

PENAPISAN FITOKIMIA, PENETAPAN KADAR NAFTOKUINON TOTAL, DAN AKTIVITAS ANTIFUNGI FRAKSI TIDAK LARUT ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL DAUN PACAR KUKU (*Lawsonia inermis* L.) TERHADAP *Candida albicans* ATCC 10231

PHYTOCHEMICAL SCREENING, DETERMINATION OF NAPHTOQUINONE CONTENT, AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF INSOLUBLE ETHYL ACETATE FRACTION OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Lawsonia inermis* L.) LEAVES AGAINST *Candida albicans* ATCC 10231

Submitted : 31-07-2015

Reviewed : 18-08-2015

Accepted: 25-11-2015

Ainun Muthoharoh dan Zainab

*Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta
Jl. Prof. Dr. Soepomo, Janturan, Yogyakarta, Telp. (0274) 379418
Email: ainun.muthoharoh@gmail.com*

ABSTRAK

Candidiasis merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Candida albicans*. Pengobatan sintetik terhadap *Candida albicans* telah dikembangkan, namun laporan-laporan mengenai resistensi terhadap agen antifungi yang ada terus bermunculan, dan menimbulkan banyak efek samping. Tanaman pacar kuku (*Lawsonia inermis* L.) merupakan salah satu tanaman yang memiliki aktivitas antifungi. Penelitian ini bertujuan melakukan pengujian aktivitas antifungi ekstrak etanol fraksi tidak larut etil asetat daun pacar kuku terhadap *Candida albicans*. Fraksi tidak larut etil asetat diperoleh dari hasil ekstraksi maserat daun pacar kuku dan difraksinasi dengan etil asetat. Uji aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans* menggunakan metode mikrodilusi. Obat yang digunakan sebagai pembanding adalah infus amfoterisin B dosis 250 µg/ml dengan konsentrasi 1,50 µg/ml, 0,75 µg/ml, 0,38 µg/ml, 0,19 µg/ml, 0,09 µg/ml, dan 0,05 µg/ml. Parameter yang digunakan dalam penentuan aktivitas antifungi adalah Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Konsentrasi ekstrak etanol yang digunakan untuk penetapan KHM dan KBM 80%, 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5% (b/v). Isolasi dan Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan dengan identifikasi dan penetapan kadar senyawa naftokuinon. Hasil penelitian menunjukkan bahwa KHM ekstrak etanol fraksi tidak larut etil asetat daun pacar kuku tidak dapat ditentukan dengan metode mikrodilusi, karena kondisi larutan sampe yang keruh. Kadar Bunuh Minimum ekstrak etanol fraksi tidak larut etil asetat daun pacar kuku adalah 40% (b/v). Konsentrasi Hambat minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) amfoterisin B berturut-turut 0,09 µg/ml dan 0,19 µg/ml. Hasil identifikasi kandungan senyawa menunjukkan bahwa ekstrak etanol fraksi tidak larut etil asetat daun pacar kuku mengandung polifenol, saponin, dan quinon. Kadar naftokuinon total dalam ekstrak etanol fraksi tidak larut etil asetat daun pacar kuku 7,97±0,14%. Kesimpulan penelitian ini adalah fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol daun pacar kuku memiliki aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans*.

Kata kunci: *Lawsonia inermis* L., *Candida albicans*, mikrodilusi, KHM, KBM, kadar naftokuinon

ABSTRACT

Candidiasis is an infection caused by *Candida albicans*. Synthetic treatment against *Candida albicans* has been developed, but reports of resistance to antifungal agents that there continue to

emerge, and cause a lot of side effects. Pacar kuku (*Lawsonia inermis* L.) is one of the plants that has antifungal activity. Chemical content of polyphenols inhibit candidiasis is a form of naphthoquinone. This study aimed to test the antifungal activity of ethanolic extract of insoluble ethyl acetate fraction of pacar kuku leaves against *Candida albicans*. The ethanol extract was obtained from the ethyl acetate extraction of previously fractionated with ethyl acetate. Identification of chemical compounds made with phytochemical screening. Test antifungal activity against *Candida albicans* using microdilution method. Amphotericin B infusion in doses 250 µg/ml with the concentration of 1,50 µg/ml, 0,75 µg/ml, 0,38 µg/ml, 0,19 µg/ml, 0,09 µg/ml, dan 0,05 µg/ml were used as standard solution. The parameters in this study are the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC). The concentration of the extract used in the MIC and MFC determination were 80%, 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5% (w/v). Identification of chemical compounds was performed using test tubes and assay on anthraquinone compounds. The results showed that the MFC of the ethanol extract is 40% w/v. The MIC and MFC of amphotericin B were 0,09 µg/ml and 0,19 µg/ml respectively. The test tubes showed that the ethanol extract contains polyphenols, saponins, and quinone. The naphthoquinone total content in the ethanol extract consecutively 7,97±0,14%.

Keywords: *Lawsonia inermis* L., *Candida albicans*, microdilution, MIC, MFC, naphthoquinone content

PENDAHULUAN

Candida sp. merupakan penyebab kandidiasis pada manusia (Nasution, 2013). Angka kejadian kandidiasis oral di Jawa Tengah khususnya di RSUD Moewardi Surakarta mencapai 85,4% dari 332 pasien HIV yang menderita kandidiasis oral Kusuma, 2014).

Agen antijamur sistemik terbukti efektif untuk pengobatan kandidiasis, terdiri empat kategori utama, yaitu poliena (amfoterisin B), triazol (flukonazol dan itraconazole), echinocandins (casprofungin, anidulafungin, dan micafungin), dan flusitosin. Amfoterisin B diberikan untuk pasien yang terinfeksi isolat yang mungkin rentan terhadap flukonazol (misalnya, *Candida albicans*) (Peter *et al.*, 2009). Amfoterisin B dengan dosis tinggi dapat meningkatkan efek samping dan telah dilaporkan resistensi amfoterisin B terhadap beberapa spesies *Candida* (Sharma *et al.*, 2014).

Tanaman pacar kuku (*Lawsonia inermis* L.) merupakan salah satu tanaman yang memiliki aktivitas antifungi terhadap kandidiasis. Adanya naftokuinon dengan alfa-beta *unsaturated carbonyl* menyebabkan toksisitas pada jamur candida sangat besar (Rahmoun *et al.*, 2013). Tanaman ini juga memiliki khasiat sebagai antibakteri, antimikroba, antifungal, analgesik, hipoglikemia, hepatoprotektif, imunostimulan, anti-inflamasi, antiviral, antiparasit, (Chaudhary *et al.*, 2010).

Fraksinasi dengan etil asetat dilakukan untuk menyeleksi kandungan senyawa kimia dalam ekstrak etanol daun pacar kuku yang memiliki aktivitas terhadap *Candida albicans*. Komponen kimia daun pacar kuku seperti bentuk glikosida naftokuinon, tanin, dan saponin merupakan senyawa polar sehingga diharapkan lebih banyak tersari dalam fraksi tidak larut etil asetat yang bersifat polar. Berdasarkan uraian di atas, maka peneliti melakukan penapisan fitokimia, penetapan kadar naftokuinon, dan uji aktivitas antifungi fraksi tidak larut etil asetat terhadap *Candida albicans*.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

LAF (Air Tech) dan spektrofotometri visibel Shimadzu 1700. Bahan utama yang dipergunakan adalah daun pacar kuku yang diambil dari Desa Celeban Baru, Tahunan, Umbulharjo, Yogyakarta. Sediaan uji yang digunakan adalah serbuk daun pacar kuku yang dimaserasi dengan etanol 50%. Jamur uji yang digunakan adalah *Candida albicans* ATCC 10231. Media jamur yang digunakan adalah SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*), SDB (*Sabouraud Dextrose Broth*) dan SDB DS (*Sabouraud Dextrose Broth DoubleStrength*), bahan lain yang digunakan adalah air suling steril, *lawsone standard*, benzena, AlCl₃, KOH 5%, HCl 2 M, HCl 2 N, NaCl 0,9%, FeCl₃5%, infus amfoterisin B dosis 250 µg/ml, kloramfenikol serbuk, DMSO 1% (*Dimethyl sulfoxide*), aluminium foil, etil asetat, dan standar *Mc.Farland* 10⁸ CFU/ml.

Jalannya Penelitian

Pembuatan Simplisia dan Pengerinan

Daun pacar kuku yang diambil dari desa Celeban Baru, Tahunan, Umbulharjo Yogyakarta. Dilakukan penyortiran daun pacar kuku yang utuh, masih berwarna hijau dan tampak segar, dipisahkan dari tangkainya, kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih, dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung dengan ditutup kain hitam. Penjemuran dilakukan beberapa hari sampai daun kering. Dilanjutkan pengeringan dengan oven suhu 50°C sampai kering. Daun yang telah kering diserbuk menggunakan blender dan disaring menggunakan *mesh* 50.

Pembuatan Fraksi Tidak Larut Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku

Sebanyak 250 mg serbuk simplisia diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut 1 L etanol 50 % dengan perbandingan jumlah simplisia dan pelarut 1 : 4. Untuk maserasi, pelarut yang ditambahkan sebanyak 600 ml dan remaserasi sebanyak 400 ml. Setelah direndam dengan pelarut sebanyak yang telah ditentukan, dilakukan pengadukan dengan alat stirer selama 3 jam, kemudian perendaman dilakukan selama 24 jam. Filtrat hasil remaserasi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C dan kecepatan 100 rpm, dan selanjutnya diuapkan di atas *waterbath*.

Ekstrak pekat ditimbang sebanyak 1 g, kemudian dilarutkan ke dalam 10 ml air panas suhu 60°C, didinginkan dan difraksinasi menggunakan corong pisah dengan etil asetat 10 ml sebanyak tiga kali berturut-turut. Ditunggu sampai didapatkan dua fase. Fraksi air sebagai fraksi tidak larut etil asetat pada lapisan bawah dan fraksi larut etil asetat pada lapisan atas. Fraksi air diuapkan di atas penangas air.

Penapisan Fitokimia dengan Uji Tabung

1. Pembuatan Larutan Uji Fitokimia

Larutan uji untuk penapisan fitokimia dibuat dengan konsentrasi 1% dilakukan dengan cara melarutkan sebanyak 250 mg fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol daun pacar kuku (*Lawsonia inermis* L.) dalam 25 ml aquadest.

2. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui gambaran umum tentang kandungan kimia yang terdapat dalam daun pacar kuku, yaitu untuk mengetahui ada tidaknya gugus kromofor pada senyawa yang terdapat dalam fraksi. Sebanyak 6 ml larutan uji diambil dari stok dibagi ke dalam 3 tabung. Tabung A diisi sebanyak 2 ml larutan uji dan digunakan sebagai blanko. Tabung B diisi 2 ml larutan uji yang dipanaskan di atas air mendidih. Tabung C diisi 2 ml larutan uji yang telah dipanaskan dan ditambahkan 3 tetes basa (KOH) hingga warna larutan berubah menjadi lebih intensif. Bila larutan yang dihasilkan berwarna kuning sampai merah menunjukkan adanya senyawa yang mengandung kromofor (flavonoid, antrakinon, dan sebagainya) dengan gugus hidrofilik (asam fenolat, gula, dan sebagainya) (Wardhani dan Nanik, 2012).

3. Uji Alkaloid

Uji adanya alkaloid dilakukan dengan pereaksi Mayer dan Dragendorff. Larutan fraksi uji sebanyak 3 ml dimasukkan ke dalam cawan porselin, kemudian ditambahkan 5 ml HCl 2 M, diaduk dan kemudian didinginkan pada suhu ruangan. Setelah dingin, ditambahkan 0,5 g NaCl lalu diaduk dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan HCl 2 M sebanyak 3 tetes, kemudian dipisahkan menjadi 3 bagian I, II, dan III. Filtrat I sebagai blanko, filtrat II ditambah pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes, dan filtrat III ditambah pereaksi Dragendorff sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung II dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung III menunjukkan adanya alkaloid (Jones dan Kinghorn, 2006 dalam Dewi *et al.*, 2013).

4. Uji Flavonoid

Larutan uji diteteskan di atas kertas saring. Selanjutnya kertas diuapi dengan amonia (Harborne, 1987). Apabila timbul warna kuning intensif menunjukkan adanya flavonoid.

5. Uji Polifenol dan Tanin

Sebanyak 3 ml larutan uji diekstraksi dengan air suling panas 10 ml, kemudian didinginkan, ditambah 5 tetes NaCl 10% dan disaring. Filtrat dibagi 3 bagian I, II, dan III. Filtrat I digunakan sebagai blanko, filtrat II ditambahkan FeCl₃ sebanyak 3 tetes, dan filtrat III ditambah garam gelatin. Pada filtrat II, jika timbul warna hijau biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan

adanya polifenol (Jones dan Kinghorn, 2006 dalam Dewi *et al.*, 2013). Pada filtrat III, jika timbul endapan menunjukkan adanya tanin (Harborne, 1996).

6. Uji Saponin (Uji Busa)

Sebanyak 2 ml larutan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan HCl 2 N, buih tidak hilang (Anonim, 1995).

7. Uji Quinon

Sebanyak 1 ml larutan uji ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH. Apabila terbentuk warna merah menunjukkan adanya kuinon (Harborne, 1987).

Penetapan Kadar Naftokuinon Total

1. Pembuatan Reagen

a) Pembuatan larutan induk *lawsone* (100 µg/ml)

Sebanyak 12,5 mg *lawsone* dilarutkan dalam 25 ml metanol p.a sebagai larutan stok. Sebanyak 10 ml larutan stok dimasukkan ke dalam 50 ml metanol p.a.

b) Pembuatan larutan KOH 5%

Sebanyak 5,0 g KOH dilarutkan dalam 100 ml metanol p.a.

c) Pembuatan larutan FeCl₃ 5%

Sebanyak 5,0 g FeCl₃ dilarutkan dalam 100 ml aquadest.

2. Tahapan Penentuan Kadar Senyawa Naftokuinon

a) Penentuan *operating time*

Sebanyak 4 ml larutan *lawsone* konsentrasi 10 µg/ml ditambah 100 µL KOH 5%, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai volume 5,0 ml, digojog homogen, dan diukur absorbansinya dalam rentang waktu 0-60 menit pada panjang gelombang 452 nm.

b) Penentuan panjang gelombang absorbansi maksimum

Sebanyak 4 ml larutan *lawsone* 20 µg/ml ditambah 100 µL KOH 5%, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai volume 5,0 ml, digojog homogen, didiamkan dalam *range operating time* dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 452 nm.

c) Pembuatan kurva baku *lawsone*

Sebanyak 4 ml larutan *lawsone* 10, 15, 20, 25, 30, 35, dan 40 µg/ml masing-masing dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml, ditambah 100 µL KOH 5%, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda, digojog sampai homogen, didiamkan dalam *range operating time*, dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum, kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi (µg/ml) dengan absorbansi.

d) Penetapan kadar naftokuinon total (Anonim, 2000)

Sebanyak 100,0 mg fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol daun pacar kuku kocok dengan 10 ml air panas selama 5 menit, disaring dalam keadaan panas, filtrat didinginkan, dan diekstraksi dengan 10 ml benzena. Lapisan benzena dipisahkan dan pada lapisan air ditambah-10 ml larutan FeCl₃ 5% dan 5 ml asam klorida. Campuran air dipanaskan di atas penangas air menggunakan refluks selama 10 menit, didinginkan dan diekstraksi dengan 10 ml benzena. Lapisan benzena diuapkan pada cawan porselen dengan pemanasan lemah hingga pelarut habis. Residu dilarutkan dalam 4 ml metanol p.a., kemudian disaring, ditambah 100 µL KOH 5%, dan ditambahkan metanol p.a sampai tanda, digojog homogen, didiamkan dalam *range operating time*, absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

Uji Aktivitas Antifungi Fraksi Tidak Larut Etil Asetat dengan Metode Mikrodilusi

1. Sterilisasi Bahan, Media, dan Alat

Bahan dan media yang digunakan untuk uji aktivitas antifungi disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan alat gelas yang akan digunakan disterilkan dengan oven pada suhu 160-170°C selama 2 jam (Anonim, 1995). Jarum ose dibakar dengan nyala bunsen.

2. Pembuatan Media *Sabouroud's Dextrose Agar* (SDA)

Sebanyak 1 gram pepton, 4 gram glukosa, dan 3 gram agar dilarutkan dalam 100 ml air suling mendidih, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk agar miring dan sisanya untuk agar

cawan petri. Media selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah tidak terlalu panas ditambahkan kloramfenikol untuk mencegah timbulnya kontaminan.

3. Pembuatan Media *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) dan *Sabouraud Dextrose Broth Double Strength* (SDBDS)

Pada pembuatan media SDB dibutuhkan sebanyak 1 g pepton dan 2 g glukosa, sedangkan pada pembuatan media SDB DS dibutuhkan sebanyak 2 g pepton dan 4 g glukosa, dilarutkan dalam 100 ml air suling mendidih. Media selanjutnya disterilisasi menggunakan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin, ditambahkan kloramfenikol. Setiap 1000 ml media SDA/SDB memerlukan 400 mg kloramfenikol, setiap 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,9% (Bridson, 1989).

4. Pembuatan Suspensi Jamur

Satu ose biakan *Candida albicans* dimasukkan dalam 1 ml media SDB, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian diambil 100 µL dimasukkan ke dalam 1 ml media SDB, inkubasi pada suhu 37°C selama 3-5 jam. Sebanyak 100 µL diambil lalu diencerkan dengan NaCl 0,9%, dikocok homogen dan disamakan dengan standar Mc. Farland 10⁸ CFU/ml. Setelah tercampur homogen, diambil 50 µL ditambahkan 4950 µL media SDB DS sehingga konsentrasi menjadi 10⁶ CFU/ml (Sari *et al.*, 2010).

5. Pengujian Aktivitas Antifungi

Sebanyak 560 mg fraksi tidak larut ekstrak etanol daun pacar kuku dilarutkan sampai 350 µL DMSO 1% dalam evendorf, kemudian difortex, sehingga konsentrasinya menjadi 160% sebagai larutan stok. Larutan stok dimasukkan ke dalam sumur *microplate* kemudian diencerkan dengan media SDB DS steril sampai diperoleh konsentrasi 80%, 40%, 20%, 10%, 5%, dan 2,5%.

Kontrol dalam penelitian terdiri dari kontrol positif, yaitu antibiotik amfoterisin B 250 µg/ml dibuat dalam variasi konsentrasi 1,50 µg/ml, 0,75 µg/ml, 0,38 µg/ml, 0,19 µg/ml, 0,09 µg/ml, dan 0,05 µg/ml, kontrol media yang berisi SDB DS dan aquadest steril, DMSO 1%, dan jamur uji, kontrol negatif berupa media SDB dan jamur uji, serta kontrol fraksi. Kontrol fraksi diambil dari konsentrasi sampel terakhir sebelum ditambahkan suspensi jamur.

Pada *microplate*, pada baris 1, 2, dan 3 baris B hingga F diisi 50 µl aquadest steril. Pada kolom A1 hingga A3 diisi amfoterisin B 1,2 µL dilarutkan 98,8 µL aquadest steril. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat dengan cara mengambil 50 µL dari A1 dimasukkan ke kolom B1 dilanjutkan sampai F1 sehingga volume menjadi 100 µL. Pada kolom 2 dan 3 diisi seperti kolom 1. Kolom 4, 5, dan 6 baris B hingga F diisi 50 µL DMSO 1%. Pada kolom A4 hingga A6 diisi dengan 100 µL sampel yang telah dilarutkan DMSO 1%. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat dengan cara mengambil 50 µL dari A4 dimasukkan ke kolom B4, hingga seterusnya sampai kolom F4 sehingga volume menjadi 100 µL. Pada kolom 2 dan 3 diisi sama seperti kolom 1.

Pada baris G kolom 4, 5, dan 6 diisi 50 µL sisa pengenceran fraksi pada F1, F2, dan F3 dan 50 µL SDB DS (kontrol fraksi), baris H kolom 4, 5, dan 6 diisi 50 µL DMSO 1% (kontrol pelarut), baris G kolom 1, 2, dan 3 diisi 50 µL media SDB DS dan 50 µL aquadest steril (kontrol media), baris H kolom 1, 2, dan 3 diisi aquadest steril (kontrol jamur). Setelah semua kontrol terisi, lalu ditambah 50 µL suspensi jamur yang sudah disesuaikan 10⁶ CFU/ml ke dalam setiap kolom, kecuali pada baris G kolom 4, 5, dan 6 (kontrol fraksi) dan baris G kolom 1, 2, dan 3 (kontrol media), sehingga diperoleh volume akhir tiap kolom sebesar 100 µL, selanjutnya *microplate* ditutup dan bagian pinggir dilem. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan hasilnya diamati.

6. Penentuan KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum)

KHM ditentukan dengan melihat perubahan warna yang terjadi pada *Microplate 96*. Konsentrasi terendah yang tidak keruh ditetapkan sebagai konsentrasi hambat minimum. Terbentuknya koloni dalam larutan pada *microplate* setelah diinkubasi menandakan adanya pertumbuhan jamur.

Penentuan KBM dapat diamati dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan jamur dari goresan pada media yang dibandingkan dengan kontrol sehingga dapat ditentukan berapa konsentrasi terendah larutan fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol pacar kuku yang dapat membunuh jamur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Determinasi Tanaman

Daun pacar kuku yang digunakan dalam penelitian dilakukan determinasi di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Ahmad Dahlan yang berpedoman pada buku *Flora of Java* (Backer dan Van den Brink, 1965). Hasil determinasi ini digunakan untuk menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan untuk menjamin kebenaran jenis atau spesies tanaman. Hasil menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Lawsonia inermis* L.

Hasil Pembuatan Ekstrak dan Fraksi

Pembuatan ekstrak etanol daun pacar kuku menggunakan metode maserasi. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk daun pacar kuku dalam pelarut etanol 50% dan dilakukan pengadukan menggunakan stirer untuk mengoptimalkan proses penyarian. Etanol dipilih karena mempunyai beberapa keuntungan seperti relatif lebih selektif, sulit ditumbuhi kapang dan kuman, tidak beracun, netral, serta tidak terlalu banyak panas yang diperlukan untuk pemekatan. Etanol yang digunakan adalah 50%, karena kadar naftokuinon tersari maksimum 1,43% b/v terhadap simplisia (Zainab, 2013). Pengadukan ini berfungsi untuk memberikan keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif yang lebih cepat ke dalam cairan penyari, karena keadaan diam selama proses maserasi menyebabkan turunnya kecepatan perpindahan zat aktif, sehingga perbedaan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel tetap terjaga (Anonim, 1986).

Lama pengadukan lebih kurang 3 jam, kemudian didiamkan selama 24 jam untuk memberikan kesempatan kepada zat aktif yang ada di dalam sel berdifusi ke luar untuk mengendapkan zat-zat yang tidak diperlukan ikut tersari dalam cairan penyari. Dilakukan remaserasi (pengulangan maserasi) menggunakan pelarut yang baru. Remaserasi lebih efisien daripada maserasi tunggal, untuk memproses sejumlah senyawa yang belum terekstraksi sempurna dari proses maserasi sebelumnya. Seluruh filtrat yang diperoleh kemudian dicampur dan diuapkan sampai etanol habis, hingga diperoleh ekstrak kental daun pacar kuku yang ditandai dengan tidak terciumnya lagi bau etanol. Simplisia yang digunakan dalam pembuatan ekstrak yaitu sebesar 1.506,19 g. Ekstrak kental yang diperoleh sebanyak 325,79 g, sehingga rendemen yang diperoleh sebesar 21,63%. Ekstrak kental yang digunakan dalam fraksinasi sebanyak 21,067 g, sedangkan fraksi kental yang diperoleh 13,146 g, sehingga rendemen yang diperoleh dari fraksinasi adalah 62,4%.

Hasil penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia digunakan untuk mengetahui senyawa yang terkandung di dalam daun pacar kuku. Penapisan fitokimia diharapkan dapat memberikan gambaran golongan senyawa kimia dalam daun pacar kuku yang memiliki korelasi dengan aktivitas fraksi sebagai antifungi. Hasil Penapisan fitokimia dapat dilihat pada Tabel I.

Tabel I. Hasil Penapisan Fitokimia dengan Metode Tabung Fraksi Tidak Larut Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis* L.)

Jenis Uji	Penambahan Reaksi	Hasil
Pendahuluan	Basa (KOH)	+ (Merah)
Alkaloid	Mayer	+ (Endapan hitam)
	Dragendorff	-
Flavonoid	Amonia	-
Polifenol	FeCl ₃	+
Tanin	Gelatin	-
Saponin	HCl encer	+ (Buih konstan)
Quinon	NaOH	+ (Merah)

Berdasarkan tabel di atas, di dalam fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol daun pacar kuku mengandung polifenol, saponin, dan quinon. Pada uji pendahuluan, setelah ditambahkan basa (KOH) warna larutan berubah menjadi lebih intensif. Warna merah yang lebih intensif yang dihasilkan ini

dikarenakan adanya penambahan gugus hidroksil pada struktur senyawa. Hal ini menunjukkan bahwa sampel fraksi terdapat gugus kromofor. Pada uji keberadaan polifenol, hasil uji yang diperoleh pada penambahan FeCl₃, timbul warna kehijauan. Hal ini menunjukkan adanya polifenol dalam larutan sampel fraksi. Pada uji keberadaan saponin, hasil uji yang diperoleh terbentuk buih yang konstan setelah ditetesi HCl encer. Hal ini menunjukkan bahwa larutan sampel fraksi mengandung saponin. Pada uji keberadaan quinon, hasil menunjukkan bahwa terbentuk warna merah setelah ditambahkan larutan NaOH menunjukkan adanya kuinon di dalam sampel fraksi.

Hasil Penetapan Kadar Naftokuinon Total

Penetapan kadar naftokuinon total dilakukan dengan menggunakan larutan KOH 5% sebagai pengompleks. Reagen KOH 5% digunakan karena senyawa golongan quinon dapat bereaksi dengan KOH membentuk larutan berwarna yang dapat diukur absorbansinya. Pada penentuan *operating time*, waktu OT yang diperoleh yaitu pada detik ke 2670-3600 atau menit ke 44-60. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 454,5 nm.

Tabel II. Hasil Pengukuran Absorbansi Standar Lawsone dan Fraksi

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi
10	0,259
15	0,368
20	0,442
25	0,600
30	0,654
35	0,762
40	0,863
Replikasi 1	0,706
Replikasi 2	0,709
Replikasi 3	0,697

Persamaan regresi linier dari kurva baku larutan standar lawsone dan absorbansi diperoleh $y = 0,0201 x + 0,0619$ dengan nilai $r = 0,9966$. Diketahui r tabel yaitu 0,669, diartikan bahwa persamaan dapat digunakan. Kemudian dihitung kadar naftokuinon di dalam fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol daun pacar kuku.

Tabel III. Hasil Penetapan Kadar Naftokuinon Total

Replikasi	Kadar (%)
1	8,00
2	8,03
3	7,88
\bar{x}	7,97
SD	0,0648
CV	0,81
LE	0,14
$\bar{x} \pm LE$	7,97±0,14

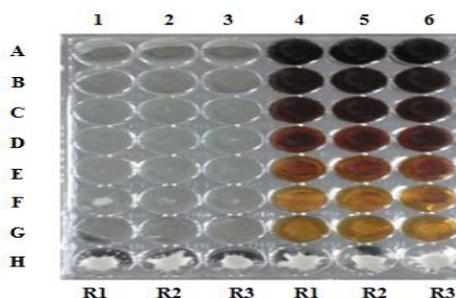
Berdasarkan tabel di atas, kadar naftokuinon pada fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol daun pacar kuku yaitu 7,97±0,14%.

Hasil Uji Aktivitas Antifungi

Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antijamur adalah mikrodilusi cair. Metode mikrodilusi cair dipilih karena sampel yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit, penggunaan media yang lebih hemat, murah, dan dapat menghasilkan hasil yang diulang. Metode mikrodilusi cair juga tidak dipengaruhi tebal tipisnya media dan dapat digunakan untuk menentukan KHM suatu bahan antifungi. Metode ini dilakukan dengan mengencerkan larutan bahan antifungi hingga diperoleh suatu seri kadar. Kontrol dalam penelitian terdiri dari kontrol positif, yaitu antibiotik amfoterisin B. Obat ini dipilih karena sebagai salah satu pengobatan pilihan untuk infeksi jamur berat (Gallis *et al.*, 1990 dalam

Rogers *et al.*, 2003). Amfoterisin B merupakan obat antijamur dengan spektrum luas untuk mengobati infeksi sistemik yang berpotensi fatal seperti yang disebabkan kandida (Neal, 2006). Obat ini juga sebagai alternatif karena ketersediaan terbatas antijamur lainnya (Peter *et al.*, 2009). Dipilih dalam bentuk infus untuk mencegah kontaminasi dengan bakteri atau jamur yang lain selama melakukan penelitian.

Pada penelitian ini dibuat 5 kontrol, antara lain kontrol media, pelarut, fraksi, obat, dan jamur. Larutan kontrol ini digunakan untuk memudahkan pada saat pengamatan hasil penelitian. Kontrol media berfungsi untuk mengetahui sterilitas media uji dan tidak boleh ditemukan adanya pertumbuhan jamur. Kontrol pelarut berfungsi sebagai pembanding yang menunjukkan sterilitas pelarut yang digunakan. Kontrol fraksi berfungsi untuk melihat kejernihan yang menunjukkan sterilitas ekstrak yang diuji. Kontrol suspensi jamur berfungsi untuk melihat kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan jamur. Kontrol obat digunakan untuk membandingkan daya antifungi antara obat dengan bahan uji.



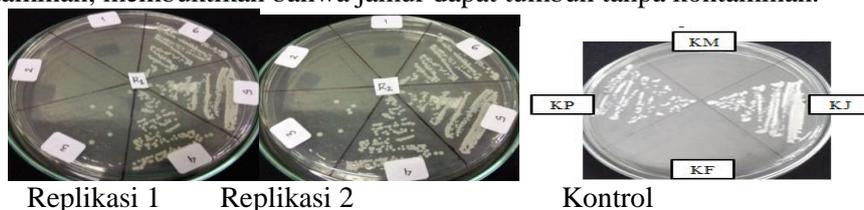
Gambar 1. Hasil Uji KHM menggunakan *microplate 96-well*

Keterangan:

- | | |
|---|---|
| 1, 2, 3 A = AmB konsentrasi 1,50 $\mu\text{g/ml}$ | 4, 5, 6 A = Fraksi konsentrasi 80% b/v |
| 1, 2, 3 B = AmB konsentrasi 0,75 $\mu\text{g/ml}$ | 4, 5, 6 B = Fraksi konsentrasi 40% b/v |
| 1, 2, 3 C = AmB konsentrasi 0,38 $\mu\text{g/ml}$ | 4, 5, 6 C = Fraksi konsentrasi 20% b/v |
| 1, 2, 3 D = AmB konsentrasi 0,19 $\mu\text{g/ml}$ | 4, 5, 6 D = Fraksi konsentrasi 10% b/v |
| 1, 2, 3 E = AmB konsentrasi 0,09 $\mu\text{g/ml}$ | 4, 5, 6 E = Fraksi konsentrasi 5% b/v |
| 1, 2, 3 F = AmB konsentrasi 0,05 $\mu\text{g/ml}$ | 4, 5, 6 F = Fraksi konsentrasi 2,5% b/v |
| 1, 2, 3 G = Kontrol media | 4, 5, 6 G = Kontrol fraksi |
| 1, 2, 3 H = Kontrol jamur | 4, 5, 6 H = Kontrol pelarut |

KHM ditentukan dengan membandingkan kejernihan larutan uji dan kontrol setelah diinkubasi selama 18-24 jam. Pada penelitian ini tidak diperoleh KHM sampel fraksi. Konsentrasi yang terlalu besar menyebabkan fraksi sangat kental berwarna gelap, sehingga menyulitkan saat pengamatan pertumbuhan jamur pada sumur *microplate*, tersaji pada Gambar 1. Larutan sampel sangat pekat atau berwarna coklat kemerahan. KHM amfoterisin B diperoleh pada konsentrasi 0,09 $\mu\text{g/ml}$.

Hasil uji penetapan KHM kontrol media dan kontrol sampel fraksi tidak menunjukkan kekeruhan, membuktikan bahwa media dan sampel fraksi yang digunakan steril. Kontrol pelarut DMSO 1% menunjukkan adanya kekeruhan, membuktikan bahwa pelarut yang digunakan tidak memiliki aktivitas menghambat jamur. Kontrol suspensi jamur menunjukkan adanya kekeruhan dan tidak ada kontaminan, membuktikan bahwa jamur dapat tumbuh tanpa kontaminan.



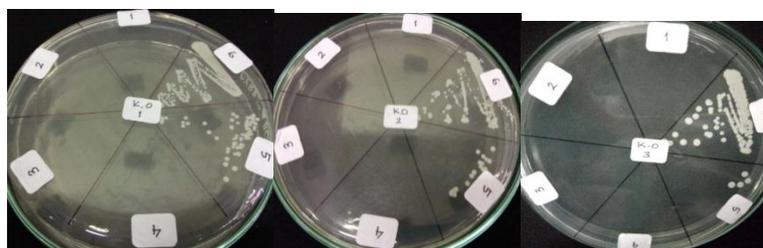
Gambar 2. Hasil Uji KBM Fraksi Tidak Larut Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku

Keterangan:

- | | |
|--------------------------------|----------------------|
| 1 = Fraksi konsentrasi 80% b/v | KP = Kontrol Pelarut |
| 2 = Fraksi konsentrasi 40% b/v | KM = Kontrol Media |

- 3 = Fraksi konsentrasi 20% b/v
- 4 = Fraksi konsentrasi 10% b/v
- 5 = Fraksi konsentrasi 5% b/v
- 6 = Fraksi konsentrasi 2,5% b/v

- KJ = Kontrol Jamur
- KF = Kontrol Fraksi



Replikasi 1 Replikasi 2 Replikasi 3

Gambar 3. Hasil Uji KBM Amfoterisin B terhadap *Candida albicans* pada media SDA

Keterangan:

- 1 = AmB konsentrasi 1,50 µg/ml
- 2 = AmB konsentrasi 0,75 µg/ml
- 3 = AmB konsentrasi 0,38 µg/ml
- 4 = AmB konsentrasi 0,19 µg/ml
- 5 = AmB konsentrasi 0,09 µg/ml
- 6 = AmB konsentrasi 0,05 µg/ml

Larutan uji yang telah diinkubasi, digoreskan pada media SDA untuk menetapkan KBM larutan uji dan menghasilkan data seperti Gambar 2, dan Gambar 3. Media SDA dipilih, karena merupakan media selektif untuk pertumbuhan jamur. Kadar Bunuh Minimum adalah kadar terkecil yang mampu membunuh pertumbuhan jamur ditandai dengan ada atau tidaknya pertumbuhan jamur dari goresan hasil dilusi cair pada media padat SDA (Kumalasari dan Sulistyani, 2013).

Pada penelitian ini diperoleh KBM larutan uji fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol daun pacar kuku 40% b/v dan KBM larutan uji obat 0,19 µg/ml. Hasil uji KBM pada kontrol media dan ekstrak menunjukkan tidak ada pertumbuhan koloni jamur, sehingga terbukti bahwa media dan sampel fraksi yang digunakan steril. Pada kontrol pelarut DMSO 1% menunjukkan adanya pertumbuhan koloni jamur, membuktikan bahwa pelarut yang digunakan tidak memiliki aktivitas anti jamur. Kontrol suspensi jamur menunjukkan adanya pertumbuhan koloni jamur dan tidak ada kontaminan, sehingga membuktikan bahwa jamur dapat tumbuh pada media uji tanpa kontaminan.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol daun pacar kuku menunjukkan aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans* dengan nilai KBM 40% b/v. KHM fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol daun pacar kuku tidak dapat ditentukan dengan metode pengenceran seri (*serial dilution*), karena kondisi larutan sampel yang keruh. KHM dan KBM amfoterisin B berturut-turut adalah 0,09 µg/ml dan 0,19 µg/ml. Fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol daun pacar kuku terdapat komponen kimia quinon, saponin, dan polifenol, dan kadar naftokuinon total pada fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol daun pacar kuku yaitu 7,97±0,14%.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 1986, *Sediaan Galenik*, 10-17, Departemen Kesehatan Indonesia, Jakarta.
 Anonim, 1995, *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Jakarta, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Hal. 896.
 Anonim, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
 Bridson, E.Y., 1998, *The Oxoid Manual*, Published by Oxoid Limited. *Wade Road Basing Stoke*. Hampshire, England.

- Chaudhary, G., Goyal, S., and Poonia, P., 2010, *Lawsonia inermis* Linnaeus: A Phytopharmacological Review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*; 2(2):91-98.
- Dewi, L. D. A. D. Y., Astuti, K. W., Warditiani, N.K., 2013, Penapisan Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.), *Jurnal Farmasi Udaya*.
- Harborne JB., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, ITB, Bandung. Hal. 86-98.
- Kumalasari, E., dan Nanik Sulistyani, 2011, Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Batang Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen.) Terhadap *Candida albicans* serta Penapisan Fitokimia. *Pharmacia* 1 (2) : 51-62.
- Kusuma, Aulia Luthfi, 2014, Hubungan Kadar CD4 dengan Kejadian Kandidiasis Oral pada Penderita HIV/AIDS di RSUD Moewardi Surakarta, *Naskah Publikasi Skripsi*, UMS.
- Marlina, Soerya Dewi, Venty Suryanti, dan Suyono, 2005, Penapisan Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol, *Biofarmasi* 3 (1): 26-31, Februari 2005, ISSN: 1693-2242.
- Nasution A. I., 2013, Virulence Factors and Pathogenicity of *Candida albicans* in Oral Candidiasis, *World Journal of Dentistry*, 4(4):267.
- Neal, M. J., 2006, *At a Glance Farmakologi Medis*, Edisi Kelima, Erlangga, Jakarta, Hal. 86-87.
- Peter *et al.*, 2009, Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America, *Treatment Guidelines for Candidiasis*, CID 2009:48 Hal.507 dan 513.
- Rahmoun, N. M., Z. Boucherit-Atmani, M. Benabdallah, 2013, Antimicrobial Activities of the Henna Extract and Some Synthetic Naphthoquinones Derivatives, *American Journal of Medical and Biological Research*, 1(1): 16-22.
- Rogers, P. David, Robert E. Kramer, Janice K. Crews, dan Russell E. Lewis, 2003, The Activity of Amphotericin B Against *Candida albicans* Is Not Directly Associated With Extracellular Calcium Concentration, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, Hal. 305.
- Sari, Yeni Dianita, Sitti Nur Djannah, dan Laela Hayu Nurani, 2010, Uji Aktivitas Antibakteri Infusa Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Secara *in Vitro* terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 35218 serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya, *Jurnal Kesmas UAD*, Vol. 4 No.3, September 2010 :144-239.
- Sharma, Sushma, Md. Alfatah, Vinay K. Bari, Yashpal Rawal, Sanjoy Paul, dan K. Ganesan, 2014, Sphingolipid Biosynthetic Pathway Genes *FEN1* and *SUR4* Modulate Amphotericin B Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Volume 58: Number 4, www.aac.asm.org.
- Wardhani, Lilies Kusuma dan Nanik Sulistyani, 2012, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* L. Moq.) terhadap *Shigella flexneri* Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis, *Jurnal Imiah Kefarmasian*, Vol. 2, No. 1, 2012: 1-16.
- Zainab, 2013, Pengaruh Konsentrasi Etanol sebagai Pelarut Pengekstraksi terhadap Kadar Naftokinon dalam Ekstrak Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis* L.), *Pharmacia*, Vol.3, No.2: 63-68.