

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN GAHARU
(*Aquilaria microcarpa* Baill.) TERHADAP BAKTERI *Salmonella typhi* dan
Bacillus subtilis SECARA IN VITRO**

Rafika Sari*, Frans Kristian, Inarah Fajriaty
Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura

*Email : rafikasari@pharm.untan.ac.id

ABSTRAK

Infeksi yang disebabkan oleh mikroba patogen seperti *Salmonella typhi* dan *Bacillus subtilis* menyebabkan terjadinya infeksi pencernaan, sehingga memicu peneliti untuk menemukan bahan yang berpotensi sebagai antibakteri dengan menggunakan daun gaharu (*Aquilaria microcarpa* Baill.). Tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Bacillus subtilis* dari ekstrak etanol daun gaharu. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dan uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi (Kirby-Bauer). Hasil penelitian pada ekstrak etanol daun gaharu memiliki metabolit sekunder berupa fenol, flavonoid, saponin, tanin dan steroid. Hasil kadar sari larut air yang didapat $21,80 \pm 1,77\%$; kadar sari larut etanol $22,86 \pm 2,78\%$. Susut pengeringan $26,25 \pm 1,03\%$. Bobot jenis 1% ekstrak etanol 1,0120g/ml. Berdasarkan hasil penelitian didapat bahwa ekstrak etanol daun gaharu memiliki aktivitas antibakteri dengan konsentrasi ekstrak 300mg/ml, 400mg/ml, 500mg/ml terhadap *Salmonella typhi* dengan diameter rata-rata zona hambat $11,74 \pm 0,44$ mm, $13,55 \pm 0,29$ mm, $14,69 \pm 0,67$ mm dan *Bacillus subtilis* dengan diameter rata-rata zona hambat $10,29 \pm 0,16$ mm, $12,23 \pm 0,21$ mm, $13,50 \pm 0,66$ mm. Konsentrasi 500mg/ml memiliki aktivitas antibakteri paling baik daripada konsentrasi 300mg/ml dan 400mg/ml.

Kata Kunci : Daun gaharu, antibakteri, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, difusi agar

ABSTRACT

Infections caused by pathogens such as salmonella typhi and Bacillus subtilis causes gastrointestinal infections and lead researchers to find a material that has potential as an antibacterial that has optimal efficacy by using the leaves of agarwood (Aquilaria microcarpa Baill.). The purpose of this study was to determine the compound class of secondary metabolites and antibacterial activity against salmonella typhi and bacillus subtilis of ethanol extract of agarwood leaves. The method used in the maceration and antibacterial activity test was diffusion method (Kirby-Bauer). Result are the ethanol extract of the agarwood leaves contain the compound flavonoids, saponins, tannins, steroids, and the solubility extract in water and ethanol are $21,80 \pm 1,77\%$ and $22,86 \pm 2,78\%$. Shrinkage drying $26,25 \pm 1,03\%$. Specific gravity 1% ethanol extract 1,0120mg/ml.

Based on the research results antibacterial activity with the concentration of extract 300mg/ml, 400mg/ml, 500mg/ml toward salmonella typhi with an average diameter of inhibition zone $11,74 \pm 0,44$ mm, $13,55 \pm 0,30$ mm, $14,69 \pm 0,67$ mm and Bacillus subtilis with an average diameter of inhibition zone $10,29 \pm 0,16$ mm, $12,23 \pm 0,21$ mm, $13,56 \pm 0,66$ mm. The conclusion is 500mg/ml concentration had a better antibacterial activity.

Key words: *Aquilaria microcarpa* Baill Leaf; Antimicrobial; *Bacillus subtilis*; *Salmonella typhi*, diffusion methods

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan penyebab utama tingginya angka kesakitan dan angka kematian, terutama pada negara berkembang seperti Indonesia (Darmadi, 2008). Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan karena adanya mikroba patogen yang menginfeksi tubuh, salah satu agen penginfeksi penyakit adalah bakteri (Darmadi, 2008)(Radji, 2011). Bakteri yang dapat menyebabkan terjadinya penyakit infeksi yaitu *Salmonella typhi* dan *Bacillus subtilis* (Irianto, 2014) (Costantin *et al.*, 2009).

Salmonella typhi merupakan bakteri yang bersifat patogen serta menimbulkan infeksi pada saluran pencernaan khususnya di usus halus, yang diperantarai melalui lingkungan dan makanan yang kurang bersih (Osman & Mulyantari, 2014). Penyakit yang dapat disebabkan oleh infeksi *Salmonella typhi* adalah demam tifoid, gastroenteritis, diare (Irianto, 2014). Bakteri lainnya yang dapat menyebabkan penyakit infeksi adalah *Bacillus subtilis*, jumlahnya yang banyak didalam usus halus mampu menyebabkan terjadinya gangguan pencernaan yang ditularkan melalui kontaminasi makanan yang kurang bersih (Porotu'o *et al.*, 2015). Penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Bacillus subtilis* adalah gejala nyeri abdominal, mual, muntah, diare (Costantin *et al.*, 2009).

Permasalahan penyakit infeksi yang ditimbulkan oleh bakteri patogen, memicu untuk dilakukannya penelitian baru untuk menghasilkan bahan alternatif yang berpotensi sebagai antibakteri, serta memiliki efikasi yang optimal dalam mengobati penyakit yang diinfeksi oleh bakteri. Menurut data empiris daun gaharu (*Aquilaria spp*) dapat dijadikan teh untuk meredakan nyeri, pembengkakan gusi serta penggunaannya yang ditempelkan pada luka.

Hasil analisis senyawa fitokimia pada (*Aquilaria spp*) menunjukkan adanya metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, triterpenoid, saponin dan tanin pada ekstrak methanol (Khalilet al, 2013),serta pada skrining fitokimia daun gaharu dengan spesies *Aquilaria agallocha* yang dilakukan Dash, didapat metabolit sekunder seperti alkaloid, saponin, tanin, antrakuinon, glikosida dan triterpenoid(Dash et al., 2008).Penelitian lain tentang metabolit sekunder pada daun gaharu spesies *Aquilaria crassna* didapat hasil yaitu flavonoid, tanin, saponin, glikosida jantung, alkaloid(Kamonwannasitet al., 2013).Pada pengujian yang dilakukan Dash juga menunjukkan bahwa ekstrak daun gaharu berpotensi sebagai antibakteri (Dash et al., 2008).

Berdasarkan latar belakang diatas peneliti ingin menguji potensi daun gaharu dengan spesies (*Aquilaria microcarpa* Baill.) untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun gaharu secara in vitro dalam upaya pencarian bahan alternatif untuk pengendalian penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri, terutama oleh bakteri *Salmonella typhi* dan *Bacillus subtilis*.

METODE PENELITIAN

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *autoclave* (HL 36Ae), batang pengaduk, baskom (*Lion Star*), *Biological Safety Cabinet* (BSC)(ESCO class II type B2), blender (Toshiba), botol kaca, cawan penguap, cawan petri (Iwaki Pyrex), corong kaca (Iwaki Pyrex), *cover glass*, desikator, erlenmeyer 25 ml dan 50 ml (Iwaki Pyrex), gelas beaker (Iwaki Pyrex), gelas ukur 50 ml dan 10 ml (Iwaki Pyrex), *hot plate*, jangka sorong, jarum ose, kertas saring, *krusible porselen*, labu ukur 10 ml dan 25 ml (Iwaki Pyrex), *Laminar Air Flow* (LAF) *Cabinet*, lampu UV, lemari pendingin, maserator, mikropipet (Rainin E1019705K), *object glass*, oven (Mettler UP400), pembakar bunsen, pH meter (Hanna), pikometer (Iwaki Pyrex), pinset, pipet tetes, pipet volume 10 ml dan 25 ml (Iwaki Pyrex), sendok stainless, sendok tanduk, tabung reaksi (Iwaki Pyrex), timbangan analitik (Ohaus PA2102), toples kaca, *vacuum rotary evaporator* (Rotavapor II BUCHI), vial, dan *waterbath* (Mettler WNB 22).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun gaharu, akuades, metanol, alkohol 70%, *aluminium foil*, aluminium (III) klorida (AlCl_3), anisaldehyd, asam asetat, asam asetat anhidrat, asam formiat, asam klorida (HCl)(Merck), asam sulfat (H_2SO_4), benzena, besi (III) klorida (FeCl_3), daun gaharu, dietilamin, DMSO 15%, etanol 96%, etil asetat, formaldehid, kain kasa, kapas, kertas cakram, kertas merang, kloramfenikol, kloroform, larutan Mc. Farland, magnesium (Mg)(Merck), media *Muller Hinton Agar* (MHA), media *Nutrient Agar* (NA), metanol, n-butanol, n-heksan, natrium hidroksida (NaOH), natrium klorida (NaCl), pereaksi Dragendroff, pereaksi *Lieberman-Burchard*, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, plastik tahan panas (Wayang), silika gel F254, spiritus, toluen, vanilin, dan *wrapping plastic*. Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini antara lain koleksi kultur Laboratorium Biologi Badan Pengelola Fakultas Farmasi *Salmonella typhi* dan *Bacillus subtilis*, serta kontrol positif sebagai pembandingan Kloramfenikol 30 $\mu\text{g/ml}$.

Preparasi Sampel. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun gaharu (*Aquilaria microcarpa* Baill.). Sampel daun gaharu segar disortir basah, kemudian dibersihkan, dirajang, lalu dikeringkan dibawah sinar matahari secara tidak langsung sampai kering. Setelah itu dilakukan sortasi kering dan dihaluskan dengan cara diblender kemudian diayak dengan pengayak no. 40 hingga diperoleh serbuk halus yang homogen.

Ekstraksi. Simplisia daun gaharu diekstraksi dengan metode maserasi, dengan cara merendam serbuk daun gaharu dalam pelarut etanol selama 4 x 24 jam dengan pengadukan setiap 24 jam. Penggantian pelarut dilakukan setiap 24 jam kemudian dilakukan penyarian dengan kertas saring. Semua maserat dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Selanjutnya filtrat yang tersisa diuapkan menggunakan cawan penguap di dalam *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak kental yang diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung nilai rendemen.

Penetapan parameter-parameter standarisasi.

Parameter spesifik.

1. Penetapan organoleptik ekstrak, meliputi bentuk, warna, bau dan rasa.

2. Penetapan kadar senyawa terlarut dalam pelarut tertentu.

- a. Kadar senyawa yang larut dalam air. Sejumlah Sejumlah 1 gram ekstrak (WI) dimaserasi dengan 1ml kloroform dan 9 ml air selama 24 jam, menggunakan labu ukur sambal berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama. Kemudian didiamkan selama 18 jam dan disaring. Filtrat senyawa 5 ml diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara (W0) dengan cara didiamkan sampai pelarutnya menguap dan tersisa residunya, kemudian dipanaskan residu pada suhu 105°C hingga bobot tetap (W2)
- b. Kadar senyawa yang larut dalam etanol. Sejumlah 1 gram ekstrak dimaserasi dengan 10 ml etanol 96% selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama. Selanjutnya didiamkan selama 18 jam dan disaring cepat untuk menghindarkan penguapan etanol. Filtrat sebanyak 5 ml diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara dengan cara didiamkan sampai pelarutnya menguap dan tersisa residunya, kemudian dipanaskan residu pada suhu 105°C hingga diperoleh bobot tetap.

Parameter non spesifik

1. Susut pengeringan. Ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang, ekstrak diratakan dalam botol timbang, dengan menggoyangkan botol, hingga menggunakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm. Kemudian dimasukkan ke dalam oven, dibuka tutupnya, dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Botol dalam keadaan tertutup dibiarkan dalam desikator hingga suhu kamar.
2. Bobot jenis. Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak (5% dan 10%) dalam pelarut tertentu dengan alat piknometer. Gunakan

piknometer yang bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air. Ekstrak cair sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam piknometer. Kemudian timbang piknometer yang berisi ekstrak cair. Kurang bobot piknometer kosong dari bobot piknometer yang telah diisi ekstrak cair. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air.

Skrining Fitokimia Ekstrak. Uji fitokimia dilakukan untuk menentukan komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak etanol daun gaharu. Uji fitokimia yang dilakukan terdiri dari uji alkaloid, flavonoid, terpen/steroid, tanin, saponin, fenolik dan antrakuinon.

Profil KLT Ekstrak. Pengujian golongan senyawa dapat dilakukan dengan Uji KLT menggunakan plat silica gel F₂₅₄. Sampel ditotolkan pada plat kemudian dielusi dengan larutan pengembang, lalu disemprotkan dengan reagen spesifik. Bercak diamati pada cahaya tampak, UV₂₅₄ dan UV₃₆₆ nm. Uji KLT dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa meliputi flavonoid, fenol.

1. Senyawa Flavonoid. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan fase gerak n-butanol: asam asetat: air (4:1:5). Ekstrak mengandung flavonoid bebas bila dilihat dibawah sinar UV₃₆₆ nm berfluoresensi hijau/ berwarna biru atau kuning. Penampakan bercak berupa pereaksi semprot dapat digunakan AlCl₃ 10% dalam etanol terdapat warna kuning.
2. Senyawa Fenolik. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan fase gerak n-butanol: asam asetat: air (4:1:5). Ekstrak mengandung fenol bebas bila dilihat dibawah sinar UV₃₆₆ nm berfluoresensi hijau. Penampak bercak berupa pereaksi semprot dapat digunakan FeCl₃ 10% dalam etanol terdapat warna ungu.

Persiapan dan Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram (Test Kirby-Bauer). Tahapan persiapan meliputi peremajaan bakteri, pembuatan suspensi bakteri, pembuatan cakram kertas, persiapan kontrol negative, persiapan kontrol positif, dan pembuatan seri konsentrasi yaitu 300mg/ml, 400mg/ml dan 500mg/ml. Tahapan awal dari uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram

(tes Kirby-Bauer) permukaan media agar diinokulasikan bakteri uji dengan mengulaskan suspensi bakteri menggunakan kapas yang telah disterilkan di seluruh permukaan media.

Tahapan berikut yaitu cakram kertas yang berukuran 6 mm ditempatkan diatas permukaan media sesuai dengan posisi yang diinginkan kemudian ditetaskan ekstrak etanol daun gaharu dengan variasi konsentrasi masing-masing sebanyak 20µl. Kontrol positif yang digunakan adalah kloramfenikol 30µg/ml, kemudian control negatif yang digunakan adalah DMSO 20% yang ditetaskan 20µl di atas cakram kertas. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian diamati zona hambat yang terbentuk yang diinterpretasikan yang melihat daerah bening disekitar cakram yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini menggunakan sampel daun gaharu diperoleh dari daerah kawasan Jalan Ahmad Yani 3, Kecamatan Sungai Raya, Kabupaten Kubu Raya, Kalimantan Barat. Daun gaharu yang diambil warnanya hijau tua mengkilat, tidak berwarna kuning atau kecoklatan dan tidak rusak. Proses sortasi basah dilakukan untuk memisahkan daun gaharu yang rusak. Selanjutnya dilakukan proses pencucian dengan menggunakan air mengalir untuk membersihkan kotoran yang melekat. Sampel kemudian dikeringkan di udara terbuka dan tidak terkena cahaya matahari langsung. Selanjutnya dilakukan proses perajangan yang bertujuan untuk memperluas permukaan sampel sehingga lebih mudah untuk dikeringkan. Sampel yang telah diblender kemudian disimpan dalam wadah kedap agar tidak terjadi proses oksidasi.

Ekstraksi daun gaharu dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Metode maserasi dipilih karena dapat mengekstrak senyawa dengan baik dan dapat menghindari kerusakan komponen senyawa yang tidak tahan panas. Prinsip ekstraksi maserasi adalah pengikatan/ pelarutan zat aktif berdasarkan sifat kelarutannya dalam suatu pelarut. Pelarut akan masuk kedalam sel tumbuhan, sehingga isi sel akan larut dalam pelarut karena adanya perbedaan konsentrasi

antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Apabila telah terjadi keseimbangan konsentrasi di dalam dan di luar sel, maka proses ekstraksi akan berhenti. Pengadukan selama maserasi perlu dilakukan untuk meratakan konsentrasi larutan diluar serbuk simplisia, sehingga dengan pengadukan tersebut tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil kecilnya antara larutan didalam sel dengan larutan diluar sel.

Ekstrak etanol yang didapat setelah proses maserasi adalah sebanyak 25,27 g dengan nilai rendemen sebesar 29,86%. Nilai rendemen menunjukkan seberapa besar jumlah kandungan yang dapat terekstraksi oleh pelarut dalam persen (%). Setelah didapat ekstrak kental dilakukan penetapan standar mutu dan kandungan kimia ekstrak. Persyaratan mutu ekstrak meliputi parameter standar umum dan parameter standar spesifik yang dimaksudkan untuk menjamin produk ekstrak.

Tabel 1. Hasil Pengolahan Sampel dan Ekstraksi Daun Gaharu

Parameter	Hasil
Serbuk Simplisia (gram)	84,62
Etanol 96% (Liter)	3,5
Berat Ekstrak Kental (gram)	25,27
Warna Ekstrak Kental	Coklat Kehitaman
Rendemen (%)	29,86

Pada pemeriksaan organoleptik ekstrak meliputi bentuk, warna, bau dan rasa. Hasil pengamatan didapat bahwa ekstrak berkonsistensi kental, berwarna hijau tua, berbau khas dan berasa pahit. Penentuan organoleptik salah satu parameter spesifik yang ditentukan dengan menggunakan panca indera dan bertujuan untuk pengenalan awal secara sederhana dan subjektif.

Prinsip penetapan kadar sari larut dalam pelarut tertentu, yaitu dengan melarutkan sejumlah simplisia pada pelarut tertentu, untuk menentukan sejumlah senyawa aktif yang terkandung pada pelarut tersebut. Selain itu metode penentuan kadar sari digunakan untuk menentukan jumlah senyawa aktif yang terekstraksi dalam pelarut dari sejumlah simplisia. Penentuan kadar sari larut juga dilakukan untuk melihat hasil dari ekstraksi, sehingga dapat terlihat pelarut yang cocok untuk mengekstraksi senyawa tertentu (Arifin *et al.*, 2006). Hasil penelitian didapatkan

hasil persentase kadar sari larut air sebesar $21,80 \pm 1,77\%$ dan kadar sari larut etanol sebesar $22,86 \pm 2,78\%$. Kadar sari larut etanol yang didapat lebih besar dibandingkan dengan kadar sari larut air.

Tabel 2. Hasil Penetapan Parameter Spesifik dan Non Spesifik Ekstrak Etanol Daun Gaharu

Parameter	Hasil
Organoleptik	Berbentuk kental, warna coklat kehitaman, bau khas, rasa pahit
Kadar Sari Larut Air (%b/b)	$21,80 \pm 1,77$
Kadar Sari Larut Etanol	$22,86 \pm 2,78$
Susut Pengerinan (%b/b)	$26,25 \pm 1,03$
Bobot Jenis 1% ekstrak etanol (g/ml)	1,0120

Susut pengeringan bertujuan untuk mengetahui persentase senyawa yang menghilang selama proses pemanasan. Metode yang digunakan untuk menetapkan susut pengeringan yaitu metode gravimetri. Susut pengeringan juga dapat menggambarkan jumlah persentase kadar air pada ekstrak daun gaharu. Dari hasil yang didapat, ekstrak daun gaharu termasuk dalam golongan ekstrak kental. Kriteria kadar air yang diperbolehkan untuk ekstrak kental 5-30%. Sementara untuk ekstrak kering <5% dan untuk ekstrak cair >30%. Penentuan susut pengeringan atau kadar air juga terkait dengan kemurnian ekstrak. Semakin sedikit kadar air pada ekstrak maka semakin sedikit kemungkinan ekstrak terkontaminasi oleh pertumbuhan bakteri (Haryani *et al.*, 2013).

Bobot jenis bertujuan dilakukan untuk menentukan berat jenis dari ekstrak dan menjadi acuan konversi dosis untuk penelitian-penelitian selanjutnya. Metode penetapan bobot jenis menggunakan piknometer, dengan hasil yang didapat yaitu bobot jenis sample 1% ekstrak etanol daun gaharu adalah sebesar 1,0120 g/ml. Bobot jenis ekstrak terkait dengan kemurnian dan kontaminasi ekstrak. Dari hasil yang diperoleh bobot jenis ekstrak etanol daun gaharu > 1 maka kontaminasi kecil, karena ekstrak berupa kering yang sedikit mengandung air (Haryani *et al.*, 2013).

Hasil uji skrining fitokimia pada ekstrak etanol daun gaharu didapat bahwa metabolit sekunder pada daun gaharu berupa fenolik, flavonoid, saponin, steroid dan tanin. Kromatografi lapis tipis pada penelitian ini, dilakukan pada senyawa flavonoid dan fenolik yang diduga memiliki potensi terhadap aktivitas sebagai

antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Bacillus subtilis*. Kromatografi lapis tipis digunakan untuk menegaskan keberadaan senyawa yang diperkirakan terdapat dalam ekstrak. Eluen yang digunakan pada penelitian ini adalah campuran butanol, aquadest, asam asetat dengan perbandingan 4:5:1. Selanjutnya dilakukan pengamatan menggunakan sinar UV 254nm dan 366nm. Pada UV 254 lempeng akan berflouresensi sedangkan sampel akan tampak berwarna gelap, sedangkan pada UV 366 nm noda yang akan berflouresensi dan lempeng tampak berwarna gelap. Dilanjutkan dengan penyemprotan menggunakan $AlCl_3$ 10% dalam etanol untuk mendeteksi senyawa flavonoid dan $FeCl_3$ 10% dalam etanol untuk mendeteksi senyawa fenol untuk eluen campuran butanol, aquadest dan asam asetat dengan perbandingan 4:5:1.

Tabel 3. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gaharu

Senyawa	Hasil
Alkaloid	-
Fenolik	+
Flavonoid	+
Saponin	+
Terpenoid/Steroid	+
Antrakuinon	-
Tanin	+

Keterangan: (+) : Terdeteksi

(-) : Tidak terdeteksi

Uji pendahuluan aktivitas antibakteri dilakukan dengan ekstrak etanol daun gaharu untuk mengetahui bahwa ekstrak etanol daun gaharu memiliki aktivitas antibakteri, serta untuk mengetahui konsentrasi yang dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri yang digunakan untuk menjadi acuan variasi konsentrasi ekstrak untuk dilakukan pengujian. Uji pendahuluan dilakukan pada bakteri *Salmonella typhi* yang mewakili Gram negatif dan *Bacillus subtilis* yang mewakili Gram positif.

Uji pendahuluan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun gaharu dilakukan dengan membuat variasi seri konsentrasi 25, 50, 100, 200, 250, 300 mg/ml. Pada uji pendahuluan dengan variasi konsentrasi 25, 50, 100, 200, 250 mg/ml tidak

ditemukan adanya zona hambat yang terbentuk. Zona hambat mulai terbentuk yaitu pada konsentrasi 300 mg/ml, sehingga peneliti memulai uji aktivitas antibakteri dengan variasi konsentrasi ekstrak 300, 400, 500 mg/ml.

Ekstrak etanol daun gaharu memiliki aktivitas antibakteri dengan menunjukkan zona hambat terhadap *Salmonella typhi* pada konsentrasi 300 mg/ml; 400 mg/ml; 500 mg/ml. Hasil menunjukkan rata-rata zona hambat pada *Salmonella typhi* konsentrasi 300mg/ml sebesar $11,74 \pm 0,44$ mm; 400mg/ml sebesar $13,55 \pm 0,30$ mm; 500mg/ml sebesar $14,69 \pm 0,67$ mm; kloramfenikol sebagai kontrol positif sebesar $20,42 \pm 0,23$ mm; DMSO 20% sebagai kontrol negatif tidak memiliki zona hambat. Zona hambat yang terbentuk semakin besar seiring dengan meningkatnya konsentrasi, sehingga dapat diasumsikan bahwa adanya hubungan yang berbanding lurus antara meningkatnya konsentrasi ekstrak dengan semakin besarnya zona hambat yang terbentuk. Hal ini berkaitan dengan konsentrasi senyawa yang terlarut pada ekstrak, sehingga meningkatnya konsentrasi ekstrak berarti konsentrasi senyawa kimia yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri juga meningkat.

Pada ekstrak etanol daun gaharu yang memberikan rata-rata zona hambat terhadap *Bacillus subtilis* pada konsentrasi 300 mg/ml sebesar $10,32 \pm 0,13$ mm; 400 mg/ml sebesar $12,23 \pm 0,21$ mm; 500 mg/ml sebesar $13,59 \pm 0,53$ mm; kloramfenikol sebagai kontrol positif sebesar $20,38 \pm 0,17$ mm; DMSO 20% sebagai kontrol negatif tidak memiliki zona hambat. Berdasarkan hasil uji aktivitas ekstrak etanol daun gaharu terhadap *Bacillus subtilis* yang menunjukkan terbentuknya zona hambat dengan konsentrasi ekstrak 300 mg/ml; 400 mg/ml; 500 mg/ml. Zona hambat yang terbentuk semakin besar disertai dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak, sehingga adanya hubungan yang berbanding lurus antara meningkatnya konsentrasi ekstrak dengan besarnya zona hambat yang terbentuk. Hal ini berkaitan dengan konsentrasi senyawa yang terlarut pada ekstrak, sehingga meningkatnya konsentrasi ekstrak berarti konsentrasi senyawa kimia yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri juga meningkat.

Hasil pengujian yang didapat menunjukkan adanya perbedaan besar zona hambat yang dihasilkan terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Bacillus subtilis*, dimana pada *Salmonella typhi* memiliki zona hambat yang lebih besar dibandingkan *Bacillus subtilis* dengan menggunakan konsentrasi ekstrak yang sama. Perbedaan dari besar zona hambat yang didapat karena adanya perbedaan Gram pada bakteri tersebut. Bakteri Gram negatif dan Gram positif memiliki perbedaan pada struktur dinding selnya, yaitu dinding sel bakteri Gram negatif lebih tipis dibandingkan dengan bakteri Gram positif. Dinding sel bakteri Gram positif tersusun dari peptidoglikan yang tebal. Komponen ini memberikan kekuatan yang diperlukan untuk mempertahankan keutuhan sel (Tortora *et al.*, 2007). Peptidoglikan pada bakteri Gram positif lebih tebal dibanding bakteri gram negatif (Madigan *et al.*, 2009). Karena hanya mengandung sedikit lapisan peptidoglikan, dinding sel bakteri Gram negatif umumnya lebih rentan terhadap guncangan fisik (Radji, 2011). Struktur dinding sel inilah yang menyebabkan perbedaan besar diameter zona hambat pada *Salmonella typhi* dan *Bacillus subtilis*.

Tabel 4. Hasil Diameter Zona Hambat *Salmonella typhi*

Bakteri Uji	Konsentrasi (mg/ml)	Zona Hambat (mm)			Mean ± SD
		I	II	III	
<i>Salmonella typhi</i>	300	11,45	11,52	12,25	11,74 ± 0,44* [#]
	400	13,27	13,52	13,86	13,55 ± 0,30* [#]
	500	14,17	14,45	15,45	14,69 ± 0,67* [#]
	Kloramfenikol 30µg/ml	20,18	20,45	20,64	20,42 ± 0,23*
	DMSO 20%	0	0	0	0 [#]

Keterangan : * = Berberda signifikan dengan kontrol negatif

= Berberda signifikan dengan kontrol positif

Tabel 5. Hasil Diameter Zona Hambat *Bacillus subtilis*

Bakteri Uji	Konsentrasi (mg/ml)	Zona Hambat (mm)			Mean ± SD
		I	II	III	
<i>Bacillus subtilis</i>	300	10,13	10,30	10,45	10,29 ± 0,16* [#]
	400	12,10	12,12	12,48	12,23 ± 0,21* [#]
	500	13,12	13,30	14,27	13,56 ± 0,66* [#]
	Kloramfenikol 30µg/ml	20,57	20,35	20,23	20,38 ± 0,17*
	DMSO 20%	0	0	0	0 [#]

Keterangan : * = Berberda signifikan dengan kontrol negatif

= Berberda signifikan dengan kontrol positif

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun gaharu mengandung fenol, flavonoid, tanin, saponin. Golongan senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun gaharu mengandung senyawa epigalokatekin galat, epikatekin, genkwanin, luteolin dan mangiferin yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Tay *et al.*, 2014) (Ray, 2014) (Hara, 2016) (Mufida, 2016).

Epigalokatekin galat, genkwanin memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme kerja menghambat sintesis asam nukleat. Penghambatan ini disebabkan karena cincin B dari senyawa epigalokatekin galat dan genkwanin berinteraksi dengan membentuk ikatan interkalasi dan ikatan hidrogen dengan susunan basis dari asam nukleat yang menyebabkan terhambatnya sintesis DNA dan RNA pada bakteri. Mekanisme penghambatan pada beberapa bakteri menunjukkan adanya penghambatan terhadap DNA gyrase dan enzim ATPase (Cushine & Lamb, 2005). Mekanisme senyawa epikatekin dan mangiferin yang dapat menghambat fungsi membran sitoplasma bakteri. Senyawa ini dapat menyebabkan kebocoran membran karena dapat mengganggu *lipid bilayers* dengan langsung menembus membran bakteri dan menyebabkan fusi membran (Cushine & Lamb, 2005). Senyawa luteolin juga memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan mekanisme mengganggu permeabilitas membran dan sintesis ATPase yang menurunkan kadar ATP sehingga mengganggu elektrokimia gradien proton dilingkungan bakteri untuk menghambat dari ATPase dan mengganggu permeabilitas membran (Joung *et al.*, 2016). Golongan senyawa tanin yang terkandung dalam daun gaharu mengandung senyawa syringaresinol yang memiliki aktivitas antibakteri dengan cara mengganggu motilitas koloni bakteri karena adanya penghambatan rabeprazole dan derivat tioeter pada motilitas yang menyebabkan infeksi (Miyazawa *et al.*, 2006).

Golongan senyawa steroid yang terdapat pada daun gaharu mengandung senyawa betasitosterol yang memiliki aktivitas antibakteri. Betasitosterol menghambat permukaan sel bakteri protein sortase sehingga mencegah transpeptidasi. Betasitosterol-3-O-glukopiranosida (BSG) yang merupakan turunan dari betasitosterol yang menghambat adhesi sel bakteri ke fibronectin (Sayeed *et al.*, 2016).

Hasil zona hambat ekstrak etanol daun gaharu pada bakteri *Salmonella typhi* dan *Bacillus subtilis* di dapat adanya perbedaan signifikan antara konsentrasi 300mg/ml; 400 mg/ml; 500 mg/ml dan kontrol positif terhadap kontrol negatif. Perbedaan signifikan juga terjadi antara konsentrasi 300 mg/ml terhadap konsentrasi 400 mg/ml; 500 mg/ml dan kontrol positif yang menyatakan zona hambat pada konsentrasi 300 mg/ml lebih kecil dari pada konsentrasi lainnya. Pada konsentrasi 400 mg/ml di dapat juga adanya perbedaan signifikan terhadap konsentrasi 300 mg/ml; 500 mg/ml dan kontrol positif dimana konsentrasi 400 mg/ml lebih baik dibandingkan konsentrasi 300 mg/ml tetapi lebih kecil zona hambatnya terhadap konsentrasi 500 mg/ml dan kontrol positif. Pada konsentrasi 500 mg/ml memiliki perbedaan signifikan terhadap konsentrasi 300 mg/ml; 400 mg/ml; dan kontrol positif dimana konsentrasi 500 mg/ml memiliki zona hambat yang lebih besar dibandingkan konsentrasi ekstrak 400 mg/ml dan 300 mg/ml, tetapi untuk perbandingan dengan kontrol positif lebih kecil zona hambatnya.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun gaharu memiliki metabolit sekunder fenol, flavonoid, saponin, tanin dan steroid. Penetapan parameter standarisasi ekstrak seperti kadar sari larut air yang didapat $21,80 \pm 1,77\%$; kadar sari larut etanol $22,86 \pm 2,78\%$. Susut pengeringan $26,25 \pm 1,03\%$. Bobot jenis 1% ekstrak etanol 1,0120 g/ml. Ekstrak etanol daun gaharu memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Bacillus subtilis* dengan konsentrasi ekstrak 300 mg/ml, 400 mg/ml, 500 mg/ml. Konsentrasi 500 mg/ml memiliki aktivitas antibakteri yang paling baik dibandingkan dengan konsentrasi 300mg/ml; 400mg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Costantin CA, Mikkola R, Andersson MA, Teplova V, Suominen I, Johansson T, Salonen MS. *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin. *Journal of Applied Microbiology*. 2009; Original Article: 1364-5072.
- Cushine T, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005; 26: 343-356.

- Darmadi. Infeksi Nosokomial; Problematika dan Pengendaliannya. Jakarta: Salemba Medika; 2008.
- Dash M, Patra J K, Panda P P. Phytochemical and antimicrobial screening of extracts of *Aquilaria agallocha* Roxb. African Journal of Biotechnology. 2008; 7(20): 3531-3534.
- Hara H, Ise Y, Morimoto N, Shimazawa M, Ichihashi K, Ohiyama M, Inuma M. Laxative Effect of Agarwood Leaves and Its Mechanism. JSBA. 2016; 72(2): 335-345.
- Haryani Y, Muthmainah S, Sikumbang S. Uji Parameter Non Spesifik dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). J. penelitian Farmasi Indonesi. 2013; 1(2); 43-46.
- Irianto K. Epidemiologi Penyakit Menular dan Tidak Menular. Bandung: Penerbit Alfabeta; 2014.
- Joung DK, Lee YS, Han SH, Lee SW et al. Potentiating activity of luteolin on membrane permeabilizing agent and ATPase inhibitor against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pacific Journal of Tropical Medicine. 2016; 9(1): 19-22.
- Kamonwannasit S, Nantapong N, Kumkrai P, Luecha P, Kupittyanant S, Chudapongse N. Antibacterial activity of *Aquilaria crassna* leaf extract against *Staphylococcus epidermidis* by disruption of cell wall. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2013; 12(20): 4-7.
- Khalil A S, Rahim A A, Taha K K, Abdallah K B. Characterization of Methanolic Extracts of Agarwood Leaves. Journal of Applied and Industrial Sciences. 2013; 1(3): 78-88.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap VP, Clark PD. Biology of Microorganisms, Edisi 12. Carbondale: Southern Illinois University; 2009.
- Miyazawa M, Utsunomiya H, Inada KI, Yamada T, Okuno Y, Tanaka H, Tatematsu M. Inhibition of *Helicobacter pylori* Motility by (+)-Syringaresinol from Unripe Japanese Apricot. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29(1): 172-173.
- Mufida FS. Perbandingan Metode Ekstraksi Daun Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.) Secara Maserasi dan Infudasi Terhadap Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan. Skripsi. 2016.
- Osman ZI, Mulyantari Nk. Prevalensi Antibodi IgM Anti-Salmonella Pada Penderita di-Duga Demam Tifoid di Rumah Sakit Puri Bunda, Denpasar Bulan April-Oktober 2014. E-Jurnal Medika. 2014; 5(10): 2303-1395.
- Porotu'o AC, Buntuan V, Rares F. Identifikasi Bakteri Aerob Pada Makanan Jajanan Jagung Bakar di Pinggiran Jalan Ring Road Manado. Jurnal e-Biomedik. 2015; 3(1).
- Radji M. Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2011. 107-118.

- Ray G, Leelamanit W, Sithisarn P, Jiratchariyakull W. Antioxidative Compounds from *Aquilaria crassna* Leaf. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014; 41(4): 54-58.
- Sayed MSB, Karim SMR, Sharmin T, Morshed MM. Critical Analysis on Characterization, Systemic Effect, and Therapeutic Potential of Beta-Sitosterol: A Plant-Derived Orphan Phytosterol. MDPI. 2016; 1: 1-25.
- Tay PY, Tan CP, Abas F, Yim HS, Ho CW. Assessment of Extraction Parameters on Antioxidant Capacity, Polyphenol Content, Epigallocatechin Gallate (EGCG), Epicatechin Gallate (ECG) and Iriflophenone 3-C- β -Glucoside of Agarwood (*Aquilaria crassna*) Young Leaves. Molecules. 2014; 19: 12304-12319.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology. Edisi 9. San Fransisco: Pearson Education; 2007.