sebanyak 500 mg sampel dekokta dan seduhan dilarutkan sampai 100 mL dengan air, kemudian dipipet sebanyak 0,1 mL sampel dimasukkan dalam labu ukur yang telah berisi 7,5 mL aquadest selanjutnya ditambahkan 0,5 mL pereaksi Folin Ciocalteu dan 1 mL Na_2CO_3 35%. Genapkan volume sampai 10 mL, kemudian dihomogenkan. Larutan didiamkan selama 30 menit, selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum asam tanat. (Tamiselvi *et al.*,2012:3261).

4.13. Analisis Data

Data percobaan dianalisis dengan menggunakan analisis variansi satu arah (one way ANOVA) dan perbedaan antara rata-rata dari masing-masing metode ditentukan dengan uji Tukey dengan menggunakan program SPSS versi 17. Nilai P lebih kecil dari 0,05 (nilai α) dianggap mempunyai perbedaan yang signifikan secara statistik dan data percobaan juga dianalisis dengan menggunakan analisis uji perbandingan rata-rata atau uji T independent sampel (Sugiharto, 2009:1).

Dengan teknik analisis data tersebut, maka dapat dirumuskan suatu hipotesis sebagai berikut :

Hipotesis (H)

H_0 : -Tidak ada perbedaan kadar tanin total yang bermakna antara metode dekokta dan seduhan

-Tidak ada perbedaan daya hambat minimum yang bermakna antara metode dekokta dan seduhan.

H_1 : -Terdapat perbedaan kadar tanin total yang bermakna antara metode dekokta dan seduhan

-Terdapat perbedaan daya hambat minimum yang bermakna antara metode dekokta dan seduhan.