

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman adalah tahap awal yang dilakukan sebelum proses penelitian. Determinasi tanaman merupakan proses dalam menentukan nama atau jenis tumbuhan secara spesifik. Determinasi bertujuan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan pada penelitian ini sesuai dengan jenis dan spesies dari tanaman yang diinginkan. Determinasi tanaman temu tis dilakukan di Laboratorium Lingkungan, Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman. Hasil determinasi menyatakan bahwa tanaman tersebut adalah temu tis dari famili *Zingiberacea*, genus *Curcuma* serta dengan nama spesies *Curcuma purpurascens*. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.2 Preparasi Sampel

Rimpang temu tis sebanyak 10 kg dicuci hingga bersih kemudian dipotong-potong kecil dan dikeringkan di ruangan terbuka dengan cara kering angin. Pengeringan bertujuan untuk menghilangkan kadar air yang terdapat pada rimpang temu tis. Metode kering angin dianggap lebih murah, akan tetapi kurang efisien waktu dalam pengeringan simplisia. Pengeringan dibawah sinar matahari langsung tidak dilakukan, karena sinar ultraviolet dari matahari dapat menimbulkan kerusakan kandungan kimia pada sampel (Winangsih, 2013).

Rimpang temu tis yang telah kering dihaluskan menggunakan blender dan diperoleh sampel halus sebanyak 1,25 kg untuk dilakukan ekstraksi. Penghalusan dengan blender bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel dan diperoleh partikel yang homogen. Partikel kecil yang homogen dapat meningkatkan interaksi antara sampel dengan pelarut sehingga proses ekstraksi berlangsung maksimal (Julianto, 2019).

4.3 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi serbuk rimpang temu tis dilakukan dengan metode maserasi atau perendaman menggunakan pelarut organik yaitu *n*-heksana. Metode maserasi dipilih karena pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan metode ini memaksimalkan kontak antara pelarut dan bahan (Imani, 2015). Pelarut *n*-heksana adalah pelarut yang baik jika digunakan untuk mengekstrak senyawa yang sifatnya non polar sebab mempunyai berbagai kelebihan yaitu volatil, stabil dan selektif (Guenther, 1987). Serbuk sampel dimaserasi sebanyak 1,25 kg diekstraksi menggunakan *n*-heksana dengan cara direndam di wadah yang tertutup rapat pada suhu kamar selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Proses ini dilakukan empat kali pengulangan untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang maksimal. Hasil maserasi disaring dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Pada proses ini dihasilkan ekstrak kental berwarna coklat kehitaman sebanyak 79,916 gram dengan rendemen 6,393%, data perhitungan rendemen disajikan pada Lampiran 3.

4.4 Fraksinasi *n*-Heksana Rimpang Temu Tis

Tujuan dari fraksinasi adalah untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya (Bona *et al.*, 2015). Ekstrak *n*-heksana rimpang temu tis difraksinasi dengan KCV. Metode KCV sering digunakan untuk fraksinasi awal dari suatu ekstrak yang non-polar atau ekstrak semipolar (Chang, 2006).

Sebelum dilakukan fraksinasi, dilakukan analisis dengan KLT untuk menentukan sistem eluen yang dapat memberikan pola pemisahan yang baik. Penentuan eluen menggunakan campuran *n*-heksana dan kloroform dengan berbagai perbandingan yaitu 10:0 sampai 0:10 berdasarkan kenaikan gradien kepolaran, penentuan eluen ini ditentukan secara *trial and error*. Noda hasil elusi pada plat KLT diamati dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm. Berdasarkan hasil pengamatan, eluen terbaik yaitu *n*-heksana : kloroform dengan perbandingan 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 5:5 dan 0:10. Hal ini karena noda memberikan pola pemisahan yang cukup baik (Kantasubrata *et al.*, 1994).

Ekstrak *n*-heksana terlebih dahulu diimpregnasi dengan silika gel. Tujuan dari proses impregnasi agar sampel yang akan difraksinasi dapat tersebar dengan homogen dan diharapkan hasil pemisahannya baik (Jayanti *et al.*, 2010). Sampel diimpregnasi dengan silika gel dengan perbandingan 1:2, lalu diaduk hingga homogen dan menjadi serbuk kering. Kemudian fase gerak dimasukkan pada kolom yang telah ditekan agar menjadi padat dengan tingkat kepolarannya secara gradien, yaitu *n*-heksana : kloroform 10:0, 9:1 dan 5:5 (2x200 mL), *n*-heksana : kloroform 8:2, 7:3 dan 0:10 (200 mL). Berdasarkan hasil fraksinasi ekstrak *n*-heksana diperoleh 8 fraksi yang kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Fraksi-fraksi yang telah dipekatkan kemudian dianalisis menggunakan KLT dengan eluen *n*-heksana : kloroform (7,5:2,5) dan diamati dibawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Hasil analisis KLT dari 8 fraksi kemudian digabungkan berdasarkan kesamaan spot (noda) menjadi 3 fraksi yaitu fg1, fg2 dan fg3. Fraksi gabungan dianalisis kembali dengan KLT menggunakan eluen *n*-heksana : kloroform (7,5:2,5) dan dilihat dengan lampu UV 254 nm. Profil KLT fraksi gabungan hasil KCV dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan massa fraksi gabungan disajikan pada Tabel 4.1.



Gambar 4.1 Profil KLT fraksi gabungan hasil KCV

Tabel 4.1 Massa fraksi gabungan

No.	Fraksi gabungan	Massa (g)
1	fg1	13,578
2	fg2	3,216
3	fg3	0,761

Berdasarkan Gambar 4.1 dan Tabel 4.1 dipilih dua fraksi utama yang menunjukkan profil KLT yang baik dan memiliki bobot fraksi yang banyak yaitu fg1 dan fg2. Fraksi utama yang dipilih selanjutnya diuji aktivitasnya terhadap jamur *C. albicans* dan *M. furfur*.

4.5 Uji Antijamur Ekstrak *n*-Heksana dan Fraksi Hasil KCV

Ekstrak *n*-heksana dan fraksi utama hasil KCV (fg1 dan fg2) diuji aktivitasnya terhadap jamur *C. albicans* dan *M. furfur*. Uji aktivitas antijamur juga dilakukan terhadap kontrol negatif sebagai pembandingan. Kontrol negatif berupa DMSO (20%) yang juga digunakan sebagai pelarut sampel, alasan DMSO digunakan karena DMSO merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar. Selain itu DMSO tidak memberikan daya hambat pertumbuhan jamur, sehingga tidak mengganggu hasil dari pengujian aktivitas antijamur (Utami, 2011). Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antijamur ini yaitu difusi cakram. Prinsip kerja metode cakram dengan menjenuhkan bahan uji didalam kertas cakram. Cakram yang mengandung sampel diletakkan dipermukaan plat agar yang mengandung organisme uji. Pengukuran zona hambat dilakukan setelah diinkubasi selama 24 jam dengan indikasi positif yaitu terlihat area jernih atau bersih mengelilingi cakram. Metode difusi cakram dipilih karena memiliki kelebihan dapat digunakan untuk senyawa non polar dan polar, cepat, mudah dan sederhana (Valgas *et al.*, 2007). Hasil pengukuran zona hambat dari ekstrak *n*-heksana, kedua fraksi utama dan kontrol negatif terhadap jamur *C. albicans* dan *M. furfur* dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil uji aktivitas antijamur ekstrak *n*-heksana dan fraksi utama terhadap jamur *C. albicans* dan *M. furfur*

Sampel (konsentrasi 1000 ppm)	Rerata diameter zona hambat (mm)	
	<i>C. albicans</i>	<i>M. furfur</i>
Ekstrak <i>n</i> -heksana	2,80	2,56
fg1	1,97	1,08
fg2	2,71	2,39
DMSO (20%) (K ⁻)	-	-

Menurut Davis dan Stout (1971), kriteria kekuatan daya antijamur sebagai berikut:

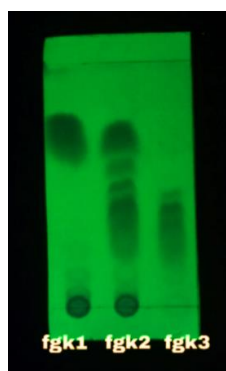
- a. Diameter zona hambat <5 mm dikategorikan lemah
- b. Diameter zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang
- c. Diameter zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat
- d. Diameter zona hambat >20 mm dikategorikan sangat kuat.

Berdasarkan kategori tersebut, maka daya hambat yang dihasilkan ekstrak *n*-heksana dan kedua fraksi utama dikategorikan lemah karena menghasilkan zona hambat dibawah 5 mm. Fraksi yang memiliki daya hambat paling tinggi, yaitu fg2 yang dapat menghambat jamur *C. albicans* dan *M. furfur* berturut-turut adalah 2,71 dan 2,39 mm akan digunakan pada proses pemisahan menggunakan kromatotron.

4.6 Pemurnian Fraksi Aktif

Pemurnian fraksi fg2 dilakukan dengan metode kromatografi sentrifugal atau kromatotron. Pemisahan menggunakan kromatotron dipilih karena pada hasil KLT menunjukkan pola yang rapat. Pemisahan dengan cara ini lebih cepat dan pelarut yang digunakan lebih sedikit dari kromatografi kolom. Fasa diamnya berupa silika gel yang dilapisi pada plat kaca kuarsa dan untuk fasa gerak berupa pelarut yang sesuai dengan pola noda KLT (Hossettmann *et al.*, 1995). Sebelum dilakukan elusi, fraksi fg2 terlebih dahulu dianalisis menggunakan KLT untuk menentukan eluen terbaik. Berdasarkan hasil analisis KLT, eluen terbaik yang dipilih untuk pemurnian fraksi fg2 adalah *n*-heksana : kloroform (9:1) dan (9,5:0,5).

Hasil pemurnian fraksi fg2 sebanyak 1,2 gram menghasilkan 22 fraksi. Semua fraksi yang dihasilkan diidentifikasi menggunakan KLT dengan eluen *n*-heksana : kloroform (6,5:3,5) dan diamati dengan lampu UV 254 nm. Fraksi-fraksi yang menunjukkan spot noda yang sama digabungkan sehingga diperoleh 3 isolat gabungan yaitu fgk1, fgk2 dan fgk3. Profil KLT fgk1, fgk2 dan fgk3 dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan massa isolat hasil pemisahan dengan kromatotron dapat dilihat pada Tabel 4.3.

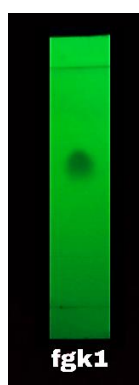


Gambar 4.2 Profil KLT fraksi gabungan hasil kromatotron

Tabel 4.3 Massa isolat gabungan hasil pemisahan dengan kromatotron

No.	Fraksi gabungan	Massa (g)
1	fgk1	0,198
2	fgk2	0,376
3	fgk3	0,249

Berdasarkan hasil KLT isolat fgk1 dilakukan pemurnian kembali untuk mendapatkan satu noda utama. Hasil yang didapatkan setelah pemurnian kembali kemudian diidentifikasi menggunakan KLT dengan eluen *n*-heksana : kloroform (7,5:2,5) dan diamati dengan lampu UV 254 nm. Massa isolat yang diperoleh yaitu sebesar 0,163 gram dengan spot satu noda utama. Profil KLT dapat dilihat pada Gambar 4.3.

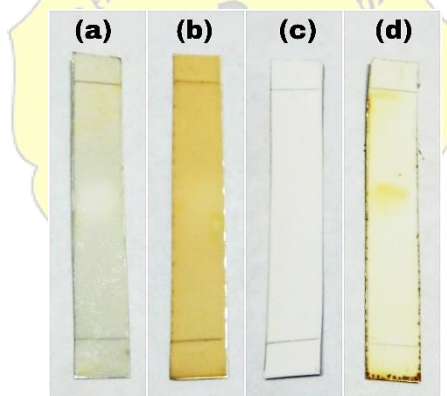


Gambar 4.3 Profil KLT fgk1

Berdasarkan Gambar 4.3 isolat fgk1 diduga menunjukkan spot tunggal, maka dipilih untuk dilakukan uji selanjutnya yaitu uji fitokimia, uji antijamur terhadap jamur *C. albicans* dan *M. furfur* serta diidentifikasi senyawanya menggunakan GC-MS.

4.7 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam sampel. Metode skrining fitokimia dilakukan dengan pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna (Widayanti *et al.*, 2009). Identifikasi metabolit sekunder dilakukan melalui uji warna pada plat KLT yang meliputi golongan alkaloid, fenolik, flavonoid dan terpenoid. Isolat fgk1 dielusi dengan eluen *n*-heksana : kloroform (8:2) yang kemudian disemprot dengan pereaksi warna. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada Gambar 4.4 dan disajikan pada Tabel 4.4



Gambar 4.4 Profil KLT hasil skrining fitokimia isolat fgk1 setelah pemberian (a) Dragendorff (b) FeCl_3 5% (c) AlCl_3 5% dan (d) uap I_2

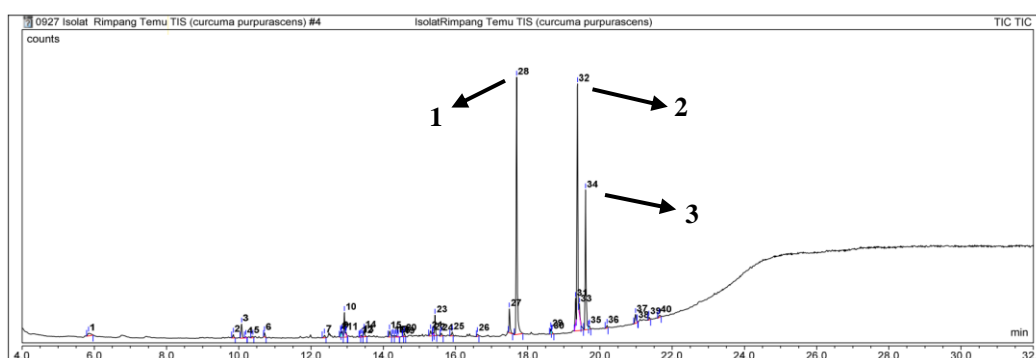
Tabel 4.4 Hasil skrining fitokimia isolat fgk1

Metabolit sekunder	Pereaksi	Hasil pengamatan	Hasil positif (Harborne, 1987)	Indikasi
Alkaloid	Dragendorff	-	Jingga	Negatif
Fenolik	FeCl_3 5%	Jingga	Hijau kehitaman	Negatif
Flavonoid	AlCl_3 5%	-	Kuning	Negatif
Terpenoid	Uap I_2	Bercak coklat	Bercak coklat	Positif

Berdasarkan hasil uji fitokimia (Gambar 4.4) dapat dilihat bahwa isolat fgk1 mengandung senyawa terpenoid ditandai dengan terbentuknya bercak warna coklat pada noda isolat fgk1. Iodium (I_2) mampu mengadisi ikatan rangkap pada senyawa golongan terpenoid. Halogenasi ikatan rangkap merupakan uji kualitatif untuk mendeteksi adanya ikatan rangkap yang ditandai dengan terbentuknya bercak warna coklat (Harborne, 1987).

4.8 Identifikasi Senyawa fgk1

Identifikasi senyawa menggunakan GCMS menunjukkan bahwa isolat fgk1 memperlihatkan 40 puncak pada kromatogram dengan 3 puncak utama yaitu puncak 28, 32 dan 34. Kromatogram isolat fgk1 disajikan pada Gambar 4.5.



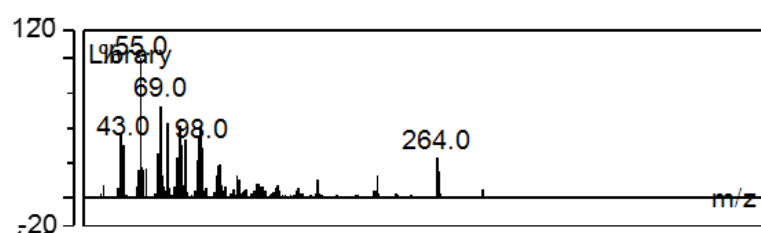
Gambar 4.5 Kromatogram isolat fgk1

Senyawa puncak 32 merupakan senyawa dominan dengan presentase *peak area* sebesar 30,54% pada waktu retensi 19,38 menit. Hasil identifikasi GCMS senyawa utama isolat fgk1 disajikan pada Tabel 4.5.

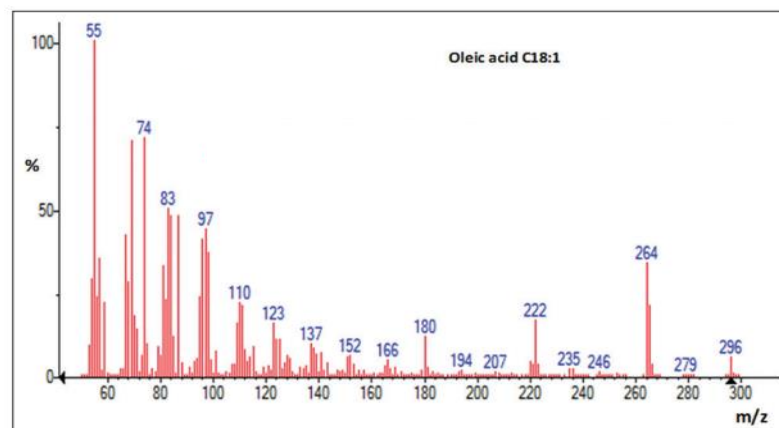
Tabel 4.5 Hasil identifikasi GCMS senyawa utama isolat fgk1

No	Peak	Senyawa	Peak area (%)	Waktu retensi (menit)	m/z	Rumus molekul
1	28	Metil heksadekanat	29,19	17,69	270	$C_{17}H_{34}O_2$
2	32	Metil 9(Z)-oktadekenat	30,54	19,38	296	$C_{19}H_{36}O_2$
3	34	Metil stearat	14,67	19,60	298	$C_{19}H_{38}O_2$

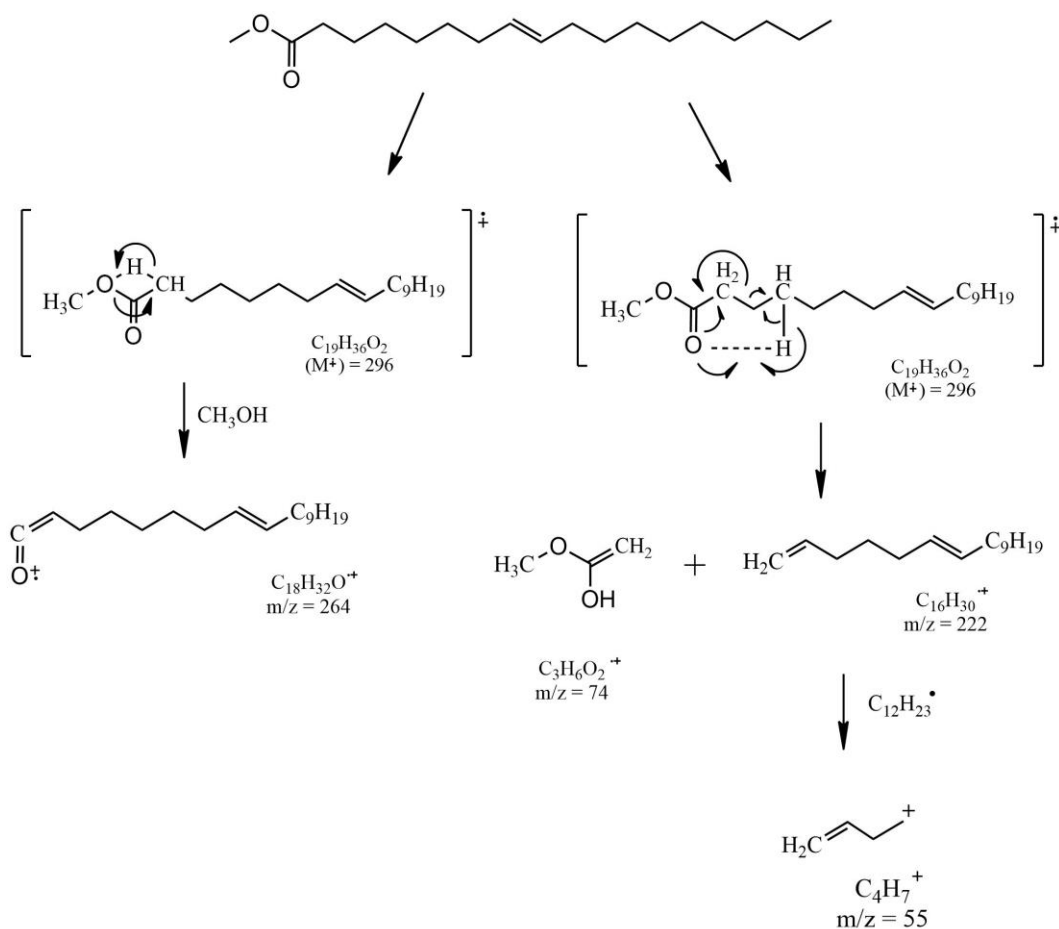
Senyawa puncak 32 memiliki kemiripan dengan jurnal Carrillo *et al* (2018) yang disajikan pada Gambar 4.7. Senyawa ini diduga metil 9(Z)-oktadekenoat atau dikenal sebagai asam oleat dengan rumus molekul $C_{19}H_{36}O_2$ yang merupakan golongan asam lemak tak jenuh tunggal yang banyak ditemukan secara alami di tanaman dan produk hewani. Asam oleat telah dilaporkan memiliki aktivitas antijamur terhadap patogen jamur (Agoramoorthy *et al.*, 2007). Spektrum massa senyawa puncak 32 dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Spektrum massa senyawa puncak 32



Gambar 4.7 Spektrum massa metil 9(Z)-oktadekenoat (Carrillo *et al.*, 2018)



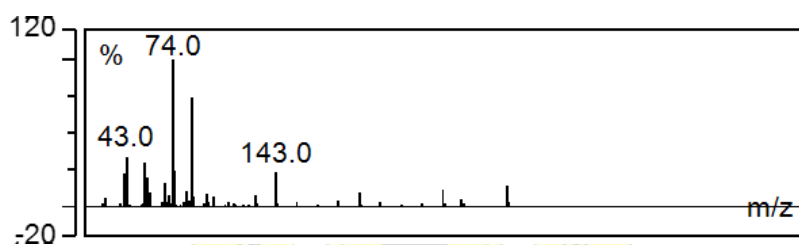
Gambar 4.8 Pola fragmentasi metil 9(Z)-oktadekenoat

Spektrum massa pada Gambar 4.7 menunjukkan puncak ion molekuler (M^+) 296. Jalur fragmentasi metil 9(Z)-oktadekenoat disajikan pada Gambar 4.8 dimana ion molekuler (M^+) melepaskan CH_3OH menghasilkan fragmen m/z 264, ion molekuler dapat membentuk fragmen dengan m/z 74 dan m/z 222. Fragmen dengan m/z 222 kemudian melepaskan radikal $\text{C}_{12}\text{H}_{23}$ menghasilkan fragmen m/z 55. Fragmen m/z 55 merupakan *base peak* pada puncak, *base peak* adalah puncak tertinggi yang menggambarkan ion paling stabil (Dachriyanus, 2004).

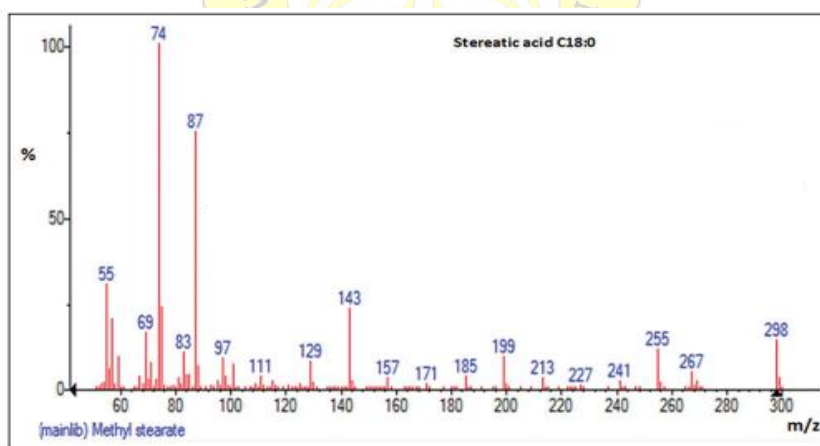
Senyawa puncak utama selanjutnya ditunjukkan oleh puncak 28 yang muncul pada waktu retensi 17,69 menit dengan persentase *peak area* sebesar 29,19%. Senyawa puncak 28 memiliki kemiripan dengan jurnal Carrillo *et al* (2018) yaitu metil heksadekanoat atau dikenal sebagai asam palmitat yang disajikan pada Gambar 4.10. Spektrum massa senyawa puncak 28 dapat dilihat pada Gambar 4.9.

sebagai metil heksadekanoat atau dikenal sebagai asam palmitat dengan rumus molekul $C_{17}H_{34}O_2$. Senyawa ini merupakan asam lemak jenuh yang memiliki sifat sebagai antijamur (Thibane *et al.*, 2010).

Senyawa puncak utama lainnya yaitu puncak 34 terdeteksi pada waktu retensi 19,60 menit dengan persentase *peak area* sebesar 14,67%. Senyawa puncak 34 memiliki kemiripan dengan jurnal Carrillo *et al* (2018) yaitu metil oktadekanoat yang disajikan pada Gambar 4.13. Berdasarkan kemiripannya, senyawa puncak 34 tersebut diprediksi sebagai metil oktadekanoat dengan rumus molekul $C_{19}H_{38}O_2$. Senyawa ini memiliki nama lain atau dikenal sebagai asam stearat atau metil stearat. Spektrum massa senyawa puncak 34 dapat dilihat pada Gambar 4.12.

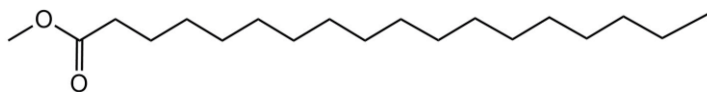


Gambar 4.12 Spektrum massa senyawa puncak 34



Gambar 4.13 Spektrum massa metil stearat (Carrillo *et al.*, 2018)

Senyawa ini merupakan asam lemak jenuh yang mudah diperoleh dari lemak hewani. Asam stearat telah terbukti memiliki aktivitas antijamur (Thibane *et al.*, 2010). Struktur senyawanya dapat dilihat pada Gambar 4.14.



Gambar 4.14 Struktur senyawa metil stearat

Mekanisme kerja utama asam lemak antijamur menyatakan bahwa asam lemak memasukkan dirinya ke dalam lapisan ganda lipid membran jamur sehingga mengganggu integritas membran, mengakibatkan pelepasan elektrolit dan protein intraseluler yang tidak terkontrol, yang pada akhirnya menyebabkan disintegrasi sitoplasma sel jamur (Avis dan Byaitulanger, 2001).

4.9 Uji Antijamur fgk1

Fraksi yang paling aktif selanjutnya diuji aktivitasnya terhadap jamur *C. albicans* dan *M. furfur*. Uji aktivitas antijamur juga dilakukan terhadap kontrol positif dan kontrol negatif sebagai pembandingan. Kontrol positif berupa ketokonazol dengan konsentrasi 1000 ppm, ketokonazol dipilih karena ketokonazol merupakan golongan azol yang paling baik dalam menghambat pertumbuhan jamur (Hamdanah, 2012). Mekanisme kerja ketokonazol sebagai antijamur adalah dengan mengganggu sintesis ergosterol yang merupakan unsur pokok yang spesifik pada membran sel jamur (Shino *et al.*, 2016). Pengukuran zona hambat dilakukan setelah diinkubasi selama 24 jam. Hasil pengukuran zona hambat isolat fgk1 dan kontrol terhadap jamur *C. albicans* dan *M. furfur* dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil uji aktivitas antijamur isolat fgk1 dan kontrol terhadap jamur *C. albicans* dan *M. furfur*

Sampel (konsentrasi 1000 ppm)	Rerata diameter zona hambat (mm)	
	<i>C. albicans</i>	<i>M. furfur</i>
fgk1	2,13	1,42
Ketokonazol (K ⁺)	19,17	12,57
DMSO (20%) (K ⁻)	-	-

Berdasarkan Tabel 4.6 dapat diketahui bahwa isolat fgk1 memiliki aktivitas antijamur terhadap jamur *C. albicans* dan *M. furfur* yang ditandai dengan terlihatnya area jernih atau bersih mengelilingi cakram (Lampiran 4). Hasil pengukuran menunjukkan bahwa nilai zona hambat dari isolat fgk1 lebih rendah dari ketokonazol sebagai kontrol positif. Nilai zona hambat dari isolat fgk1 terhadap jamur *C. albicans* dan *M. furfur* berturut-turut adalah 2,13 mm dan 1,42 mm yang dikategorikan memiliki daya hambat lemah. Daya hambat yang dihasilkan isolat fgk1 lebih kecil dibandingkan dengan fraksi fg2.

Berdasarkan hasil uji fitokimia, isolat fgk1 diduga merupakan senyawa golongan terpenoid. Namun hasil GCMS menyebutkan bahwa isolat fgk1 merupakan golongan asam lemak. Adanya perbedaan hasil ini karena beberapa zat terutama asam lemak yang sangat tidak jenuh akan bereaksi secara kimia dengan iodine sehingga ketika pengujiannya memberikan visualisasi berupa spot coklat (Rosamah, 2019).

