

**ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN PENENTUAN KADAR FLAVONOID  
TOTAL PADA ISOLAT HASIL KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI  
ETIL ASETAT RIMPANG JERINGAU (*Acorus calamus* L.)**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
FARIDATUL JANNAH  
NIM. 18630046**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2022**

**ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN PENENTUAN KADAR FLAVONOID  
TOTAL PADA ISOLAT HASIL KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI  
ETIL ASETAT RIMPANG JERINGAU (*Acorus calamus* L.)**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
FARIDATUL JANNAH  
NIM. 18630046**

**Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2022**

**ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN PENENTUAN KADAR FLAVONOID  
TOTAL PADA ISOLAT HASIL KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI  
ETIL ASETAT RIMPANG JERINGAU (*Acorus calamus* L.)**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
FARIDATUL JANNAH  
NIM. 18630046**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:  
Tanggal: 07 Agustus 2022**

**Pembimbing I**

**Suci Amalia, M.Sc  
NIP. 19821104 200901 2 007**

**Pembimbing II**

**Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P  
NIP. 19750410 200501 2 009**

**Mengetahui,  
Ketua Program Studi Kimia**

**Rachmawati Ningsih, M. Si  
NIP. 19810817 200801 2 010**

**ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN PENENTUAN KADAR FLAVONOID  
TOTAL PADA ISOLAT HASIL KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI  
ETIL ASETAT RIMPANG JERINGAU (*Acorus calamus* L.)**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
FARIDATUL JANNAH  
NIM. 18630046**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 13 September 2022**

<b>Ketua Penguji</b>	<b>: Diana Candra Dewi, M.Si NIP. 19770720 200312 2 001</b>	 (.....)
<b>Anggota Penguji I</b>	<b>: Susi Nurul Kholifah, M.Sc NIP. 19851020 201903 2 012</b>	 (.....)
<b>Anggota Penguji II</b>	<b>: Suci Amalia, M.Si NIP. 19821104 200901 2 007</b>	 (.....)
<b>Anggota Penguji III</b>	<b>: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P NIP. 19750410 200501 2 009</b>	 (.....)

**Mengetahui,  
Ketua Program Studi Kimia**



**Rachmawati Ningsih, M. Si  
NIP. 19810311 200801 2 010**



## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Faridatul Jannah

NIM : 18630046

Program Studi : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Isolasi, Identifikasi, dan Penentuan Kadar Flavonoid Total Pada Isolat Hasil Kromatografi Kolom Fraksi Etil Asetat Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 07 Agustus 2022

Yang membuat pernyataan,

A handwritten signature in black ink is written over a 10,000 Indonesian Rupiah banknote. The banknote is partially visible, showing the number '10000' and the text 'REPUBLIK INDONESIA' and 'MELAKSAKANKAN TEMPERA'. The signature is written in a cursive style.

Faridatul Jannah  
NIM. 18630046

## MOTTO

لَا يُكَلِّفُ اللَّهُ نَفْسًا إِلَّا وُسْعَهَا

*“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”*

Q.S al-Baqarah [2]:286



*“Lebih Baik Gagal Setelah Mencoba Daripada Gagal Untuk Mencoba”*

## HALAMAN PERSEMBAHAN

*Alhamdulillah wa syukurillah*, sujud syukur dan segala puji tiada henti kepada Allah SWT berkat kasih sayang dan ridha-Nya yang tak pernah habis dan terputus ini, saya dapat mewujudkan salah satu harapan diantara butiran-butiran harapan yang selalu saya panjatkan yaitu selesainya penyusunan skripsi ini dengan baik dan lancar. Skripsi ini saya persembahkan kepada:

Kedua orang tua saya, Bapak Suparto dan Ebok Niwati yang setiap waktu selalu memanjatkan doa terbaik untuk saya, memberikan kasih sayang dan dukungan yang luar biasa baik material dan non-material, serta memberikan motivasi yang sangat menyentuh dan membara, sehingga penelitian saya dapat terselesaikan dan terciptalah sebuah skripsi ini. Bapak, Ebok terima kasih banyak atas semua yang telah kalian usahakan, semoga kalian diberi kesehatan dan umur panjang agar dapat menemani langkah kecil saya dan adek menuju pintu kesuksesan.

Bapak dan Ibu dosen serta seluruh laboran di Program Studi Kimia yang telah memberikan ilmu, wawasan, dan pengalaman selama masa studi saya. Khususnya kepada Ibu Suci Amalia M.Sc, Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P, Ibu Diana Candra Dewi, M.Si, Ibu Susi Nurul Kholifah M.Sc, dan Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, saya ucapkan banyak terima kasih telah memberikan banyak saran dan masukan hingga skripsi ini menjadi lebih baik dan sempurna. Semoga Ibu dan Bapak selalu diberikan kesehatan.

Diri sendiri yang telah berjuang sejauh ini, terima kasih sudah mampu berada di tahap ini, terima kasih sudah mampu melawan ego dan mood yang sangat labil selama proses penyusunan skripsi ini.

Laptop yang selalu menemani saya, terima kasih banyak atas kesabaran dan pengertiannya, sehingga jarang rewel dan sangat membantu dalam penyusunan skripsi ini.

Orang-orang baik yang Allah kirimkan untuk menemani perjuangan saya baik dalam perkuliahan maupun organisasi yakni seluruh teman-teman KRIPTON 2018, Kelas A 2018, Keluarga IMAN Malang Raya 2018, DPA Hwaiting, Ponpes syah-Nur, Ternak Lele, Montoq, Sahabat Kepompong, dan kakak tingkat angkatan 2015 – 2017, terima kasih untuk setiap doa terbaik, pelajaran, nasehat, motivasi, bantuan, semangat, kebersamaan, kasih sayang, dan dukungan yang sangat luar biasa. Terima kasih telah menjadi bagian dalam kehidupan saya di masa pahit manis bangku perkuliahan. Semoga Allah berkenan mempertemukan kita lagi di perlintasan kesuksesan masing-masing. Aamiin.

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Isolasi, Identifikasi, dan Penentuan Kadar Flavonoid Total Pada Isolat Hasil Kromatografi Kolom Fraksi Etil Asetat Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)”**. Shalawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah menerangi dunia dengan cahaya iman dan Islam. Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada pihak-pihak yang membantu proses penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih ini, penulis sampaikan kepada:

1. Kedua orang tua dan seluruh keluarga yang telah memberi doa, motivasi, dan dukungan baik secara material dan spiritual.
2. Ibu Suci Amalia, M. Sc dan Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P selaku dosen pembimbing kimia dan agama yang dengan sabar telah mengarahkan penulis hingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
3. Bapak A. Ghanaim Fasya, M. Si selaku dosen wali yang selalu memotivasi dan mengarahkan penulis hingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
4. Bapak Prof. Dr. Zainuddin, MA selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku Ketua Prodi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
7. Semua pihak yang ikut membantu, memberikan doa, dukungan, motivasi, dan semangat kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Penulis sangat terbuka dengan saran dan kritik yang bersifat membangun dari berbagai pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat menjadi sarana pembuka tabir ilmu pengetahuan baru, bermanfaat bagi kita semua dan untuk peradaban yang akan datang. Aamiin.

Malang, Agustus 2022

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>مستخلص البحث</b> .....	<b>xv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Batasan Masalah .....	7
1.5 Manfaat Penelitian .....	7
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>8</b>
2.1 Tumbuhan Jeringau ( <i>Acorus calamus</i> L.) .....	8
2.2 Senyawa Flavonoid .....	12
2.3 Metode Ekstraksi Sonikasi (Ultrasonik) .....	15
2.4 Hidrolisis dan Partisi .....	18
2.5 Kromatografi Kolom .....	22
2.6 Monitoring Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Analitik .....	24
2.7 Penentuan Kadar Flavonoid Pada Isolat Hasil Kromatografi Kolom .....	26
2.8 Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Spektrofotometer FTIR ....	28
2.9 Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Spektrofotometer UV-Vis .....	30
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	<b>32</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	32
3.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	32
3.2.1 Alat .....	32
3.2.2 Bahan .....	32
3.3 Rancangan Penelitian .....	33
3.4 Tahapan Penelitian .....	34
3.5 Cara Kerja .....	34
3.5.1 Preparasi Sampel Rimpang Jeringau ( <i>Acorus calamus</i> L.) .....	34
3.5.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri .....	35
3.5.3 Ekstraksi Ultrasonik Rimpang Jeringau ( <i>Acorus calamus</i> L.) .....	35
3.5.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Etanol 70% Rimpang Jeringau ( <i>Acorus calamus</i> L.) .....	36

3.5.5 Uji Fitokimia Rimpang Jeringau ( <i>Acorus calamus</i> L.) .....	37
3.5.6 Isolasi Flavonoid dengan Kromatografi Kolom Gradien Eluen .....	38
3.5.7 Isolasi Flavonoid dengan KLTA .....	40
3.5.8 Isolasi Flavonoid dengan Kromatografi Kolom Non Gradien Eluen .....	40
3.5.9 Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Spektrofotometer FTIR	41
3.5.10 Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Spektrofotometer UV-Vis .....	41
3.5.11 Penentuan Kadar Flavonoid Total Pada Isolat Hasil Kromatografi Kolom .....	42
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>44</b>
4.1 Preparasi dan Penentuan Kadar Air Sampel Rimpang Jeringau ( <i>Acorus calamus</i> L.) .....	44
4.2 Rendemen Rimpang Jeringau ( <i>Acorus calamus</i> L.) Hasil Ekstraksi dan Partisi .....	45
4.3 Uji Fitokimia Rimpang Jeringau ( <i>Acorus calamus</i> L.) .....	48
4.4 Isolasi Flavonoid dengan Kromatografi Kolom Gradien Eluen .....	57
4.5 Isolasi Flavonoid dengan KLTA .....	61
4.6 Isolasi Flavonoid dengan Kromatografi Kolom Non Gradien Eluen	63
4.7 Perbandingan Hasil Pemisahan Flavonoid Menggunakan Kromatografi Kolom Gradien Eluen dan Non Gradien Eluen .....	65
4.8 Identifikasi Isolat Flavonoid Hasil Kromatografi Kolom dengan FT-IR .....	67
4.9 Identifikasi Isolat Flavonoid Hasil Kromatografi Kolom dengan UV-Vis .....	71
4.10 Penetapan Kadar Flavonoid Total Pada Isolat Hasil Kromatografi Kolom .....	76
4.11 Kajian Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam .....	80
<b>BAB V PENUTUP .....</b>	<b>83</b>
5.1 Kesimpulan .....	83
5.2 Saran .....	84
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>85</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>104</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi <i>Acorus calamus</i> L. ....	9
Gambar 2.2 Struktur umum dari berbagai jenis flavonoid .....	13
Gambar 2.3 Reaksi senyawa flavonoid dengan HCl pekat dan logam Mg .....	14
Gambar 2.4 Proses terjadinya kavitas akustik .....	16
Gambar 2.5 Reaksi hidrolisis glikosida .....	19
Gambar 2.6 Reaksi netralisasi asam .....	20
Gambar 2.7 Reaksi senyawa flavonoid dengan NH <sub>3</sub> .....	26
Gambar 2.8 Pembentukan senyawa kompleks kuersetin dengan aluminium klorida .....	27
Gambar 2.9 Spektra IR senyawa flavonoid dari <i>Acorus calamus</i> L.) .....	30
Gambar 2.10 Spektrum serapan berbagai golongan flavonoid .....	31
Gambar 4.1 Ekstrak pekat etanol 70% rimpang Jeringau .....	46
Gambar 4.2 Pembentukan gas CO <sub>2</sub> pada reaksi hidrolisis .....	47
Gambar 4.3 Hasil uji fitokimia golongan flavonoid (a) ekstrak etanol 70%, (b) fraksi etil asetat .....	50
Gambar 4.4 Reaksi dugaan senyawa alkaloid dengan (a) reagen Dragendorff, (b) reagen Mayer .....	52
Gambar 4.5 Hasil uji fitokimia golongan alkaloid (a) ekstrak etanol 70%, (b) fraksi etil asetat .....	53
Gambar 4.6 Hasil uji fitokimia tanin (a) ekstrak etanol 70%, (b) fraksi etil asetat .....	53
Gambar 4.7 Reaksi dugaan senyawa tanin dengan FeCl <sub>3</sub> .....	54
Gambar 4.8 Hasil uji fitokimia saponin (a) ekstrak etanol 70%, (b) fraksi etil asetat .....	55
Gambar 4.9 Dugaan reaksi terpenoid dengan pereaksi <i>Liebermann-Burchard</i> .....	57
Gambar 4.10 Hasil uji fitokimia steroid dan terpenoid (a) ekstrak etanol 70%, (b) fraksi etil asetat .....	57
Gambar 4.11 Hasil monitoring KLTA isolat hasil kromatografi kolom gradien eluen (a) pengamatan secara langsung, (b) pengamatan di bawah UV 366 nm .....	59
Gambar 4.12 Hasil KLTA senyawa flavonoid dengan eluen (a) n-heksana:etil asetat (8:2), (b) n-heksana:etil asetat (7:3), (c) n-heksana:etil asetat (6:4), (d) n-heksana:etil asetat (4:6) .....	61
Gambar 4.13 Hasil monitoring KLTA isolat hasil kromatografi kolom non gradien eluen (a) pengamatan secara langsung, (b) pengamatan di bawah UV 366 nm .....	64
Gambar 4.14 Hasil spektra FTIR gabungan isolat hasil kromatografi kolom .....	70
Gambar 4.15 Hasil spektra UV-Vis isolat hasil kromatografi kolom .....	71
Gambar 4.16 Gugus benzoil dan sinamoil dari golongan flavonol .....	73
Gambar 4.17 Hasil spektra UV-Vis isolat + pereaksi geser .....	74
Gambar 4.18 Dugaan struktur flavonoid isolat berdasarkan pendekatan UV-Vis .....	76
Gambar 4.19 Hasil spektra UV-Vis kuersetin .....	78
Gambar L.4.1 Ilustrasi monitoring KLTA isolat hasil kromatografi kolom gradien eluen di bawah UV 366 nm .....	123
Gambar L.4.2 Ilustrasi monitoring KLTA isolat hasil kromatografi kolom non gradien eluen di bawah UV 366 nm .....	125

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Penelitian terdahulu terhadap aktivitas farmakologi rimpang Jeringau .....	11
Tabel 2.2 Penggunaan metode ultrasonik dalam ekstraksi senyawa flavonoid	17
Tabel 2.3 Penggunaan pelarut etanol dalam ekstraksi senyawa flavonoid .....	18
Tabel 2.4 Pelarut pada proses partisi senyawa flavonoid dari bahan alam .....	21
Tabel 2.5 Golongan senyawa flavonoid berdasarkan bercak noda pada KLT	25
Tabel 4.1 Rendemen hasil ekstraksi dan partisi rimpang Jeringau .....	48
Tabel 4.2 Hasil uji fitokimia rimpang Jeringau ( <i>Acorus calamus</i> L.) .....	48
Tabel 4.3 Hasil monitoring KLTA isolat hasil kromatografi kolom gradien eluen .....	60
Tabel 4.4 Dugaan senyawa flavonoid fraksi etil asetat dengan variasi eluen .	62
Tabel 4.5 Hasil monitoring KLTA isolat hasil kromatografi kolom non gradien eluen .....	64
Tabel 4.6 Interpretasi spektra FTIR isolat hasil kromatografi kolom .....	69
Tabel 4.7 Data identifikasi spektra UV-Vis pada isolat hasil kromatografi kolom .....	72
Tabel 4.8 Data identifikasi spektra UV-Vis pada isolat + pereaksi geser .....	74
Tabel 4.9 Absorbansi kurva larutan standar kuersetin .....	77
Tabel 4.10 Kadar flavonoid pada isolat hasil kromatografi kolom .....	78
Tabel L.4.1 Data berat cawan kosong .....	119
Tabel L.4.2 Data berat cawan + sampel .....	119
Tabel L.4.3 Data hasil ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% .....	120
Tabel L.4.4 Data hasil partisi menggunakan pelarut etil asetat .....	121
Tabel L.4.5 Hasil monitoring KLTA isolat kolom gradien eluen .....	123
Tabel L.4.6 Data rendemen hasil kromatografi kolom non gradien eluen .....	124
Tabel L.4.7 Rendemen dan nilai $R_f$ isolat hasil kromatografi kolom non gradien .....	126
Tabel L.4.8 Kadar flavonoid pada masing-masing isolat hasil kolom .....	128

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian .....	104
Lampiran 2 Diagram Alir .....	105
Lampiran 3 Perhitungan .....	114
Lampiran 4 Data Pengamatan dan Hasil Perhitungan .....	119
Lampiran 5 Data Instrumentasi FTIR .....	133
Lampiran 6 Data Instrumentasi UV-Vis .....	136
Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian .....	149

## ABSTRAK

Jannah, F. 2022. **Isolasi, Identifikasi, dan Penentuan Kadar Flavonoid Total Pada Isolat Hasil Kromatografi Kolom Fraksi Etil Asetat Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.).** *Skripsi*. Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Suci Amalia, M.Sc; Pembimbing II: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P

---

**Kata Kunci:** *Acorus calamus* L., Flavonoid, Sonikasi, Kromatografi Kolom, Kadar Flavonoid Total

*Acorus calamus* L. merupakan anggota famili *Acoraceae* yang bagian rimpangnya sering diaplikasikan sebagai obat tradisional. Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) mengandung beberapa senyawa aktif, salah satunya adalah senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid telah banyak diteliti sebagai senyawa yang memiliki aktivitas farmakologi melimpah. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kadar flavonoid total dan hasil identifikasi senyawa flavonoid yang terkandung dalam fraksi etil asetat rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.).

Isolasi senyawa flavonoid dalam rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) dilakukan dengan ekstraksi sonikasi menggunakan pelarut etanol 70%. Maserat dihidrolisis dan dipartisi menggunakan etil asetat. Selanjutnya, dilakukan uji fitokimia dan pemisahan senyawa flavonoid menggunakan metode kromatografi kolom dengan eluen terbaik hasil KLTA. Hasil pemisahan diidentifikasi menggunakan KLTA, FTIR, UV-Vis yang diperkuat dengan pereaksi geser, dan diuji kadar flavonoid menggunakan metode  $AlCl_3$ .

Ekstraksi dan partisi menghasilkan rendemen masing-masing sebesar 18,73% dan 10,80%. Uji fitokimia menunjukkan ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat positif mengandung senyawa flavonoid. Isolat hasil kromatografi kolom diduga positif mengandung senyawa flavonoid dengan adanya noda berwarna ungu. Hasil analisis FTIR menunjukkan adanya gugus fungsi O-H, C=O keton, C=C aromatik, C-OH fenol, C-O-C, C-O alkohol sekunder, dan =C-H alkena dengan hasil analisis UV-Vis menunjukkan adanya serapan pada daerah 257 nm (pita I) dan 374-377 nm (pita II) dengan pergeseran masing-masing sebesar 12 nm (pita I) dan 60-67 nm (pita II), sehingga diduga jenis flavonoid dalam isolat rimpang jeringau berupa 5,7,3',4'-Tetrahidroksi flavonol. Kadar flavonoid total yang terkandung dalam isolat rimpang Jeringau sebesar 32,9468 mg QE/g.

## ABSTRACT

Jannah, F. 2022. **Isolation, Identification, and Determination of Total Flavonoid Content in Isolate of Column Chromatography Result Ethyl Acetate Fraction of Jeringau Rhizome (*Acorus calamus* L.)**. Thesis. Chemistry Program Study, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Supervisor I: Suci Amalia, M.Sc; Supervisor II: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P

---

**Keyword:** *Acorus calamus* L., Flavonoids, Sonication, Column Chromatography, Total Flavonoid Content

*Acorus calamus* L. is a member of the *Acoraceae* family whose rhizome is often used as traditional medicine. Jeringau rhizome (*Acorus calamus* L.) contains several active compounds, one of which is flavonoid compounds. Flavonoid compounds have been widely studied as compounds that have abundant pharmacological activity. This study was conducted to determine the total flavonoid content and the identification of flavonoid compounds contained in the ethyl acetate fraction of Jeringau rhizome (*Acorus calamus* L.).

Isolation of flavonoid compounds in the rhizome of Jeringau (*Acorus calamus* L.) was carried out by sonication extraction using 70% ethanol as solvent. Maserate was hydrolyzed and partitioned using ethyl acetate. Furthermore, phytochemical tests were carried out and the separation of flavonoid compounds using column chromatography method with the best eluent from ATLC results. The results of the separation were identified using ATLC, FTIR, UV-Vis reinforced with shear reagent, and tested for flavonoid content using the  $AlCl_3$  method.

Extraction and partitioning resulted in yields of 18,73% and 10,80%, respectively. Phytochemical test showed that 70% ethanol extract and ethyl acetate fraction positively contained flavonoid compounds. The isolates from column chromatography were suspected to be positive for flavonoid compounds with a purple stain. The results of the FTIR analysis showed the presence of functional groups O-H, C=O ketones, C=C aromatics, C-OH phenol, C-O-C, C-O secondary alcohols, and =C-H alkenes with UV-Vis analysis results showing absorption in the 257 nm region (band I) and 374-377 nm (band II) with a shift of 12 nm (band I) and 60-67 nm (band II), so that the type of flavonoid in the jeringau rhizome isolate was 5,7,3',4' -Tetrahydroxy flavonols. The total flavonoid content contained in the Jeringau rhizome isolate was 32,9468 mg QE/g.

## مستخلص البحث

الجنة، فريدة 2022. عزل وتحديد وتحديد مستويات الفلافونويد الكلية في العزلات الناتجة عن كروماتوغرافيا عمود خلات الإيثيل جزء من جذمور جيرينغاو (*Acorus calamus L*) البحث العلمي. دراسة الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانغ. المشرف الأول: سوجي عملية، الماجستير، المشرف الثاني: الدكتور أعين الجنة الماجستير.

الكلمات المفتاحية : *Acorus calamus* ، فلافونويدات سونيكيشن، كروماتوغرافيا العمود، إجمالي مستويات الفلافونويد

(*Acorus calamus L*) هو عضو في عائلة *Acoraceae* التي غالبا ما يتم تطبيق جذورها كدواء تقليدي. يحتوي جذمور جيرينغاو (*Acorus calamus L*) على العديد من المركبات النشطة، أحدها مركب فلافونويد. تمت دراسة مركبات الفلافونويد على نطاق واسع كمركبات لها نشاط دوائي وفير. أجريت هذه الدراسة لتحديد مستويات الفلافونويد الكلية ونتائج تحديد مركبات الفلافونويد الموجودة في جزء خلات الإيثيل من جذمور جيرينغاو (*Acorus calamus L*).

تم عزل مركبات الفلافونويد في جذور جيرينغاو (*Acorus calamus L*) عن طريق استخراج الصوتنة باستخدام مذيب الإيثانول بنسبة 70%. يتم تحلل Maserate وتقسيمها باستخدام خلات الإيثيل. علاوة على ذلك ، تم إجراء الاختبارات الكيميائية النباتية وفصل مركبات الفلافونويد باستخدام طريقة كروماتوغرافيا العمود مع أفضل نتائج KLTA الرائعة. تم تحديد نتائج الفصل باستخدام FTIR و UV-Vis المعزز بكواشف القص ، واختبرت مستويات الفلافونويد باستخدام طريقة AICI<sup>3</sup>.

أدى الاستخراج والتقسيم إلى تعديلات بنسبة 18.73% و 10.80% على التوالي. أظهرت الاختبارات الكيميائية النباتية 70% من مستخلص الإيثانول وجزء إيجابي من خلات الإيثيل يحتوي على مركبات الفلافونويد. يشتهر في أن العزلات الناتجة عن كروماتوغرافيا العمود إيجابية لاحتوائها على مركبات الفلافونويد في وجود بقع أرجوانية. أظهرت نتائج تحليل FTIR وجود O-H و C = O ketone و C = C العطري و C-OH الفينول و C-O-C ، C-O مجموعات وظيفية ثانوية للكحول، و C-H alkenes مع نتائج تحليل UV-Vis تظهر الامتصاص في مناطق 257 نانومتر (النطاق الأول) و 374-377 نانومتر (النطاق الثاني) مع تحول 12 نانومتر (النطاق الأول) و 60-67 نانومتر (النطاق الثاني)، على التوالي، بحيث يشتهر في أن نوع الفلافونويد في عزلات جذمور جيرينغاو هو 5.7.3 ، على التوالي، 4- رباعي هيدروكسي فلافونول. كان إجمالي محتوى الفلافونويد الموجود في عزل جذمور جيرينغاو 32.9468 ملغ من التيسير الكمي / غرام.



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman hayati di Indonesia menempati posisi tertinggi kedua di dunia dengan 30.000 spesies tumbuhan (Salim & Munadi, 2017). Dewasa ini, sekitar 9.600 spesies tumbuhan yang ada diketahui berkhasiat sebagai obat dan 300 spesies diantaranya telah banyak diaplikasikan sebagai bahan obat tradisional (Fadlilaturrahmah *et al.*, 2020). Salah satu tumbuhan obat yang memiliki banyak khasiat adalah Jeringau (*Acorus calamus* L.) (Masduqi & Rahardhian, 2021).

Jeringau (*Acorus calamus* L.) merupakan anggota famili *Acoraceae* yang bagian rimpangnya sering diaplikasikan sebagai obat tradisional. Beberapa aktivitas farmakologi rimpang Jeringau diantaranya sebagai antikanker (Alaspure & Nagdeve, 2011), antidiabetes (Prisilla *et al.*, 2012) antioksidan (Parki *et al.*, 2017), antibakteri (Rita *et al.*, 2017), antifungi (Rita & Kawuri, 2017), dan antiinflamasi (Safrina & Susanti, 2018). Aktivitas farmakologi tersebut ditunjang dengan adanya beberapa kandungan senyawa aktif dalam rimpang Jeringau seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin, dan minyak atsiri (Sofyan *et al.*, 2017). Anisah *et al.* (2014) melakukan uji fitokimia pada rimpang Jeringau dan diperoleh hasil positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, dan polifenol. Masduqi & Rahardhian (2021) mengidentifikasi kandungan senyawa aktif pada rimpang Jeringau dan diperoleh hasil positif mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid.

Beragamnya kandungan senyawa aktif dalam rimpang Jeringau tersebut tidak sejalan dengan publikasi mengenai isolasi dan identifikasinya yang masih

sedikit. Atun (2014) menyatakan bahwa perlu dilakukan penelitian yang berkelanjutan terhadap senyawa aktif suatu tumbuhan, sehingga dapat diketahui spesifikasi manfaatnya terutama dalam bidang farmakologi. Hal tersebut dikuatkan oleh Haghghi *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa ekstrak rimpang Jeringau memiliki potensi sebagai antikanker yang diduga berasal dari kandungan metabolit sekunder di dalamnya, sehingga perlu dilakukan permurnian lebih lanjut untuk merumuskan spesifikasi peran senyawa metabolit sekunder dalam rimpang Jeringau pada bidang farmakologi. Barua *et al.* (2014) mengungkapkan bahwa senyawa flavonoid merupakan senyawa aktif dengan kadar tertinggi pada rimpang Jeringau. Flavonoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder golongan fenolik yang dapat ditemukan pada seluruh bagian tanaman seperti buah, tepung sari, dan akar. Beberapa penelitian menyatakan bahwa tanaman yang mengandung flavonoid mampu digunakan sebagai antikanker (Vijayalakshmi *et al.*, 2013), antivirus (Fan *et al.*, 2016), antibakteri (Nayaka *et al.*, 2014; Suteja *et al.*, 2016), antioksidan (Budiarti *et al.*, 2014; Dewi *et al.*, 2018), antistress (Tiwari *et al.*, 2015), antiinflamasi (Wang *et al.*, 2018), antidiabetes (Caglayan *et al.*, 2019), antifungi (Al Aboody & Mickymaray, 2020), antialergi (Escribano-Ferrer *et al.*, 2019; Hamada *et al.*, 2021), dan antiobesitas (Bian *et al.*, 2022).

Kandungan senyawa flavonoid yang tinggi dalam rimpang Jeringau, serta potensi senyawa flavonoid yang melimpah dalam bidang farmakologi, menjadi dasar pentingnya isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dalam rimpang Jeringau sebagai studi pendahuluan untuk eksplorasi lebih lanjut mengenai pemanfaatan senyawa flavonoid dalam rimpang Jeringau. Pemanfaatan senyawa flavonoid dalam rimpang Jeringau terutama pada bidang farmakologi merupakan

salah satu nikmat yang disediakan Allah SWT. Sebagaimana Allah SWT. berfirman dalam Surat asy-Syu'ara [62]: 7 sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (Q.S. asy-Syu'ara [62]: 7).

Berdasarkan penggalan ayat di atas, dapat dipahami bahwasannya Allah SWT. tidak menciptakan segala sesuatu dengan sia-sia. Salah satunya adalah penciptaan tumbuh-tumbuhan yang baik untuk dapat dimanfaatkan oleh manusia, (Istianah, 2015). Menurut Shihab (2002) dalam buku Tafsir Al-Misbah dijelaskan bahwa kata *إلى* di bagian awal ayat merupakan kata yang mengandung makna batas akhir, yang berarti bahwa manusia diharuskan untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya memandang sampai mencakup seluruh bumi, dengan aneka tanah dan tumbuhannya serta aneka keajaiban yang terdapat pada tumbuh-tumbuhannya. Dalam hal ini, manusia dapat memaksimalkan pemanfaatan rimpang Jeringau sebagai bahan obat alami dengan mengeksplor lebih lanjut kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam rimpang Jeringau, salah satunya adalah senyawa flavonoid.

Senyawa flavonoid dalam rimpang Jeringau dapat diperoleh melalui metode ekstraksi. Metode ekstraksi yang digunakan adalah sonikasi (ultrasonik). Metode ultrasonik dipilih karena merupakan metode yang efektif dan direkomendasikan untuk ekstraksi senyawa flavonoid dari bahan alam (Reddy *et al.*, 2020). Selain itu, metode ultrasonik mudah digunakan, hemat pelarut, waktu ekstraksi relatif cepat, dapat menghasilkan rendemen yang lebih besar (Handayani *et al.*, 2016),

serta dapat menghasilkan kadar flavonoid total lebih banyak dibandingkan dengan metode maserasi dan soxhletasi. Hikmawanti *et al.* (2021) menentukan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol daun katuk menggunakan metode ekstraksi maserasi, soxhletasi, dan ultasonik dengan perolehan total flavonoid tertinggi pada metode ultrasonik sebesar 12,05 mgQE/g.

Tingkat keberhasilan dari proses ekstraksi juga dipengaruhi oleh pelarut yang didasarkan *like dissolve like*. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 70%, karena mengandung air sebesar 30% sehingga dapat meningkatkan polaritas etanol. Masduqi & Rahardhian (2021) melakukan ekstraksi senyawa flavonoid dari rimpang Jeringau dengan pelarut etanol 50%, 70%, dan 96%, diperoleh kadar flavonoid total tertinggi pada konsentrasi etanol 70% sebesar  $7,20 \pm 0,01$  mg/g *Rutin Equivalent* (RE).

Hasil ekstraksi selanjutnya dipisahkan lebih spesifik untuk mengetahui golongan flavonoid yang terkandung dalam rimpang Jeringau melalui proses hidrolisis dan partisi. Hidrolisis dilakukan untuk memutuskan ikatan antara glikon dan aglikon yang terhubung pada ikatan glikosida (Fasya *et al.*, 2016). Partisi dilakukan untuk mengikat aglikon (metabolit sekunder) yang mempunyai kesamaan kepolaran dengan pelarut yang digunakan. Partisi dilakukan menggunakan pelarut etil asetat, karena beberapa jenis flavonoid seperti isoflavan, flavanon, flavon, dan flavanol bersifat semi polar, sehingga cenderung larut dalam pelarut semi polar seperti etil asetat (Muhridja *et al.*, 2016). Rusdi *et al.* (2018) melakukan partisi pada ekstrak etanol 70% menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan air. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa flavonoid.

Senyawa flavonoid yang terkandung dalam fraksi etil asetat rimpang Jeringau dipisahkan lebih lanjut berdasarkan tingkat kepolarannya menggunakan kromatografi kolom gradien eluen dan non gradien eluen untuk menentukan metode terbaik yang dapat memisahkan senyawa flavonoid secara maksimal, sehingga diharapkan dapat diperoleh senyawa yang lebih murni dalam jumlah cukup banyak. Kemudian, hasil pemisahan dimonitoring dengan KLT analitik untuk mengetahui tingkat kemurnian isolat yang diperoleh.

Tahap selanjutnya adalah dilakukan penetapan kadar flavonoid total pada isolat hasil kromatografi kolom untuk mengetahui banyaknya kadar flavonoid yang terkandung dalam isolat rimpang Jeringau. Metode yang digunakan adalah metode pembentukan senyawa kompleks aluminium klorida (Rosita *et al.*, 2017), yang dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Khoirunnisa *et al.* (2019) menentukan kadar flavonoid total pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau menggunakan metode pembentukan senyawa kompleks aluminium klorida, dan diperoleh kadar flavonoid total sebesar  $14,8836 \pm 0,3590$  mgQE/g.

Berdasarkan uraian di atas, maka peneliti akan melakukan isolasi, identifikasi, dan penetapan kadar flavonoid total pada isolat hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) hasil ekstraksi sonikasi dengan pelarut etanol 70%. Identifikasi hasil pemurnian isolat dilakukan menggunakan instrumen spektrofotometer FTIR dan UV-Vis dengan penambahan pereaksi geser untuk mengetahui golongan flavonoid dalam rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.). Ditinjau dari metode ekstraksi rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) kebanyakan menerapkan metode maserasi, sehingga dalam penelitian ini digunakan metode sonikasi sebagai pembaruan. Selain itu, identifikasi dan

penentuan kadar flavonoid total pada isolat hasil kromatografi kolom rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) belum banyak dilakukan.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana hasil pemisahan senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) dengan metode kromatografi kolom gradien eluen dan kromatografi kolom non gradien eluen?
2. Bagaimana hasil identifikasi senyawa flavonoid pada isolat kromatografi kolom fraksi etil asetat rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) menggunakan spektrofotometer FTIR dan UV-Vis?
3. Bagaimana kadar flavonoid pada isolat hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

1. Untuk mengetahui hasil pemisahan senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) dengan metode kromatografi kolom gradien eluen dan kromatografi kolom non gradien eluen.
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi senyawa flavonoid pada isolat kromatografi kolom fraksi etil asetat rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) menggunakan spektrofotometer FTIR dan UV-Vis.
3. Untuk mengetahui kadar flavonoid pada isolat hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.).

#### **1.4 Batasan Masalah**

1. Sampel tumbuhan Jeringau (*Acorus calamus* L.) diambil dari Semarang, Jawa Tengah.
2. Uji fitokimia dilakukan pada senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan terpenoid.
3. Pemisahan senyawa flavonoid menggunakan kromatografi kolom gradien eluen dielusi dengan n-heksana, etil asetat, dan metanol, serta dimonitoring menggunakan KLTA dengan eluen n-heksana dan etil asetat (7:3).
4. Uji kadar flavonoid dilakukan pada isolat hasil kromatografi kolom.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Diharapkan dari penelitian ini dapat memberikan kontribusi bagi pengembangan ilmu pengetahuan khususnya bidang isolasi bahan alam, memberikan informasi ilmiah mengenai kadar flavonoid pada isolat hasil kolom fraksi etil asetat rimpang Jeringau, memberikan informasi mengenai dugaan golongan flavonoid yang terkandung dalam rimpang Jeringau, serta dapat bermanfaat sebagai referensi untuk pengembangan penelitian selanjutnya.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tumbuhan Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Tumbuhan Jeringau (*Acorus calamus* L.) merupakan anggota famili *Acoraceae* yang termasuk dalam jenis tanaman keladi atau talas-talasan yang hidup di tempat tropis (Wulandari *et al.*, 2015). Nama *Acorus* berasal dari kata *Acoron* (*coreon* yang berarti pupil mata) dan *calamus* berasal dari kata Yunani, *calamos* yang berarti buluh (Rajput *et al.*, 2013). Tumbuhan Jeringau berasal dari negara India, namun telah tersebar di berbagai benua seperti Eropa, Amerika, dan Asia melalui perdagangan rempah-rempah. Jeringau memiliki nama yang berbeda pada setiap daerah di Indonesia seperti jeureunge (Aceh), jerango (Gayo), serango (Nias), dlingo (Jawa), kareango (Makassar), jangu (Bali), kaliraga (Flores), daring (Ambon), dan layambung (Minahasa) (Achmad, 2010).

Tumbuhan Jeringau memiliki morfologi menyerupai rumput dengan tinggi sekitar 75 cm, memiliki aroma rimpang yang sangat kuat (Sukmawati, 2012), terdiri dari akar menjalar panjang yang menyebar tepat di bawah permukaan tanah, dan dapat ditemukan di daerah basah seperti kolam, danau, dan parit (Paithankar *et al.*, 2011). Morfologi tanaman Jeringau ditunjukkan pada Gambar 2.1. Beberapa ciri dari tumbuhan Jeringau ialah memiliki rimpang yang menghasilkan aroma tajam dan berbentuk silinder dengan diameter 2,5 cm. Kulit rimpang Jeringau berwarna coklat keunguan sampai coklat muda dan berwarna putih di bagian dalamnya (Paithankar *et al.*, 2011; Umamaheshwari & Rekha, 2018). Daun tumbuhan Jeringau berbentuk pita dengan lebar sekitar 0,7 – 1,7 cm, dan rata-rata sekitar 1 cm. Bunganya memiliki panjang sekitar 3 – 8 cm, berwarna



coklat kehijauan, berbentuk silinder, dan ditutupi oleh banyak duri (*spikes*). Buahnya kecil dan mengandung sedikit biji (Umamaheshwari & Rekha, 2018). Najib (2020) menjelaskan nama lain dari *Acorus calamus* L. dalam beberapa bahasa yaitu sebagai berikut: *Sweet Flag* (Inggris), *Bach* (Bengali), *Gorbach* (Hindi), *Vacha* (Sanskrit), *Vasa* (Telugu), *Vashambu* (Tamil), dan *Vekhand* (Marathi), dengan klasifikasi sebagai berikut (Sharma *et al.*, 2014).

Kingdom : Plantae  
 Divisi : Magnoliophyta  
 Kelas : Liliopsida  
 Ordo : Acorales  
 Famili : Acoraceae  
 Genus : Acorus L.  
 Spesies : *calamus*



Gambar 2.1 Morfologi *Acorus calamus* L. (Balaji & Shanthakumari, 2021)

Tanaman Jeringau banyak digunakan oleh masyarakat luas sebagai bahan obat alami seperti obat tumor perut, epilepsi (Paithankar *et al.*, 2011) , disentri, cacingan (Gholkar *et al.*, 2013), bengkak, kudis, cacar, dan demam (Hartati *et al.*, 2013). Dalam pengobatan tradisional di Asia dan Eropa, *Acorus calamus* digunakan untuk mengurangi selera makan, diare, gangguan saluran pencernaan, bronchitis, sakit di dada, dan gangguan syaraf (Chandra & Prasad, 2017). Berdasarkan hasil studi etnobotani terhadap tumbuhan obat Indonesia, Jeringau termasuk jenis tumbuhan obat yang dimanfaatkan oleh dukun beranak dan dukun

kampung Suku Melayu (Sari *et al.*, 2014), serta digunakan untuk mengobati sakit perut (mulas) oleh Suku Dayak Pesaruan (Due, 2013). Salah satu bagian tumbuhan Jeringau yang sering dimanfaatkan dalam bidang farmakologi adalah rimpang Jeringau. Menurut Rajput *et al.* (2013) sejak zaman kuno rimpang Jeringau telah diaplikasikan dalam berbagai pengobatan seperti Ayurveda, Yunani, Siddha, China, dan lain-lain. Hismath *et al.* (2011) menyatakan bahwa pemanfaatan suatu tanaman dalam bidang farmakologi erat kaitannya dengan kandungan senyawa metabolit sekunder di dalamnya.

Beberapa hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder pada rimpang Jeringau yaitu sebagai berikut: Mamta & Jyoti (2012) melakukan skrining fitokimia pada ekstrak metanol rimpang Jeringau dan diperoleh hasil positif mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid, alkaloid, fenolik, tanin, dan saponin. Kasture *et al.* (2015) mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder pada rimpang Jeringau, dan diperoleh hasil positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, fenol, tanin, saponin, dan sterol. Paka (2019) melakukan identifikasi fitokimia pada ekstrak etanol rimpang Jeringau dan diperoleh hasil positif mengandung senyawa flavonoid dan alkaloid. Hardiansi *et al.* (2020) melakukan identifikasi fitokimia pada ekstrak etanol rimpang Jeringau dan diperoleh hasil positif mengandung senyawa flavonoid dan tanin. Barua *et al.* (2014) menjelaskan bahwa pada ekstrak etanol rimpang Jeringau terdapat kandungan senyawa flavonoid, senyawa fenolik, dan saponin dengan tingkatan yang sangat tinggi. Pada tingkatan sedang terdapat senyawa tanin dan alkaloid, serta senyawa steroid berada pada tingkatan paling rendah. Berdasarkan hasil *bioassay*-nya, senyawa kimia yang terdapat pada rimpang Jeringau mempunyai

aktivitas biologi seperti antifungi, antibakteri, anti-*yeast*, dan antikanker (Silalahi, 2018). Beberapa pengujian terhadap aktivitas farmakologi rimpang Jeringau ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Penelitian terdahulu terhadap aktivitas farmakologi rimpang Jeringau

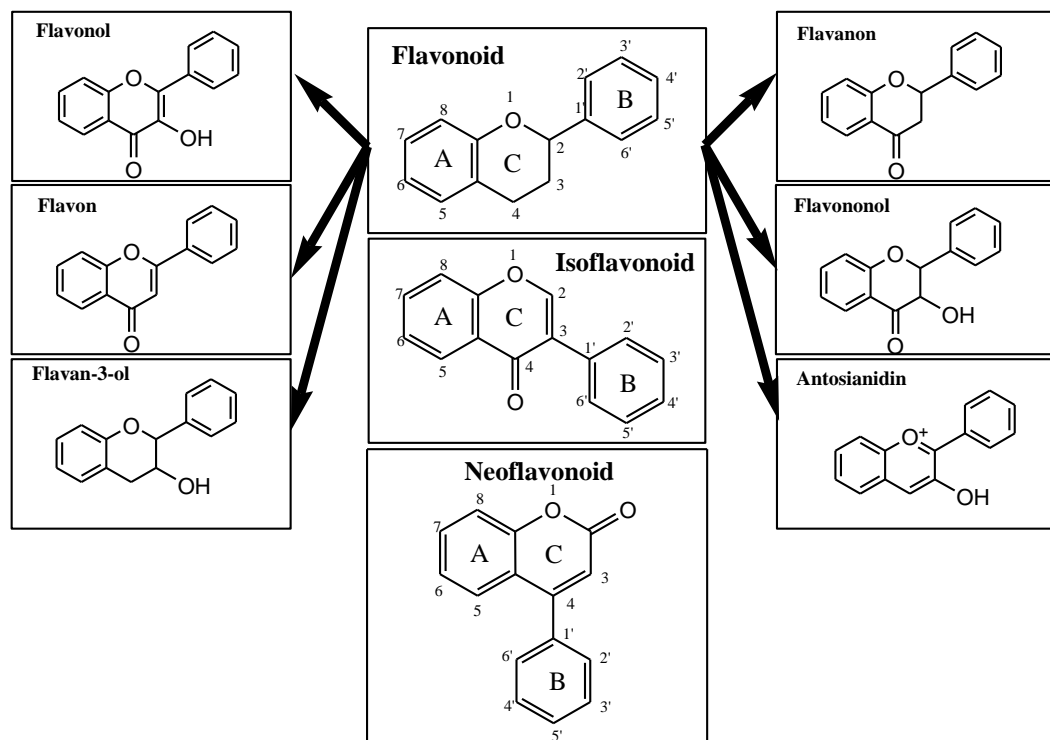
<b>Aktivitas Farmakologi</b>	<b>Hasil Penelitian</b>	<b>Referensi</b>
Antiasma	Ekstrak etanol rimpang Jeringau dengan kandungan flavonoid, steroid, saponin, dan tanin menunjukkan aktivitas bronkodilator, yang secara signifikan menghambat penyempitan bronkus yang diinduksi histamin pada marmut, sehingga dapat berpotensi sebagai antiasma.	Saxena & Saxena, 2014
Antioksidan	Ekstrak etil asetat rimpang Jeringau dengan kandungan metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, tanin, dan terpenoid diketahui dapat meminimalisir radikal hidroksil dan mencegah degradasi deoksiribosa, sehingga berpotensi sebagai antioksidan.	Muthulakshmi <i>et al.</i> , 2015
Antibakteri	Ekstrak etanol rimpang Jeringau dengan kandungan golongan senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, fenol, tanin, dan minyak atsiri diketahui memiliki aktivitas zona hambat pada bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> sebesar 24,32 mm dan bakteri <i>Eschericia coli</i> sebesar 12,06 mm.	Purwanti & Susanti, 2016
Antikanker	Ekstrak etanol dan metanol rimpang Jeringau dengan kandungan senyawa fenol dan flavonoid secara signifikan menghambat proliferasi sel kanker lambung manusia.	Haghighi <i>et al.</i> , 2017
Antiinflamasi	Ekstrak etanol rimpang Jeringau merah dengan kandungan golongan senyawa flavonoid, fenol, alkaloid, minyak atsiri, saponin, dan tanin memiliki aktivitas antiinflamasi terhadap radang kaki tikus dengan dosis optimum 450 mg/kgBB dan daya antiinflamasi 34,20%.	Safrina & Susanti, 2018
Antifungi	Ekstrak metanol rimpang Jeringau dengan kandungan senyawa flavonoid dan fenolik menunjukkan adanya aktivitas antimikroba tertinggi terhadap delapan strain jamur.	Dinev <i>et al.</i> , 2021

## 2.2 Senyawa Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol dengan keberadaan yang melimpah di alam dan dapat ditemukan dalam bentuk aglikon, glikosida, dan turunan termetilasi (Karak, 2019). Struktur dasar senyawa flavonoid terdiri dari 15 atom karbon, yang tersusun sebagai dua cincin benzena (cincin A dan B) dan dihubungkan oleh cincin pirena yang mengandung oksigen heterosiklik (cincin C), sehingga struktur senyawa flavonoid seringkali disebut sebagai C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Hossain *et al.*, 2016). Dewasa ini, lebih dari 8000 jenis flavonoid telah ditemukan dan 5000 diantaranya berasal dari tumbuhan. Selama 20 tahun terakhir, sejumlah besar penelitian telah difokuskan pada senyawa flavonoid yang berasal dari tumbuhan karena potensinya dalam bidang farmakologi (Hossain *et al.*, 2016). Beberapa penelitian yang telah dilakukan diantaranya senyawa flavonoid dari daun akway (*Drimys beccariana*.Gibbs) diketahui memiliki potensi sebagai bahan dasar obat-obatan (Parubak, 2013), senyawa flavonoid dari daun *Cinnamomum parthenoxylon* diketahui memiliki aktivitas hepatoprotektif dan antioksidan (Pardede *et al.*, 2017), senyawa flavonoid dari *G. glandulosum* menunjukkan adanya aktivitas sebagai antibakteri (Tagousop *et al.*, 2018), senyawa flavonoid dari bunga sepatu (*Hibiscus rosa sinensis*) menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dan memiliki potensi sebagai antikanker (Rengarajan *et al.*, 2020). Flavonoid dibagi menjadi beberapa kelompok dan sub kelompok, yang memiliki sifat kimia dan aktivitas biologis berbeda, sehingga fungsinya dalam bidang farmakologi akan berbeda (Brodowska, 2017).

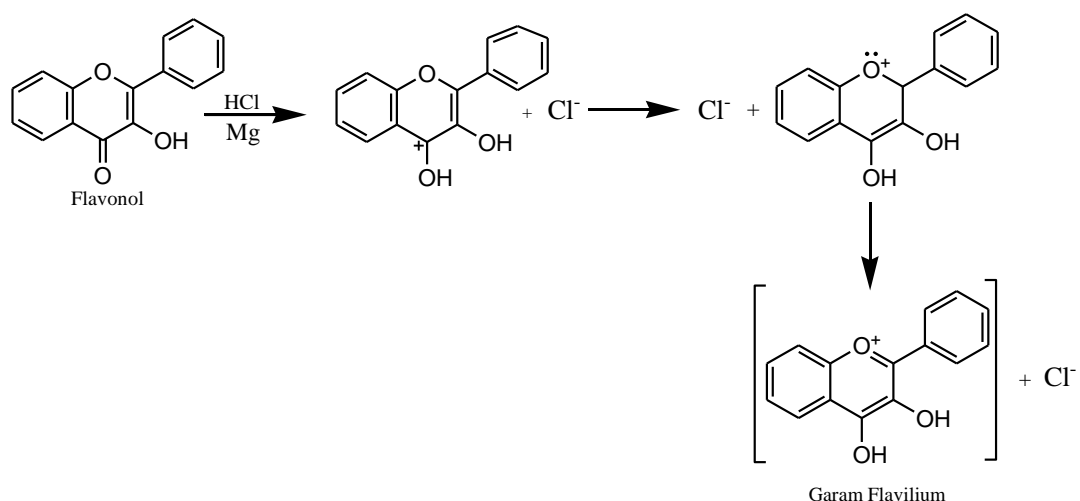
Berdasarkan posisi cincin C yang mengikat cincin B, senyawa flavonoid dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu cincin B yang terikat pada posisi ke-2 dari

cincin C disebut dengan flavonoid, cincin B yang terikat pada posisi ke-3 dari cincin C disebut dengan isoflavonoid, dan cincin B yang terikat pada posisi ke-4 dari cincin C disebut dengan neoflavonoid (Karak, 2019). Berdasarkan pola hidroksilasi dan pola substitusi cincin C, flavonoid dibagi menjadi beberapa sub kelompok yaitu flavon (contoh: apigenin dan luteolin), flavonol (contoh: kuersetin, kaempferol, dan mirisetin), flavanon (contoh: naringenin, naringin, dan hesperedin), flavanonol (contoh: taxifolin), flavan-3-ol (contoh: katekin), dan antosianin (contoh: sianidin, delphinidin, dan malvidin) (Yamagata, 2019). Struktur umum dari kelompok dan sub kelompok senyawa flavonoid ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur umum dari berbagai jenis flavonoid (Hossain *et al.*, 2016; Karak, 2019)

Keberadaan senyawa flavoloid dalam sampel bahan alam dapat diuji dengan metode Wilstater yaitu dengan menambahkan HCl pekat dan logam Mg. Hasil positif ekstrak sampel mengandung flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya garam flavilium yang berwarna merah, kuning, atau jingga (Arifin & Ibrahim, 2018). Perubahan warna disebabkan oleh penambahan HCl pekat dan serbuk Mg yang mereduksi senyawa flavonoid, sehingga senyawa flavonoid menjadi bentuk aglikonnya dan membentuk kompleks dengan Mg. Kompleks yang terbentuk akan menimbulkan warna merah, kuning, atau jingga sesuai jenis kandungan flavonoid pada sampel larutan (Candra *et al.*, 2021). Warna merah hingga jingga mengidentifikasi golongan flavon, warna merah tua mengidentifikasi golongan flavonol atau flavonon (Fajrin & Susila, 2019), dan warna kuning kemerahan mengidentifikasi golongan kalkon (Mariana *et al.*, 2013). Adapun reaksi yang terjadi antara senyawa flavonoid dengan HCl pekat dan logam Mg ditunjukkan pada Gambar 2.3.



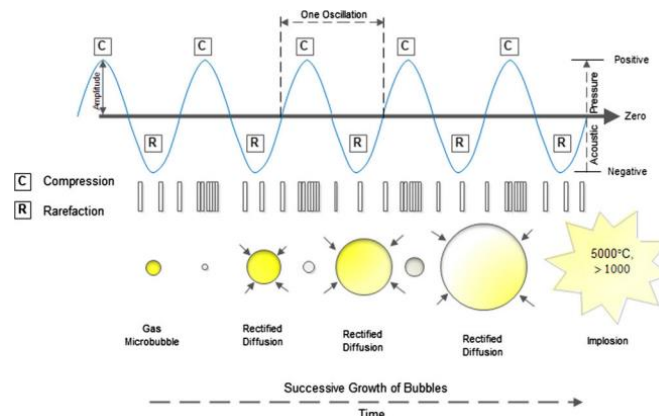
Gambar 2.3 Reaksi senyawa flavonoid dengan HCl pekat dan logam Mg (Candra *et al.*, 2021)

### 2.3 Metode Ekstraksi Sonikasi (Ultrasonik)

Metode sonikasi (ultrasonik) merupakan metode berdasarkan penggunaan gelombang ultrasonik yang dapat mengekstraksi berbagai senyawa, baik yang berasal dari mikroba, tanaman, dan lain sebagainya (Roohinejad *et al.*, 2017). Parameter fisik utama pada metode ultrasonik meliputi daya, frekuensi, dan amplitudo. Frekuensi ultrasonik berkisar antara 20 kHz – 100 MHz, dengan frekuensi efektif antara 20 – 50 kHz (Wen *et al.*, 2018). Gelombang ultrasonik dapat mempercepat proses pelarutan dan perpindahan massa suatu sampel melalui pemecahan dinding sel (Sholihah *et al.*, 2017), tanpa memberikan perubahan yang signifikan pada struktur dan sifat senyawa yang ditargetkan (Reddy *et al.*, 2020).

Prinsip dasar dari ekstraksi ultrasonik yaitu meningkatnya transfer massa yang disebabkan kavitasi akustik ultrasonik. Gelombang ultrasonik yang melewati medium akan memicu terjadinya getaran partikel medium amplitudo sejajar dengan arah rambat secara longitudinal, sehingga partikel medium akan membentuk rapatan dan regangan (Abbas *et al.*, 2013; Wen *et al.*, 2018). Gelombang ultrasonik dalam medium cair dapat menyebabkan kavitasi akustik. Secara umum, kavitasi akustik dideskripsikan sebagai pertumbuhan dan meletusnya gelembung mikro pada metode ultrasonik. Proses kavitasi akustik yaitu ketika suatu cairan diradiasi dengan gelombang ultrasonik, tekanan dalam cairan akan membesar sehingga akan terbentuk gelembung-gelembung mikro (Abbas *et al.*, 2013). Selanjutnya, gelembung akan mengalami pertumbuhan atau disebut dengan fenomena difusi rektifikasi. Adanya gelombang tekanan osilasi yang mengenai cairan, akan menyebabkan pertumbuhan gelembung menjadi tidak stabil, sehingga gelembung akan pecah (Leong *et al.*, 2016). Gelembung kavitasi

yang pecah akan menyebabkan perubahan tekanan dan suhu, sehingga zat terlarut dengan cepat berdifusi dari fase padat ke pelarut (Pacheco-Fernández & Pino, 2020; Roohinejad *et al.*, 2017). Ilustrasi proses kavitasi akustik ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Proses terjadinya kavitasi akustik (Abbas *et al.*, 2013)

Metode ultrasonik memiliki beberapa keunggulan yaitu proses ekstraksi lebih sederhana (Pacheco-Fernández & Pino, 2020), waktu ekstraksi relatif lebih singkat (Zahari *et al.*, 2020), pelarut yang digunakan lebih sedikit dan efisien, sehingga lebih ramah lingkungan (Tungmunnithum *et al.*, 2020), penggunaan suhu rendah dapat meminimalisir kerusakan senyawa target (Quiroz *et al.*, 2019), serta dapat meningkatkan hasil dan kualitas ekstrak yang peroleh (Duarte *et al.*, 2014). Selain itu, dalam beberapa tahun terakhir metode ultrasonik telah diterapkan sebagai metode ekstraksi dalam isolasi flavonoid dari spesies tanaman yang berbeda (Reddy *et al.*, 2020). Beberapa penelitian terdahulu mengenai penggunaan metode ultrasonik dalam ekstraksi senyawa flavonoid disajikan pada Tabel 2.2.



Tabel 2.2 Penggunaan metode ultrasonik dalam ekstraksi senyawa flavonoid

<b>Sampel</b>	<b>Metode</b>	<b>Hasil Penelitian</b>	<b>Referensi</b>
Rambut jagung	Ultrasonik	Metode ultrasonik dengan daya 500 W dan waktu 20 menit mampu menghasilkan kadar flavonoid total sebesar 1,13% dengan aktivitas antioksidan sebesar 467,59 $\mu\text{mol/L}$ .	Zheng <i>et al.</i> , 2016
Rimpang jahe	Maserasi, refluks, soxhlet, dan ultrasonik	Metode ultrasonik dengan frekuensi 25 kHz, suhu 20°C, dan waktu 15 menit menghasilkan kadar flavonoid total tertinggi sebesar 1,3 $\pm$ 0,08%.	Eberle <i>et al.</i> , 2018
Tunas bunga terompet emas	Ultrasonik	Metode ultrasonik diaplikasikan selama 30 menit menghasilkan kadar flavonoid total sebesar 172,90 mgQE/g dengan jenis flavonoid berupa kuersetin.	Khanam & Anis, 2018
Daun dan bunga pohon sutra	Ultrasonik, perkolasi, dan maserasi	Metode ultrasonik dengan frekuensi 60 kHz, suhu 25°C, dan waktu 1 jam mampu menghasilkan kadar flavonoid total tertinggi masing-masing sebesar 139,66 $\pm$ 6,2 dan 136,66 $\pm$ 5,7. Metode ultrasonik juga dapat meningkatkan kandungan SPF pada tanaman.	Hashemi <i>et al.</i> , 2019
Rimpang ilalang	Ultrasonik	Metode ultrasonik dengan frekuensi 47 kHz, suhu kamar, dan waktu 30 menit mampu menghasilkan kadar flavonoid total sebesar 90,91 mgQE/g.	Suhendra <i>et al.</i> , 2019

Selain metode ekstraksi, faktor lain yang mempengaruhi perolehan kadar flavonoid adalah pelarut yang digunakan. Dalam suatu bahan alam, senyawa flavonoid bersifat polar karena terdapat dalam bentuk glikosida yang berikatan dengan gula. Beberapa pelarut polar yang umum digunakan untuk ekstraksi flavonoid adalah etanol, metanol, aseton, etil asetat, isopropanol, dan air (Riwanti *et al.*, 2018). Penelitian ini menggunakan pelarut polar berupa etanol yang diketahui dapat melarutkan senyawa polar seperti fenol dan flavonoid (Candra *et al.*, 2021). Beberapa penelitian terdahulu mengenai penggunaan pelarut etanol dalam ekstraksi senyawa flavonoid disajikan pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Penggunaan pelarut etanol dalam ekstraksi senyawa flavonoid

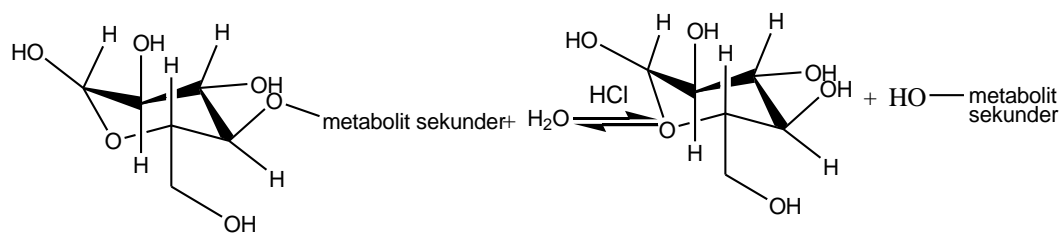
<b>Sampel</b>	<b>Pelarut</b>	<b>Isi Penelitian</b>	<b>Referensi</b>
Daun <i>Perilla frutescens</i>	Etanol 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%	Pelarut etanol 70% memberikan perolehan kadar flavonoid tertinggi.	Hong & Kim, 2010
Rimpang Jeringau	Etanol, hidro-etanol, dan aquades	Kadar flavonoid total tertinggi dihasilkan oleh ekstrak dengan pelarut etanol.	Barua <i>et al.</i> , 2014
Rambut jagung	Etanol 0% (air), 50%, 70%, dan 98%	Pelarut etanol 70% memberikan perolehan kadar flavonoid total tertinggi yaitu sebesar 17,12 mgRE/g rambut jagung kering.	Kristiani & Halim, 2014
<i>Sargassum polycytum</i>	Etanol 50%, 70%, dan 96%	Pelarut etanol 70% menghasilkan kadar flavonoid total tertinggi sebesar 0,13% b/b.	Riwanti <i>et al.</i> , 2018
Rimpang ilalang	Etanol 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, dan 90%	Pelarut etanol 70% mampu menghasilkan kadar flavonoid total tertinggi sebesar 90,91 mgQE/g.	Suhendra <i>et al.</i> , 2019
Daun suruhan	Etanol 70% dan 96%	Pelarut etanol 70% memberikan perolehan kadar flavonoid total tertinggi sebesar 4,139 mgQE/g.	Maskura, 2021

## 2.4 Hidrolisis dan Partisi

Senyawa metabolit sekunder yang terdapat di alam umumnya berada dalam bentuk glikosida yang terdiri dari komponen gula (glikon) dan komponen bukan gula (aglikon) (Mardiyah *et al.*, 2014). Senyawa metabolit sekunder tergolong komponen bukan gula (aglikon) (Fasya *et al.*, 2016), sehingga untuk memperoleh senyawa flavonoid yang bebas dari gula dilakukan hidrolisis, yang merupakan proses pemutusan ikatan glikosida melalui reaksi menggunakan air dengan bantuan katalis asam (Mawaddah, 2019). Katalis asam yang sering digunakan pada proses hidrolisis adalah HCl dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Artati *et al.*, 2012).

Penggunaan katalis asam berupa HCl lebih baik dibandingkan dengan katalis asam H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, karena sifatnya lebih reaktif (Wahyudi *et al.*, 2011). Hal tersebut dikarenakan HCl tergolong asam kuat yang lebih mudah melepaskan

proton ( $H^+$ ) secara sempurna dalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar melepaskan proton ( $H^+$ ), sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion  $H^+$ . Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka peran proton dalam pemutusan ikatan glikosida akan semakin kuat (Fasya *et al.*, 2016). Selain itu, HCl lebih mudah menguap sehingga lebih mudah dipisahkan dari produknya (Wahyudi *et al.*, 2011) dan garam yang terbentuk pada proses penetralan dengan  $NaHCO_3$  tidak berbahaya yaitu garam dapur (NaCl) (Saleh *et al.*, 2016; Yuniwati *et al.*, 2011). Konsentrasi HCl optimum yang dapat digunakan pada proses hidrolisis adalah 2 N, karena pada konsentrasi tersebut diperoleh hasil optimum dengan produk berupa glukosa dengan berat mencapai 2,900 gram. Semakin besar glukosa yang diperoleh maka ikatan glikosida yang dapat terputus akan semakin banyak pula (Artati *et al.*, 2012). Reaksi hidrolisis ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Reaksi hidrolisis glikosida (Mardiyah *et al.*, 2014)

Reaksi hidrolisis bersifat reversibel, sehingga apabila tidak dihentikan dengan cepat maka ikatan glikosida antara glikon dan aglikon yang sebelumnya telah terurai, akan terbentuk kembali (Fasya *et al.*, 2016). Penambahan HCl pada proses hidrolisis akan mengakibatkan perubahan pH menjadi asam, sehingga untuk menghentikan reaksi hidrolisis perlu ditambahkan dengan larutan yang

bersifat basa, sehingga dapat menetralkan kondisi asam pada larutan. Basa yang dapat digunakan adalah  $\text{NaHCO}_3$  jenuh (Afif *et al.*, 2015). Reaksi netralisasi akan menghasilkan produk samping berupa garam  $\text{NaCl}$ , seperti pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Reaksi netralisasi asam (Day & Underwood, 1993)

Hasil hidrolisis kemudian dipartisi dengan pelarut etil asetat. Pada isolasi senyawa metabolit sekunder, proses partisi ditujukan untuk mengklasifikasikan senyawa-senyawa berdasarkan perbedaan tingkat kepolarannya (Saputra *et al.*, 2018). Prinsip dari partisi adalah distribusi solut dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur. Komponen kimia akan terpisah ke dalam kedua fase sesuai dengan tingkat kepolarannya dengan perbandingan konsentrasi tetap (Latif *et al.*, 2018). Proses partisi akan menghasilkan dua lapisan berupa fasa organik dan fasa air. Fasa organik mengekstrak senyawa aglikon berupa metabolit sekunder dan fasa air mengekstrak komponen gula (glikon) (Fasya *et al.*, 2018).

Pelarut organik yang dipilih pada proses partisi ialah pelarut dengan kelarutan yang rendah dalam air ( $< 10\%$ ), dapat menguap untuk memudahkan penghilangan pelarut organik pasca partisi, dan mempunyai kemurnian tinggi untuk meminimalkan adanya kontaminasi sampel (Gandjar & Rohman, 2007). Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut semi polar yang dapat melarutkan senyawa semi polar pada dinding sel (Romadanu *et al.*, 2014). Tingkat kepolaran etil asetat yang berbeda dengan etanol, dapat meningkatkan proses pemisahan fasa air dan fasa organik

pada larutan (Hidayah *et al.*, 2016). Selain itu, dengan nilai konstanta dielektrikum sebesar 6,0 yang dimiliki oleh etil asetat (Wilantari *et al.*, 2019), kelarutan etil asetat cenderung rendah dalam air (Mulyono, 2012).

Pemilihan pelarut etil asetat juga didasarkan pada kemampuannya dalam menarik senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid yang terputus dengan ikatan glikosidanya, akan menjadi aglikon. Flavonoid aglikon seperti flavanon, isoflavon, flavon, dan flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih larut dalam pelarut yang semi polar seperti etil asetat, eter, kloroform, dan n-butanol. Sedangkan, pelarut non polar seperti n-heksana tidak terlalu efektif dalam melarutkan flavonoid (Satolom *et al.*, 2015). Beberapa penelitian mengenai isolasi senyawa flavonoid yang menggunakan pelarut etil asetat pada proses partisi ditunjukkan pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Pelarut pada proses partisi senyawa flavonoid dari bahan alam

<b>Sampel</b>	<b>Pelarut Partisi</b>	<b>Isi Penelitian</b>	<b>Referensi</b>
Biji pinang yaki	Air, etil asetat, dan n-heksana	Total kandungan flavonoid pada fraksi etil asetat sebesar 11,365 mg/L dan pada fraksi n-heksana sebesar 1,400 mg/L	Satolom <i>et al.</i> , 2015
Benalu batu	Etil asetat dan n-heksana	Reaksi Shinoda dan Pew menunjukkan fraksi n-heksana negatif flavonoid dan fraksi etil asetat positif mengandung flavonoid.	Ritna <i>et al.</i> , 2016
Rimpang temu kunci	Etil asetat	Diperoleh hasil partisi berupa ekstrak kental berwarna coklat kehitaman dengan rendemen sebesar 64,75% dan positif mengandung senyawa flavonoid.	Handayani <i>et al.</i> , 2018
Rimpang Jeringau	Etil asetat	Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol rimpang Jeringau memberikan perolehan kadar flavonoid total sebesar 14,8836±0,3590 mgQE/gram fraksi.	Khoirunnisa <i>et al.</i> , 2019

## 2.5 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan alat yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa organik terutama senyawa yang memiliki sifat semi polar pada konstanta dielektrik 2 – 10 (Mamonto *et al.*, 2015). Kromatografi kolom dapat digunakan untuk pemisahan dan pemurnian senyawa yang telah difraksinasi, dengan demikian pemisahan senyawa flavonoid dapat dilakukan dengan kromatografi kolom. Prinsip dari kromatografi kolom adalah pemisahan yang didasarkan pada pendistribusian analit di antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam merupakan zat padat dalam kolom dengan ukuran sama yang bertujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa secara maksimal. Fase gerak merupakan cairan atau gas yang melewati fase diam (Wonorahardjo, 2013). Pemisahan menggunakan kromatografi kolom dilakukan dengan melarutkan sampel dalam pelarut dan dimasukkan ke dalam kolom kromatografi melalui puncak kolom seraya dialiri eluen secara terus-menerus ke dalam fase diam (Silaa *et al.*, 2019). Sampel dalam hal ini akan dibawa oleh eluen, sedangkan kolom yang berisi fase diam akan memisahkan komponen-komponen dalam sampel (Wati, 2016).

Efisiensi pemisahan menggunakan kromatografi kolom dipengaruhi oleh adsorben, diameter kolom, laju alir, eluen (Fasya *et al.*, 2018), dan pengemasan kolom (Kristanti *et al.*, 2008). Efisiensi adsorben dalam pemisahan suatu senyawa berkaitan dengan *teori plate* dan teori kelajuan (Fasya *et al.*, 2018). Salah satu cara untuk meningkatkan efisiensi pemisahan menggunakan kromatografi kolom yaitu dengan memperkecil jumlah sampel dalam proses elusi serta memperpanjang kolom (adsorben) (Wonorahardjo, 2013). Fasa diam/adsorben

yang digunakan pada kromatografi kolom gravitasi umumnya adalah silika gel G-60 ukuran 0,063 – 0,200 mm (Maryam *et al.*, 2020) dengan rasio sampel:silika terbaik adalah 1:150 (Fasya *et al.*, 2018). Pemilihan silika gel sebagai adsorben dikarenakan memiliki sifat sangat inert, hidrofilik, mempunyai kestabilan termal, memiliki mekanik yang tinggi, dan relatif tidak mengembang dalam pelarut organik jika dibandingkan dengan padatan resin polimer organik (Sulastrri & Kristianingrum, 2010). Diameter kolom terbaik dalam pemisahan adalah sebesar 1 cm dengan panjang kolom 50 cm (Fasya *et al.*, 2018). Pengemasan kolom dilakukan dengan cara basah karena menghasilkan pemisahan yang lebih baik daripada cara kering (Handoko, 2016).

Eluen sebagai fase gerak dalam pemisahan menggunakan kromatografi kolom merupakan hal penting yang berperan dalam keberhasilan isolasi suatu senyawa. Eluen yang dapat digunakan pada pemisahan kromatografi kolom bervariasi, sesuai dengan kebutuhan yang berdasarkan pada tingkat kepolaran senyawa yang akan dipisahkan (Rahmawati, 2017). Proses pemisahan senyawa flavonoid menggunakan kromatografi kolom dapat dilakukan dengan sistem elusi gradien yaitu selama proses elusi, eluen yang digunakan memiliki kepolaran yang berbeda-beda. Pemisahan dilakukan dari eluen yang bersifat non polar ke eluen yang bersifat lebih polar, dengan tujuan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks pada sampel yang memiliki kisaran polaritas luas (Gandjar & Rohman, 2007). Selain itu, elusi gradien dapat dilakukan untuk menghasilkan fraksi murni senyawa target dalam jumlah yang lebih besar (Tonius *et al.*, 2016).

Muhrdja *et al.* (2016) berhasil mengisolasi senyawa flavonoid dari rimpang Jeringau dengan sistem elusi gradien yang dimulai dari eluen n-heksan 100%, n-

heksan:etil asetat (7:3), n-heksan:etil asetat (6:4), etil asetat:metanol (7:3), etil asetat 100%, etil asetat:metanol (6:4), metanol:etil asetat (6:4), dan metanol 100%. Dari perlakuan tersebut diperoleh 49 fraksi, yang kemudian dimonitoring menggunakan KLT dan diketahui sampel positif mengandung senyawa flavonoid.

## 2.6 Monitoring Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Analitik

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Analitik dapat digunakan untuk memonitoring fraksi hasil isolasi kromatografi kolom (Fasya *et al.*, 2018). Prinsip KLT didasarkan pada adsorpsi dan partisi dari fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen). Komponen kimia akan bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya (Alen *et al.*, 2017). Penggunaan KLT ditujukan untuk mengelompokkan fraksi-fraksi yang diperoleh berdasarkan kesamaan profil kandungan kimia dari bercak KLT yang terbentuk dengan nilai *Retention factor* (*Rf*) yang sama (Ilyas *et al.*, 2015). Nilai *Rf* dapat dijadikan bukti dalam mengidentifikasi suatu senyawa, dengan nilai *Rf* yang sama atau hampir sama dapat menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki karakteristik yang sama atau mirip (Ferdinand & Rizki, 2021). Identifikasi menggunakan nilai *Rf* yang sama sebagai dasar penggabungan isolat hasil kromatografi kolom dapat dilakukan sesuai dengan persamaan 2.1 (Kusmiyati *et al.*, 2011).

$$\text{Harga } Rf = \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \dots\dots\dots (2.1)$$

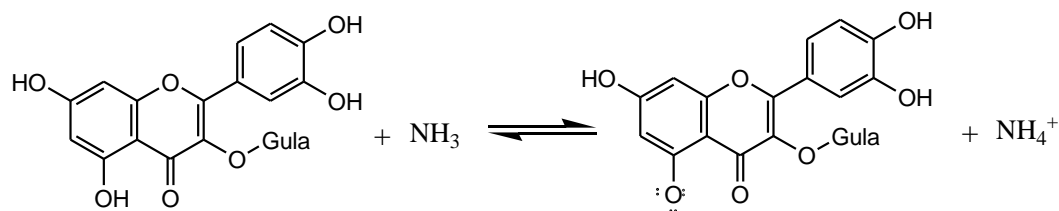
Kemurnian isolat hasil monitoring KLTA juga dapat dideteksi dengan menyemprotkan ammoniak pada noda/spot yang dihasilkan dan diamati di bawah



sinar UV (366 nm) (Suhaenah & Nuryanti, 2017). Uap ammoniak akan mengakibatkan terjadinya deprotonasi H, sehingga ausokrom pada 3 pasang elektron bebas akan menghasilkan warna. Adapun warna/bercak noda yang dapat diduga sebagai senyawa flavonoid pada plat KLT ditunjukkan pada Tabel 2.5. dan reaksi antara ammoniak dengan flavonoid ditunjukkan pada Gambar 2.7.

Tabel 2.5 Golongan senyawa flavonoid berdasarkan bercak noda pada KLT (Hanani, 2014)

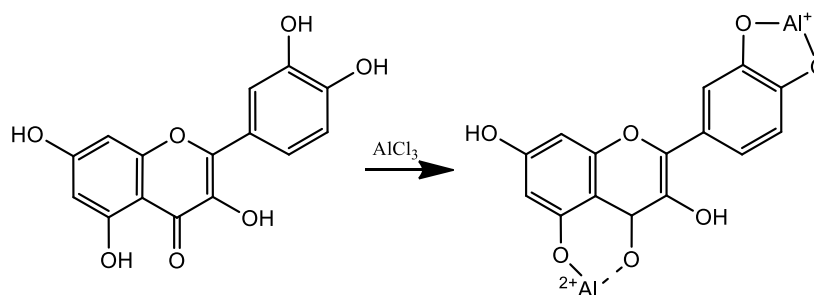
Warna Bercak Noda		Golongan Senyawa Flavonoid
Sinar UV	Sinar UV + NH <sub>3</sub>	
Ungu gelap	Kuning, hijau-kuning, atau coklat	Flavon (5-OH) atau flavonol (tersubstitusi pada 3-O) dan 4'-OH. Sedikit ditemukan berupa flavanon 5-OH dan kalkon tanpa OH pada cincin B.
	Tidak ada perubahan atau sedikit perubahan	Flavon atau flavonol dengan 5-OH tanpa 4'-OH tersubstitusi. Flavon 6-atau 8-OH dan flavanol tersubstitusi pada 3-O dengan 5-OH Isoflavon, flavanon, dan dihidroflavonol dengan 5-OH.
	Biru muda Merah atau jingga	Beberapa flavanon 5-OH Kalkon 2-OH dan/atau 4-OH bebas.
Fluoresensi biru muda	Fluoresensi hijau-kuning atau hijau-biru	Flavon dan flavanon yang tidak memiliki 5-OH bebas. Flavonol (tersubstitusi pada 3-OH) tanpa 5-OH bebas.
	Tidak ada perubahan atau sedikit perubahan Fluoresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas.
Tidak nampak	Fluoresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas.
Kuning pucat dan kuning atau fluoresensi jingga	Tidak ada perubahan atau sedikit perubahan	Flavonol (3-OH bebas) dengan atau tanpa 5-OH bebas.
Fluoresensi kuning, hijau-kuning, hijau-biru, atau hijau	Jingga atau merah	Auron (4'-OH bebas) dengan 2-atau 4-OH. Auron tanpa 4'OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas.
	Tidak ada perubahan atau sedikit perubahan	Flavonol (3-OH bebas) dengan atau tanpa 5-OH bebas.
Kuning pucat	Ungu-kuning muda	Dihidroflavonol tanpa 5-OH bebas



Gambar 2.7 Reaksi senyawa flavonoid dengan  $\text{NH}_3$  (Nelawati, 2007)

## 2.7 Penentuan Kadar Flavonoid Pada Isolat Hasil Kromatografi Kolom

Penentuan kadar flavonoid pada isolat hasil kromatografi kolom dilakukan dengan metode pembentukan senyawa kompleks aluminium klorida atau disebut sebagai metode  $\text{AlCl}_3$ . Prinsip dari metode  $\text{AlCl}_3$  yaitu pembentukan kompleks yang stabil antara aluminium klorida dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari golongan flavon dan flavonol. Dengan demikian, ketika aluminium klorida ditambahkan maka akan terbentuk kompleks asam yang stabil dengan gugus ortohidroksil pada cincin A- atau B- dari senyawa-senyawa flavonoid (Anwar & Triyasmono, 2016). Senyawa yang umumnya digunakan sebagai standar pada penetapan kadar flavonoid total adalah kuersetin, rutin, dan katekin (Shraim *et al.*, 2021). Kuersetin dipilih sebagai standar karena merupakan salah satu senyawa flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga, sehingga dapat bereaksi dengan  $\text{AlCl}_3$  membentuk kompleks yang stabil seperti pada Gambar 2.8 (Azizah *et al.*, 2014). Pembentukan kompleks yang terjadi dapat diamati dengan adanya perubahan warna larutan menjadi lebih kuning. Semakin tinggi kadar senyawa flavonoid dalam suatu ekstrak maka secara visual warna kuning yang terbentuk akan semakin pekat (Asmorowati & Lindawati, 2019).



Gambar 2.8 Pembentukan senyawa kompleks kuersetin dengan aluminium klorida (Azizah *et al.*, 2014)

Selanjutnya, penentuan kadar flavonoid total pada sampel dianalisis secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang akan menunjukkan jumlah flavonoid dalam sampel berdasarkan nilai absorbansinya. Absorbansi sebagai analisa kuantitatif dilakukan berdasarkan Hukum Lambert-Beer. Dalam hal ini, nilai absorbansi berbanding lurus dengan kadar flavonoid dalam suatu sampel, yaitu semakin tinggi nilai absorbansi yang terukur maka kadar flavonoid yang terkandung di dalam suatu sampel juga semakin tinggi (Neldawati *et al.*, 2013). Spektrofotometer UV-Vis memiliki beberapa kelebihan yaitu dapat diaplikasikan dengan mudah dan sederhana dalam menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil, angka yang terbaca langsung dicatat oleh *detector* berupa angka digital atau grafik yang sudah diregresikan, sehingga hasil yang diperoleh cukup akurat (Trinovita *et al.*, 2019), pengaplikasiannya lebih cepat dibandingkan dengan metode yang lain, dan dapat digunakan untuk analisis suatu zat berwarna maupun tidak berwarna (Asmorowati & Lindawati, 2019).

Beberapa contoh penetapan kadar flavonoid total pada bahan alam menggunakan metode AlCl<sub>3</sub> dan identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis yaitu sebagai berikut: Nurmila *et al.* (2019) melakukan identifikasi dan analisis kadar flavonoid total pada getah angkana (*Pterocarpus indicus* Willd)

menggunakan reagen  $\text{AlCl}_3$  dan spektrofotometer UV-Vis. Hasil menunjukkan sampel positif mengandung senyawa flavonoid yang ditandai adanya perubahan warna dari merah menjadi kuning dengan kadar flavonoid total sebesar 0,0434%. Suharyanto & Hayati (2021) mengidentifikasi kandungan senyawa flavonoid pada buah gambas (*Luffa acutangula*(L.) Roxb.) menggunakan reagen  $\text{AlCl}_3$  dan spektrofotometer UV-Vis. Hasil menunjukkan sampel positif mengandung senyawa flavonoid yang ditandai dengan adanya perubahan warna dari coklat kehijauan menjadi warna jingga, dengan kadar flavonoid total pada sampel sebesar  $9,897 \pm 0,11$  mgQE/g ekstrak. Masduqi & Rahardhian (2021) berhasil menganalisis kadar flavonoid total pada ekstrak etanol 70% rimpang Jeringau (*Acorus calamus*) menggunakan reagen  $\text{AlCl}_3$  dan spektrofotometer UV-Vis. Hasil identifikasi menunjukkan sampel positif mengandung senyawa flavonoid dengan kadar flavonoid total sebesar  $7,20 \pm 0,01$  mgRE/g.

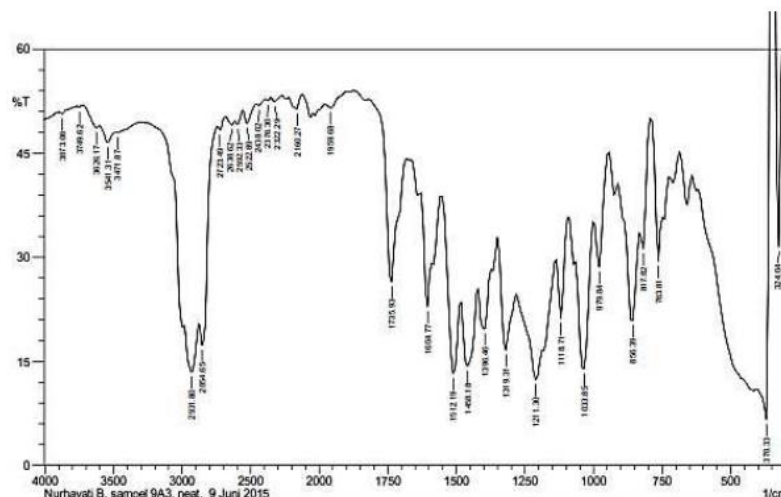
## **2.8 Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Spektrofotometer FTIR**

Spektroskopi Infra Merah (IR) merupakan instrument yang digunakan untuk identifikasi suatu senyawa berdasarkan serapan yang ditimbulkan oleh vibrasi molekul (Panji, 2012) dengan bantuan radiasi sinar inframerah (Masrihanah, 2020). Vibrasi molekul akan memberikan peak pada bilangan gelombang dan intensitas tertentu pada setiap gugus molekulnya (Pramitania, 2019). Identifikasi menggunakan FTIR hanya akan memberikan informasi mengenai gugus fungsi berdasarkan panjang gelombang, bentuk pita, dan intensitas (Anggraini, 2018).

Prinsip kerja spektroskopi inframerah adalah sinar inframerah dilewatkan melalui suatu cuplikan senyawa organik sehingga terjadi interaksi antara sampel

dengan energi dari sinar inframerah. Sejumlah frekuensi akan diserap sedangkan frekuensi yang lain akan diteruskan atau ditransmisikan tanpa diserap. Frekuensi yang terserap akan muncul sebagai penurunan signal yang terdeteksi. Informasi tersebut ditampilkan sebagai spectrum radiasi antara % transmittan dan bilangan gelombang (Masrihanah, 2020). Fungsi utama dari spektroskopi inframerah adalah mengidentifikasi gugus fungsi suatu senyawa organik berdasarkan spectrum khas pada daerah inframerah. Vibrasi gugus fungsi suatu senyawa dapat terjadi pada bilangan gelombang  $2,5 - 15 \mu\text{m}$  ( $4000 - 50 \text{ cm}^{-1}$ ) yang merupakan bilangan gelombang spektrofotometer inframerah. Ikatan yang berbeda menghasilkan vibrasi yang berbeda sehingga senyawa tertentu akan memiliki karakteristik frekuensi vibrasi sebagai pita serapan berbeda dengan senyawa lainnya.

Muhridja *et al.* (2016) mengidentifikasi isolat flavonoid dari rimpang Jeringau yang ditunjukkan pada Gambar 2.9. Spektra IR isolat flavonoid dari rimpang Jeringau tersebut menunjukkan adanya vibrasi ulur gugus -OH, bentuk pita melebar terdapat pada daerah gelombang  $3348,42 \text{ cm}^{-1}$ , vibrasi ulur C-O dengan bentuk pita lebar pada daerah gelombang  $2931,80 \text{ cm}^{-1}$ , vibrasi ulur C=O dengan bentuk pita tajam pada daerah gelombang  $1728,22 \text{ cm}^{-1}$ , vibrasi ulur C=O aromatik dengan bentuk pita tajam pada daerah gelombang  $1604,77 \text{ cm}^{-1}$ , vibrasi tekuk O-H dengan bentuk pita tajam pada daerah gelombang  $1458,18 \text{ cm}^{-1}$ , vibrasi tekuk C-H dengan bentuk pita tajam pada daerah gelombang  $1319,31 \text{ cm}^{-1}$ , dan vibrasi ulur C-O alkohol dengan bentuk pita lebar pada daerah gelombang  $1211,30 \text{ cm}^{-1}$ .

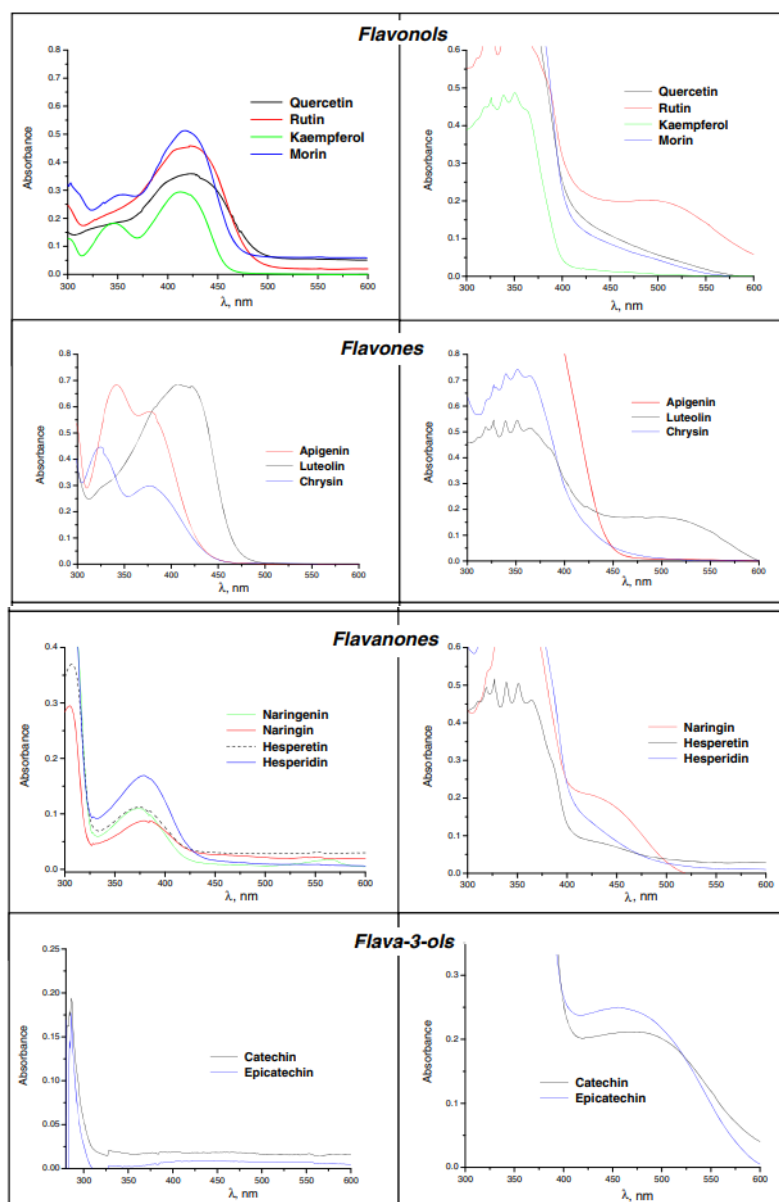


Gambar 2.9 Spektra IR senyawa flavonoid dari rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) (Muhridja *et al.*, 2016)

## 2.9 Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada interaksi antara materi dengan radiasi elektromagnetik. Apabila seberkas radiasi (cahaya) dikenakan pada cuplikan (larutan sampel), maka sebagian dari cahaya diserap molekul tersebut. Kisaran panjang gelombang untuk radiasi UV-Vis adalah 200 – 800 nm. Untuk radiasi UV, kisaran panjang gelombangnya adalah 200 – 400 nm, sementara radiasi sinar tampak mempunyai kisaran panjang gelombang 400 – 800 nm (Gandjar & Rohman, 2015). Umumnya, senyawa golongan flavonoid memiliki serapan pada panjang gelombang yang berbeda-beda, diantaranya golongan flavonol memiliki serapan dengan panjang gelombang maksimum 250 – 270 nm dan 350 – 390 nm, golongan flavon memiliki serapan dengan panjang gelombang maksimum 250 – 270 nm dan 330 – 350 nm, golongan flavanon memiliki serapan dengan panjang gelombang maksimum 275 – 290 nm, dan golongan isoflavon memiliki serapan dengan panjang gelombang maksimum 255 – 265 nm (Harborne, 1987). Selain itu, identifikasi panjang gelombang maksimum setelah

penambahan  $AlCl_3$  dapat dilakukan pada analisis senyawa flavonoid untuk memberikan petunjuk terkait gugus tambahan pada senyawa flavonoid akibat adanya pembentukan kompleks antara  $AlCl_3$  dan senyawa flavonoid, sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang, yaitu golongan flavonol menjadi 415 – 425 nm, flavanon 390 – 400 nm, flava-3-ols menjadi 510 nm, dan flavon menjadi 405 – 420 nm seperti ditunjukkan pada Gambar 2.10 (Pękal & Pyrzyńska, 2014).



Gambar 2.10 Spektrum serapan golongan flavonoid (Pękal & Pyrzyńska, 2014)

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret – Juni 2022 di Laboratorium Kimia Organik, Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat gelas laboratorium, loyang, bak plastik, cawan porselen, blender, neraca analitik, ayakan, pipa kapiler, *corong buchner*, corong pisah, kertas saring, spatula, pipet tetes, bola hisap, botol vial, plastik *wrap*, aluminium voil, pH universal, *magnetic stirrer hot plate*, oven, desikator, statif, kolom, silika, plat silika gel F<sub>254</sub>, mortar agate, *chamber*, rak tabung reaksi, *rotary evaporator*, dan *ultrasonic processor qsonica*. Instrumentasi yang digunakan yaitu Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.), etanol 70%, etanol p.a, aquades, etil asetat, n-heksana, metanol, aquabides, HCl 1 M, HCl 2 M, HCl 2 N, HCl 2%, standar kuersetin, AlCl<sub>3</sub> 10%, natrium asetat 1 M, natrium bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>), silika gel, reagen Dragendroff, reagen Mayer, serbuk Mg, FeCl<sub>3</sub> 1%, asetat anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, kloroform, dan KBr.



### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini diawali dengan preparasi sampel dengan cara dibersihkan, dikeringkan, dihaluskan, dan dilakukan pengayakan pada sampel rimpang Jeringau. Selanjutnya, ditentukan kadar air sampel dan diekstraksi menggunakan metode sonikasi (ultrasonik) dengan pelarut etanol 70%. Kemudian, dipekatkan hasil ekstraksi menggunakan *rotary vacuum evaporator*. Setelah itu, dihidrolisis ekstrak kasar etanol 70% rimpang Jeringau menggunakan HCl 2 N dan dinetralkan menggunakan  $\text{NaHCO}_3$ . Kemudian, ekstrak hasil hidrolisis dipartisi menggunakan pelarut etil asetat. Selanjutnya, diuji fitokimia fraksi etil asetat rimpang Jeringau untuk mengetahui kandungan senyawa aktif di dalamnya. Kemudian, dipisahkan senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat rimpang Jeringau menggunakan kromatografi kolom dengan eluen n-heksana, etil asetat, dan metanol yang dielusi secara bergradien dan dimonitoring menggunakan KLTA dengan eluen n-heksana:etil asetat (7:3). Setelah itu, dilakukan isolasi senyawa flavonoid menggunakan KLTA untuk menentukan eluen terbaik diantara eluen yang memberikan noda pemisahan pada monitoring KLTA sebelumnya. Kemudian, dilakukan isolasi senyawa flavonoid menggunakan kromatografi kolom non gradien eluen dan monitoring menggunakan KLTA dengan eluen terbaik hasil KLTA sebelumnya. Selanjutnya, isolat flavonoid diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR dan UV-Vis dengan penambahan pereaksi geser. Kemudian, ditentukan kadar flavonoid pada isolat hasil kromatografi kolom non gradien eluen menggunakan metode pembentukan senyawa kompleks aluminium klorida menggunakan standar kuersetin dan identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

### **3.4 Tahapan Penelitian**

Tahap-tahap dalam penelitian yang dilakukan terdiri dari:

1. Preparasi sampel rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)
2. Penentuan kadar air secara termogravimetri
3. Ekstraksi sonikasi (ultrasonik) rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)
4. Hidrolisis dan partisi ekstrak etanol 70% rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)
5. Uji fitokimia rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)
6. Isolasi flavonoid dengan kromatografi kolom gradien eluen
7. Isolasi flavonoid dengan KLTA
8. Isolasi flavonoid dengan kromatografi kolom non gradien eluen
9. Identifikasi isolat flavonoid hasil kromatografi kolom dengan spektrofotometer FTIR dan UV-Vis
10. Penetapan kadar flavonoid total pada isolat hasil kromatografi kolom

### **3.5 Cara Kerja**

#### **3.5.1 Preparasi Sampel Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)**

Preparasi sampel dilakukan pada sampel rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) yang dipanen dari Kota Semarang, Jawa Tengah. Sampel dipotong kecil-kecil dan dicuci menggunakan air hingga bersih. Selanjutnya, sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Setelah itu, sampel kering dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Kemudian, sampel yang berupa serbuk diayak menggunakan ayakan 90 mesh. Selanjutnya, sampel disimpan pada suhu ruang.

### 3.5.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri

Penentuan kadar air diawali dengan dipanaskan gelas porselen dalam oven pada suhu 105°C selama 15 menit. Selanjutnya, didinginkan gelas porselen dalam desikator selama 10 menit dan dilakukan penimbangan pada gelas porselen. Proses ini diulangi hingga mencapai berat yang konstan. Setelah itu, ditimbang bubuk rimpang Jeringau dalam gelas porselen dan dilakukan pemanasan dalam oven pada suhu 100 – 105°C selama 15 menit. Kemudian, disimpan dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang. Perlakuan diulangi hingga mencapai berat yang konstan. Kadar air dalam rimpang jeringau dihitung menggunakan persamaan (3.1).

$$\text{Kadar air} = \frac{(a-c)}{(b-a)} \times 100\% \dots\dots\dots (3.1)$$

Dimana, a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dioven

c = berat konstan cawan + sampel setelah dioven

### 3.5.3 Ekstraksi Sonikasi (Ultrasonik) Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Ekstraksi sampel Jeringau (*Acorus calamus* L.) menggunakan metode sonikasi (ultrasonik) diawali dengan ditimbang 30 g simplisia Jeringau yang diperoleh dari tahap preparasi. Selanjutnya, dimasukkan sampel ke dalam erlenmeyer. Setelah itu, ditambahkan dengan 300 mL pelarut etanol 70%. Perbandingan sampel dan pelarut 1:10 (b/v). Kemudian, ditempatkan sampel dalam *ultrasonic* dan diekstraksi selama 30 menit pada suhu kamar dengan frekuensi 47 kHz. Selanjutnya, disaring sampel menggunakan corong *buchner*. Setelah itu, dipekatkan ekstrak etanol rimpang Jeringau menggunakan *rotary*

*evaporator* pada suhu 40°C selama 10 – 30 menit hingga pelarut benar-benar menguap dan tidak ada pelarut yang menetes pada labu pelarut. Setelah itu, ditimbang dan dihitung ekstrak yang diperoleh menggunakan persamaan (3.2).

$$\text{Yield} = \frac{\text{Weight of crude extract obtained}}{\text{Weight of the sample used}} \times 100\% \dots\dots\dots (3.2)$$

### 3.5.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Etanol 70% Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Hidrolisis ekstrak pekat etanol rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) dilakukan dengan cara ditimbang ekstrak pekat etanol sebanyak 5 g. Selanjutnya, ditambahkan 10 mL HCl 2 N ke dalam ekstrak pekat etanol dengan perbandingan 1:2 (ekstrak pekat : HCl 2 N). Kemudian, dihomogenkan selama 1 jam menggunakan *magnetic stirrer hot plate* pada suhu ruang. Setelah itu, ditambahkan natrium bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) hingga didapatkan pH netral.

Partisi ekstrak pekat hasil hidrolisis dilakukan dengan menambahkan pelarut etil asetat sebanyak 25 mL ke dalam corong pisah yang telah berisi hidrolisat. Selanjutnya, dikocok selama 15 menit dan didiamkan beberapa saat hingga terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan atas yang merupakan fasa organik (etil asetat) dan lapisan bawah yang merupakan fasa air. Dalam hal ini, proses partisi dilakukan secara berulang menggunakan pelarut yang sama, hingga lapisan pada fasa air tidak berwarna lagi. Selanjutnya, diambil fasa organik (etil setat) dan dipekatkan fasa organik dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu di bawah 40°C. Setelah itu, ditimbang dan dihitung rendemennya. Fraksi etil asetat rimpang Jeringau dapat dihitung rendemennya sesuai dengan persamaan (3.3).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \dots\dots\dots (3.3)$$

### **3.5.5 Uji Fitokimia Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)**

Uji fitokimia dilakukan secara bertahap yaitu pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau yang bertujuan untuk mengidentifikasi adanya kandungan senyawa aktif berupa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan terpenoid.

#### **3.5.5.1 Uji Flavonoid**

Uji flavonoid dilakukan dengan cara dimasukkan ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 mg, kemudian ditambahkan 2 tetes HCl 2 M dan 1 mg serbuk Mg. Larutan berwarna merah, jingga, atau kuning yang timbul menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

#### **3.5.5.2 Uji Alkaloid**

Uji alkaloid dilakukan dengan cara dimasukkan ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 mg, kemudian ditambahkan 0,5 mL HCl 2%, kemudian dibagi dalam 2 tabung. Tabung I ditambahkan 3 tetes reagen Dragendorff dan tabung II ditambahkan 3 tetes reagen Mayer. Jika pada tabung I terbentuk endapan berwarna jingga dan tabung II terbentuk endapan putih kekuningan, maka sampel positif mengandung senyawa alkaloid.

#### **3.5.5.3 Uji Tanin**

Uji tanin dilakukan dengan cara dimasukkan ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 1

mg. Kemudian ditambahkan 2 – 3 tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Jika larutan terbentuk warna hijau kehitaman atau biru dapat diindikasikan sampel mengandung senyawa tanin.

#### **3.5.5.4 Uji Saponin**

Uji saponin dilakukan dengan cara dimasukkan ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 mg dan ditambahkan aquades (1:1). Kemudian, dikocok selama 1 menit. Selanjutnya, diamati jika terbentuk busa ditambahkan 2 tetes HCl 1 M, jika busa yang terbentuk dapat bertahan dalam waktu 10 menit dengan memiliki ketinggian sekitar 1 – 3 cm, maka sampel positif mengandung senyawa saponin.

#### **3.5.5.5 Uji Steroid dan Terpenoid**

Uji terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara dimasukkan ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 mg. Lalu ditambahkan 0,5 mL pelarut kloroform dan asetat anhidrat. Kemudian ditambahkan 1 – 2 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat melalui dinding tabung. Diamati jika terbentuk cincin kecoklatan atau keunguan pada perbatasan dua pelarut, maka sampel positif mengandung senyawa terpenoid dan jika terbentuk warna hijau kebiruan, maka sampel positif mengandung senyawa steroid.

#### **3.5.6 Isolasi Flavonoid dengan Kromatografi Kolom Gradien Eluen**

Pemisahan menggunakan kromatografi kolom gradien eluen dilakukan dengan fase diam berupa silika gel yang telah diaktivasi. Proses aktivasi silika gel dilakukan dengan cara dipanaskan silika gel sebanyak 10 g dalam oven pada suhu

110°C selama 2 jam. Selanjutnya, didinginkan dalam desikator selama 15 menit. Setelah itu, dibuat bubur silika dengan cara dicampur silika gel dengan 20 mL pelarut n-heksana:etil asetat (7:3 v/v) sedikit demi sedikit dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga terbentuk suspensi tanpa gelembung. Setelah itu, disiapkan kolom dan diisi dengan *glass woll*. Kemudian, dimasukkan bubur silika ke dalam kolom kromatografi secara perlahan dan tanpa jeda. Selanjutnya, diketuk-ketuk kolom agar terisi mampat dan didiamkan selama 24 jam. Setelah itu, dilarutkan fraksi etil asetat rimpang Jeringau dengan 1 mL eluen n-heksana:etil asetat (7:3) dan dimasukkan dalam kolom. Kemudian, dilakukan elusi secara bergradien dimulai dengan eluen n-heksana 100%, n-heksana:etil asetat (7:3), n-heksana:etil asetat (6:4), etil asetat 100%, etil asetat:metanol (7:3), etil asetat:metanol (6:4), etil asetat:metanol (4:6), dan metanol 100%. Setelah itu, ditampung hasil pemisahan (eluat) dalam botol vial sebanyak 5 mL/menit.

Hasil isolat yang diperoleh kemudian dimonitoring dengan KLTA. Proses monitoring dilakukan menggunakan fase diam berupa plat silika gel F<sub>254</sub> dengan ukuran 10 × 10 cm yang telah diaktivasi dan fase gerak berupa n-heksana:etil asetat (7:3). Monitoring dengan KLTA diawali dengan preparasi fase diam dan fase gerak. Fase diam yang berupa plat silika gel ditandai 1 cm pada batas atas dan bawah, lalu diaktivasi dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C selama 30 menit. Fase gerak dijenuhkan dalam bejana pengembang selama 1 jam. Setelah itu, ditotolkan isolat pada plat silika gel menggunakan pipa kapiler sebanyak 10 kali secara berkala dengan pengeringan dan dimasukkan plat silika ke dalam bejana pengembang, lalu dielusi sampai tanda batas atas. Kemudian, dideteksi noda hasil pemisahan dengan menyemprotkan ammoniak pada plat

silika dan diamati di bawah sinar UV (366 nm). Hasil uji positif jika noda berwarna kuning kehijauan, jingga, biru, ungu, ataupun merah muda yang menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid (Suhaenah & Nuryanti, 2017). Setelah itu, dihitung  $R_f$  menggunakan persamaan (2.1).

### **3.5.7 Isolasi Flavonoid dengan KLTA**

Isolasi dengan KLTA dilakukan untuk mengetahui eluen terbaik yang dapat memisahkan senyawa flavonoid dalam fraksi etil asetat rimpang Jeringau. Isolasi dilakukan menggunakan plat silika ukuran 1 cm × 10 cm yang telah diaktivasi. Proses isolasi dilakukan dengan ditotolkan fraksi etil asetat pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat menggunakan pipa kapiler sebanyak 10 totol. Selanjutnya, plat dikeringkan dan dielusi dalam bejana pengembang yang telah dijenuhkan dengan fasa gerak yang memberikan pola pemisahan terbaik pada proses kromatografi kolom gradien eluen. Setelah itu, ditutup rapat bejana pengembang hingga fase gerak mencapai  $\pm 1$  cm dari garis batas atas plat. Selanjutnya, diamati noda pemisahan yang terbentuk pada plat dengan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm sebelum dan setelah disemprot dengan ammoniak. Setelah itu, diamati dan dilingkari noda yang terbentuk menggunakan pensil. Pengamatan noda hasil elusi meliputi warna noda, nilai  $R_f$ , bentuk noda, dan jumlah noda.

### **3.5.8 Isolasi Flavonoid dengan Kromatografi Kolom Non Gradien**

Proses pemisahan menggunakan kromatografi kolom non gradien eluen dilakukan dengan tahapan yang serupa seperti pada pemisahan dengan kromatografi kolom gradien eluen, yang membedakan yaitu penggunaan eluen



yang merupakan eluen terbaik hasil KLTA baik pada pembuatan bubuk silika, pelarutan fraksi etil asetat rimpang Jeringau yang akan diisolasi, dan proses elusi sampel. Setelah itu, ditampung eluat dalam botol vial sebanyak 2 mL/menit.

Hasil isolat yang diperoleh dimonitoring dengan KLTA menggunakan fase diam berupa plat silika gel F<sub>254</sub> dengan ukuran 20 × 10 cm yang telah diaktivasi dan fase gerak berupa eluen terbaik hasil KLTA. Selanjutnya, ditotolkan isolat pada plat silika gel menggunakan pipa kapiler sebanyak 10 kali secara berkala dengan pengeringan dan dimasukkan plat silika ke dalam bejana pengembang yang telah dijenuhkan, lalu dielusi sampai tanda batas atas. Selanjutnya, dideteksi noda hasil pemisahan pada plat silika dan diamati di bawah sinar UV 366 nm dan 254 nm sebelum dan setelah disemprot ammoniak. Setelah itu, dihitung *R<sub>f</sub>* menggunakan persamaan (2.1).

### **3.5.9 Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Spektrofotometer FTIR**

Identifikasi hasil isolat flavonoid rimpang Jeringau menggunakan FTIR dilakukan dengan cara masing-masing isolat sebanyak 2 mg dicampur dengan 100 mg KBr. Kemudian, digerus menggunakan mortar agate. Selanjutnya, ditekan campuran KBr dan sampel yang telah halus dengan tekanan 80 torr (8-20 torr per satuan waktu) selama 10 menit. Setelah itu, dianalisis pelet yang telah ditekan menggunakan FTIR pada bilangan gelombang 4000 – 400 cm<sup>-1</sup>.

### **3.5.10 Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Spektrofotometer UV-Vis**

Identifikasi hasil isolat flavonoid rimpang Jeringau menggunakan UV-Vis dilakukan dengan melarutkan masing-masing isolat dengan 10 mL etanol p.a.

Selanjutnya, diambil masing-masing isolat sebanyak 2 mL dan dianalisis panjang gelombang maksimum isolat pada rentang 200 – 800 nm. Kemudian, isolat ditambahkan dengan pereaksi geser yaitu 6 tetes  $\text{AlCl}_3$  10% dan 250 mg natrium asetat. Setelah itu, dianalisis pergeseran panjang gelombang menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

### **3.5.11 Penentuan Kadar Flavonoid Total Pada Isolat Hasil Kromatografi Kolom**

#### **3.5.11.1 Pembuatan Larutan Baku Kuersetin**

Pembuatan larutan baku kuersetin diawali dengan pembuatan larutan induk kuersetin 1000  $\mu\text{g/mL}$  dengan cara ditimbang kuersetin sebanyak 0,01 g dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga volume 10 mL. Selanjutnya, diencerkan 1 mL larutan induk dengan etanol p.a hingga volume larutan 10 mL, sehingga diperoleh larutan baku kuersetin 100  $\mu\text{g/mL}$ . Setelah itu, dibuat variasi larutan standar dengan konsentrasi 9, 12, 15, 18, 21, dan 24  $\mu\text{g/mL}$ . Kemudian, diambil masing-masing larutan standar sebanyak 2 mL dan ditambahkan 0,10 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, 0,10 mL natrium asetat 1 M, dan 2,80 mL akuabides. Selanjutnya, diinkubasi larutan selama 30 menit pada suhu kamar. Setelah itu, diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum dari standar kuersetin. Kemudian, dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi kuersetin ( $\mu\text{g/mL}$ ) dengan absorbansi.

#### **3.5.11.2 Penetapan Kadar Flavonoid Pada Isolat Hasil Kolom**

Penetapan kadar flavonoid diawali dengan pembuatan larutan blanko dengan diambil 0,5 mL etanol p.a, 0,10 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, 0,10 mL natrium asetat 1

M, dan 2,80 mL akuabides. Setelah itu, diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Setiap pengukuran serapan dibandingkan terhadap blanko. Larutan uji dibuat dengan melarutkan isolat hasil kromatografi kolom dengan etanol p.a sebanyak 10 mL. Larutan uji tersebut kemudian dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 0,10 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, 0,10 mL natrium asetat 1 M, dan 2,80 mL akuabides. Larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Setelah itu, diukur absorbansi masing-masing larutan pada panjang gelombang maksimum dari standar kuersetin. Kemudian, dibuat kurva kalibrasi larutan standar kuersetin dan dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan garis linear sesuai dengan hukum Lambert-Beer tentang hubungan lurus antara absorbansi dengan kadar analit, yaitu  $y = ax+b$  dimana  $y$  merupakan nilai absorbansi sampel dan  $x$  adalah nilai konsentrasi sampel (Putri *et al.*, 2019). Setelah itu, ditentukan kadar flavonoid dari masing-masing isolat menggunakan persamaan (3.4).

$$\text{Kadar flavonoid (mg QE/ g)} = \frac{C \times V}{M} \dots\dots\dots (3.4)$$

Dimana, C = kadar kesetaraan kuersetin (mg/L)

V = volume pengenceran sampel (L)

M = berat isolat (g)

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Preparasi dan Penentuam Kadar Air Sampel Rimpang Jeringau (*Acorus calamus L.*)

Preparasi diawali dengan pencucian dan pemotongan sampel. Selanjutnya, dilakukan pengeringan menggunakan oven untuk menurunkan kandungan air dalam sampel, sehingga proses ekstraksi relatif lebih mudah dan dapat meminimalisir tumbuhnya jamur pada sampel. Pengeringan menggunakan oven dipilih karena dapat memberikan hasil terbaik dibandingkan menggunakan sinar matahari langsung, disebabkan sinar ultraviolet dari matahari dapat meningkatkan potensi kerusakan bahan aktif dalam sampel (Winangsih *et al.*, 2013). Penghalusan sampel dilakukan untuk memperluas permukaan sampel, sehingga proses penetrasi pelarut ke dalam sampel relatif mudah dan cepat (Tambun *et al.*, 2016). Serbuk halus dari sampel rimpang Jeringau diperoleh sebesar 0,38 Kg dari berat sampel awal 2,61 Kg.

Hasil preparasi sampel rimpang Jeringau dilanjutkan dengan analisis kadar air untuk mengetahui kandungan air pada sampel kering rimpang Jeringau. Semakin rendah kadar air suatu sampel, maka proses ekstraksi akan berlangsung lebih mudah dikarenakan gangguan dari molekul air dapat diminimalisir, sehingga pelarut akan lebih mudah menembus dinding sel sampel (Khoiriyah *et al.*, 2014). Hasil analisa kadar air sampel kering rimpang Jeringau pada penelitian ini sebesar 7,80%. Hal tersebut menunjukkan bahwa kadar air pada sampel telah memenuhi standar yang ditetapkan oleh Depkes RI (2008) bahwa batas maksimum kadar air yang disyaratkan untuk sampel berupa serbuk simplisia adalah 10%. Hasil kadar

air rimpang Jeringau yang diperoleh tersebut tidak berbeda jauh dengan penelitian sebelumnya, yaitu Neha *et al.* (2012) yang menentukan kadar air rimpang Jeringau menggunakan metode termogravimetri, diperoleh nilai sebesar 7,20%.

#### **4.2 Rendemen Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) Hasil Ekstraksi dan Partisi**

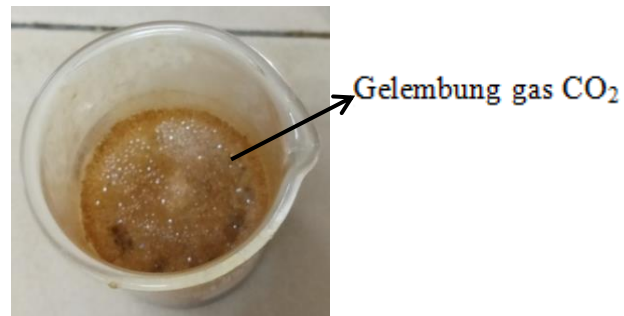
Proses penarikan senyawa target dalam rimpang Jeringau dilakukan dengan metode ekstraksi ultrasonik. Adanya gelombang ultrasonik yang merambat melalui medium yang dilewati akan menimbulkan getaran dan menyebabkan terbentuknya gelembung kavitasi yang memicu perubahan tekanan dan suhu. Dengan demikian, kontak permukaan pelarut dengan senyawa target akan meningkat, sehingga senyawa target akan larut lebih cepat (Tungmunithum *et al.*, 2020). Ekstraksi ultrasonik rimpang Jeringau dilakukan dengan pelarut etanol 70% yang merupakan pelarut polar dengan nilai konstanta dielektrikum 24,30. Pemilihan etanol 70% bertujuan untuk memaksimalkan proses ekstraksi karena senyawa target pada sampel terikat pada gugus glikosida yang mudah larut dalam pelarut polar. Proses ekstraksi menghasilkan cairan kental berwarna coklat kehitaman seperti ditunjukkan Gambar 4.1 dengan nilai rendemen sebesar 18,73% dari 30 g sampel. Kusuma (2021) mengekstrak rimpang Jeringau menggunakan metode ultrasonik dengan pelarut etanol p.a dan diperoleh rendemen sebesar 14,37% dari 30 g sampel. Sedangkan, Masduqi & Rahardhian (2021) mengekstrak rimpang Jeringau dengan metode perkolasi dan pelarut etanol 70%, diperoleh rendemen sebesar 8,3% dari 60 g sampel. Perbedaan hasil rendemen dengan Kusuma (2021) terjadi karena perbedaan jenis pelarut yang digunakan. Pada

etanol 70% terdapat kandungan air sebanyak 30% yang menyebabkan sifat kepolaran etanol meningkat sehingga senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar lebih terekstrak dengan baik. Perbedaan hasil rendemen dengan Masduqi & Rahardhian (2021) terjadi karena perbedaan metode ekstraksi yang digunakan. Hal ini membuktikan bahwa metode ekstraksi ultrasonik dapat meningkatkan rendemen sampel akibat adanya kavitasi yang menyebabkan efek penetrasi pelarut meningkat sehingga senyawa target dapat terekstrak dengan maksimal.



Gambar 4.1 Ekstrak pekat etanol 70% rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Sampel hasil ekstraksi selanjutnya dihidrolisis untuk memutus ikatan glikon dan aglikon yang umumnya terdapat dalam bentuk glikosida pada senyawa metabolit sekunder. Hidrolisis dengan katalis HCl 2 N yang disertai pengadukan selama 1 jam pada suhu ruang bersifat bolak-balik (*reversible*), sehingga perlu dilakukan penetralan menggunakan  $\text{NaHCO}_3$  untuk menghentikan reaksi hidrolisis lanjut yang mungkin dapat merusak senyawa yang ditargetkan. Proses penetralan menghasilkan busa berupa gas  $\text{CO}_2$  yang mengindikasikan adanya reaksi antara HCl dengan  $\text{NaHCO}_3$  seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.2. Penambahan  $\text{NaHCO}_3$  dihentikan ketika telah tercapai pH 7 (netral). Hasil hidrolisis berupa larutan berwarna coklat pekat tanpa gelembung-gelembung busa.



Gambar 4.2 Pembentukan gas CO<sub>2</sub> pada reaksi hidrolisis

Hasil hidrolisis dipisahkan lebih lanjut melalui proses partisi menggunakan pelarut etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut yang bersifat semi polar dengan nilai konstanta dielektrikum 6,02 sehingga dimungkinkan dapat menarik metabolit sekunder yang bersifat polar maupun nonpolar. Markham (1981) menjelaskan bahwa ekstraksi dengan menggunakan pelarut etil asetat dapat mengikat flavonoid dengan kepolaran rendah seperti flavon metil, isoflavon, flavonol, dan flavanon. Proses partisi menghasilkan dua lapisan yang tidak saling campur disebabkan adanya perbedaan massa jenis dari etil asetat dan air. Etil asetat memiliki massa jenis sebesar 0,902 g/mL, sedangkan air memiliki massa jenis sebesar 1 g/mL (Mulyono, 2012), sehingga air berada di lapisan bawah (fasa air) dan etil asetat berada di lapisan atas (fasa organik). Fasa air yang dihasilkan dipartisi kembali hingga 3 kali untuk memaksimalkan penarikan senyawa metabolit sekunder oleh etil asetat. Fraksi etil asetat rimpang Jeringau berbentuk agak liat, berwarna coklat, dan beraroma khas etil asetat. Rendemen rata-rata fraksi etil asetat rimpang Jeringau pada penelitian ini sebesar 10,80% dari 5 g sampel. Srividya *et al.* (2014) melakukan fraksinasi pada ekstrak metanol rimpang Jeringau menggunakan pelarut etil asetat dan diperoleh rendemen sebesar 12% dari 10 g sampel.

Tabel 4.1 Rendemen hasil ekstraksi dan partisi rimpang Jeringau

Pelarut	Berat Sampel (g)	Warna	Rendemen (%)
Etanol 70% (ekstraksi)	30	Coklat kehitaman	18,73
Etil asetat (partisi)	5	Coklat	10,80

### 4.3 Uji Fitokimia Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa metabolit sekunder yang meliputi flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, steroid, dan terpenoid pada sampel ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau secara kualitatif. Hasil uji fitokimia rimpang Jeringau ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil uji fitokimia rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Senyawa Metabolit Sekunder	Warna Sebelum	Perubahan Warna (Reaksi Positif) (Hanani, 2014)	Perubahan Warna	
			Ekstrak Etanol 70%	Fraksi Etil Asetat
Flavonoid	Coklat	Merah, jingga, kuning	Orange	Kuning
Alkaloid				
- Meyer	Coklat	Endapan jingga	Endapan kuning	Endapan coklat
- Dragendorff	Coklat	Endapan putih	Endapan putih	Endapan coklat
Tanin	Coklat	Hijau/biru kehitaman	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman
Saponin	Coklat	Terbentuk busa	Kuning tanpa busa	Kuning tanpa busa
Steroid	Coklat	Cincin hijau/biru	Cincin coklat	Hitam
Terpenoid	Coklat	Cincin coklat	Cincin coklat	Hitam

#### 4.3.1 Uji Flavonoid

Pengujian senyawa flavonoid pada ekstrak etanol 70% menunjukkan reaksi positif flavonoid yang ditandai dengan adanya perubahan warna dari coklat kemerahan menjadi orange. Perubahan warna tersebut terjadi karena adanya kompleks yang merupakan garam benzopirilium (garam flavilium) hasil reduksi



logam Mg dan HCl pada inti benzopiron dari struktur flavonoid (Ergina *et al.*, 2014). Dugaan reaksi flavonoid dengan logam Mg dan HCl pekat ditunjukkan pada Gambar 2.3. Sesuai dengan hasil penelitian Masduqi & Rahardhian (2021) yang melakukan skrining fitokimia pada ekstrak etanol 70% rimpang Jeringau diperoleh hasil positif mengandung flavonoid, yang menunjukkan bahwa flavonoid dapat larut dalam etanol 70%. Riwanti *et al.* (2018) menjelaskan bahwa etanol memiliki gugus hidroksil (OH) yang dapat membentuk suatu ikatan hidrogen dengan gugus hidroksil (OH) dari senyawa flavonoid, sehingga mampu meningkatkan kelarutan senyawa flavonoid dalam etanol. Padmasari *et al.* (2013) juga mengungkapkan bahwa flavonoid dapat diekstraksi dengan etanol 70%.

Pengujian flavonoid pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau menunjukkan reaksi positif dengan adanya perubahan warna dari coklat kekuningan menjadi kuning. Saman (2013) melakukan skrining fitokimia pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau dan menunjukkan hasil positif mengandung senyawa flavonoid. Hal tersebut dimungkinkan senyawa flavonoid berada dalam bentuk aglikonnya, sehingga memiliki sifat kurang polar dan cenderung lebih mudah larut dalam pelarut non polar (Hanani, 2014). Dalam hal ini pelarut etil asetat merupakan pelarut semi polar, sehingga dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar. Dengan demikian, senyawa flavonoid pada rimpang Jeringau baik yang bersifat polar maupun non polar dapat terekstraksi lebih efektif. Selain itu, Muhridja *et al.* (2016) menguatkan bahwa beberapa jenis flavonoid seperti isoflavon, flavanon, flavon, dan flavanol memiliki sifat semi polar, sehingga cenderung larut dalam pelarut semi polar seperti etil asetat. Hasil identifikasi senyawa flavonoid secara kualitatif ditunjukkan pada Gambar 4.3.



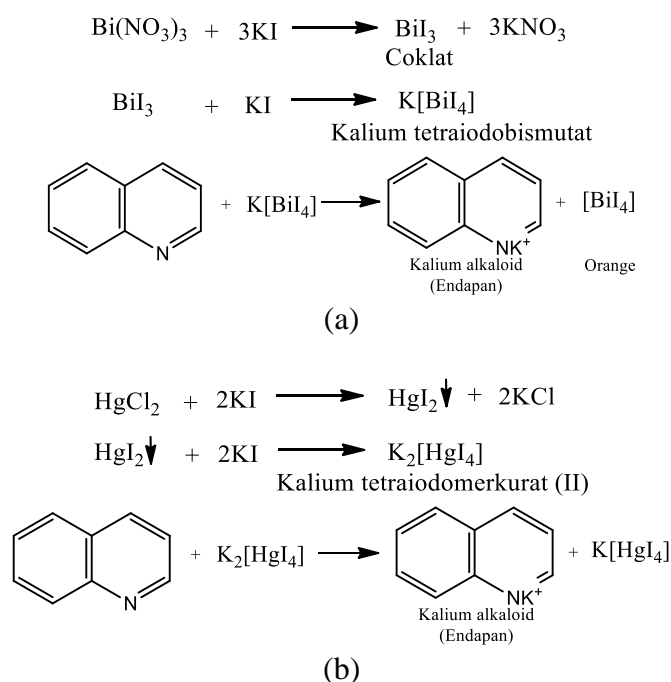
Gambar 4.3 Hasil uji fitokimia golongan flavonoid (a) ekstrak etanol 70%, (b) fraksi etil asetat

Berdasarkan Gambar 4.3 dapat diketahui bahwa pengujian senyawa flavonoid pada ekstrak etanol 70% menghasilkan warna kuning yang lebih pekat dibandingkan pada fraksi etil asetat. Hal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol 70% lebih banyak dibandingkan pada fraksi etil asetat. Mondong *et al.* (2015) menjelaskan bahwa pada pengujian secara kualitatif, warna yang dihasilkan dapat mempengaruhi kandungan flavonoid dalam suatu sampel. Pada ekstrak etanol 70% flavonoid berada dalam bentuk glikosidanya yang terdiri dari gugus glikon yang cenderung bersifat polar dan gugus aglikon yang cenderung bersifat semi polar. Sedangkan, pada fraksi etil asetat ikatan glikosida flavonoid telah terputus dan hanya terdapat gugus aglikon flavonoid. Dengan demikian, komponen polar yang terdapat pada sampel akan berkurang dan pada fraksi etil asetat hanya tersisa aglikon flavonoid yang bersifat semi polar, sehingga warna kuning yang dihasilkan tidak terlalu pekat karena kandungan flavonoidnya yang menurun (Mondong *et al.*, 2015).

### 4.3.2 Uji Alkaloid

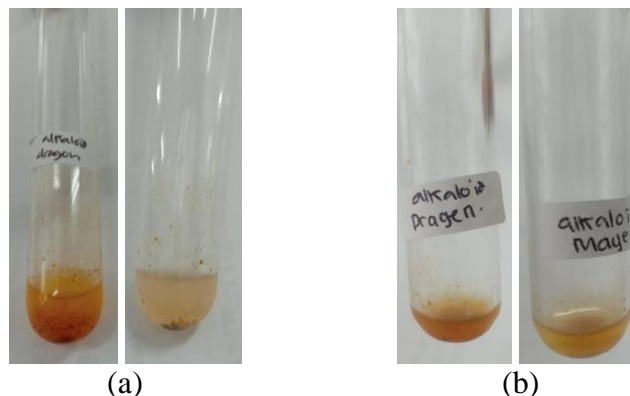
Identifikasi alkaloid pada penelitian ini dilakukan menggunakan reagen Dragendorff dan reagen Mayer untuk memperkuat dugaan positif tidaknya senyawa alkaloid pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau. Hal tersebut disebabkan pada sampel berbeda, alkaloid memiliki kemampuan mengikat logam pereaksi yang berbeda. Beberapa logam yang dapat bereaksi dengan senyawa alkaloid yaitu merkuri, bismuth, iod, dan tungsten. Reagen Dragendorff terdiri dari logam merkuri klorida dan bismuth nitrat dalam nitrit berair, sedangkan reagen Mayer mengandung merkuri klorida dan kalium iodida (Tarakanita *et al.*, 2019). Perbedaan jenis logam dalam reagen-reagen tersebut dapat memberikan sensitifitas yang berbeda terhadap gugus alkaloid, sehingga perlu dilakukan pengujian menggunakan kedua reagen tersebut untuk memperkuat dugaan bahwa sampel mengandung senyawa alkaloid.

Hasil penelitian menunjukkan reaksi positif alkaloid pada ekstrak etanol 70% yang ditandai dengan adanya endapan kuning kecoklatan pada reagen Dragendorff dan endapan putih kekuningan pada reagen Mayer seperti ditunjukkan pada Gambar 4.5a. Terbentuknya endapan tersebut disebabkan adanya reaksi penggantian ligan antara atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada senyawa alkaloid dengan ion  $K^+$  baik pada reagen Dragendorff maupun pada reagen Mayer (Padmasari *et al.*, 2013). Reaksi dugaan alkaloid dengan reagen Dragendorff dan Mayer ditunjukkan pada Gambar 4.4. Hasil pengujian tersebut sesuai dengan penelitian Anisah *et al.* (2014) yang melakukan skrining fitokimia pada ekstrak etanol rimpang Jeringau dan menunjukkan hasil positif mengandung senyawa alkaloid.



Gambar 4.4 Reaksi dugaan senyawa alkaloid dengan (a) reagen Dragendorff  
(b) reagen Mayer (Nugrahani *et al.*, 2016)

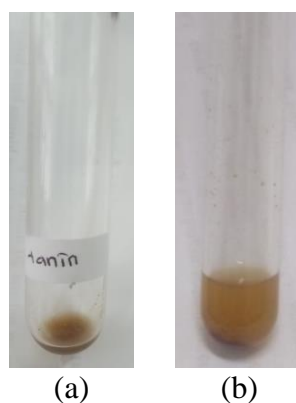
Hasil pengujian senyawa alkaloid pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau menunjukkan reaksi negatif dengan tidak terbentuknya endapan. Hasil negatif tersebut disebabkan pelarut etil asetat merupakan pelarut semi polar sehingga sukar menarik alkaloid yang bersifat polar (Septyaningsih, 2010). Fithrony (2021) melakukan uji fitokimia pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau dan diperoleh hasil negatif senyawa alkaloid. Hasil identifikasi senyawa alkaloid pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau ditunjukkan pada Gambar 4.5b. Enderini (2016) menjelaskan garam alkaloid memiliki sifat yang berbeda dengan alkaloid bebas dalam bentuk basa. Alkaloid dalam bentuk basa tidak larut dalam air tetapi mudah larut dalam pelarut semi polar seperti benzena dan eter, sementara dalam bentuk garamnya alkaloid mudah larut dalam pelarut polar, sehingga dapat diduga bahwa alkaloid dalam rimpang Jeringau merupakan alkaloid dalam bentuk garamnya karena reaksi positif hanya ditunjukkan pada pelarut yang bersifat polar.



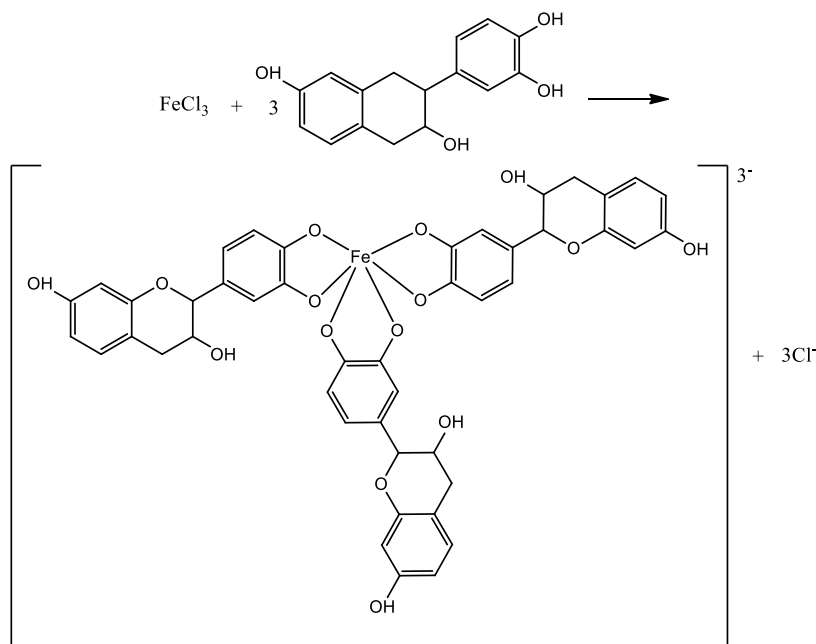
Gambar 4.5 Hasil uji fitokimia alkaloid (a) ekstrak etanol 70%, (b) fraksi etil asetat

### 4.3.3 Uji Tanin

Pengujian senyawa tanin pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau dilakukan dengan menambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$  1% yang bertujuan agar salah satu gugus hidroksil pada senyawa tanin dapat membentuk kompleks dengan ion  $\text{Fe}^{3+}$ , sehingga ada tidaknya gugus fenol dalam sampel dapat diketahui. Senyawa kompleks yang terbentuk akan memberikan perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru tua dan pembentukan endapan sebagai ciri sampel positif mengandung tanin (Sangi *et al.*, 2012). Reaksi pembentukan kompleks antara tanin dengan ion  $\text{Fe}^{3+}$  ditunjukkan pada Gambar 4.7.



Gambar 4.6 Hasil uji fitokimia tanin (a) ekstrak etanol 70%, (b) fraksi etil asetat



Gambar 4.7 Reaksi antara senyawa tanin dengan  $\text{FeCl}_3$  (Ergina *et al.*, 2014)

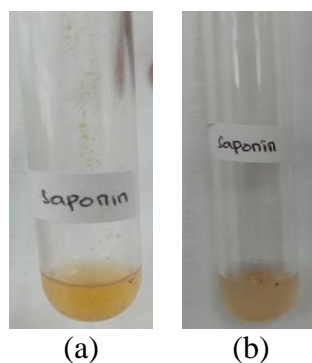
Pengujian senyawa tanin pada ekstrak etanol 70% rimpang Jeringau menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya endapan dan perubahan warna sampel dari larutan berwarna coklat menjadi hijau kehitaman, yang mengindikasikan adanya tanin terkondensasi. Tanin merupakan senyawa makromolekul dari senyawa polifenol yang bersifat polar, sehingga dapat larut dalam pelarut polar (Harbone, 1987; Padmasari *et al.*, 2013). Hasil penelitian sesuai dengan pengujian Masduqi & Rahardhian (2021) yang mengeskrak rimpang Jeringau menggunakan pelarut etanol 70% dan menunjukkan hasil positif mengandung senyawa tanin.

Pengujian tanin pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau menunjukkan hasil positif dengan adanya endapan dan perubahan warna menjadi hijau kehitaman. Muthulakshmi *et al.* (2015) melakukan skrining fitokimia pada ekstrak etil asetat rimpang Jeringau dan diperoleh hasil positif mengandung senyawa tanin. Putri & Lubis (2020) menjelaskan bahwa pelarut etil asetat mampu menarik tanin karena

adanya gugus hidroksil pada tanin berikatan dengan gugus metoksil atau gugus hidroksil pada pelarut etil asetat. Hasil identifikasi senyawa tanin pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau ditunjukkan pada Gambar 4.6.

#### 4.3.4 Uji Saponin

Pengujian senyawa saponin dilakukan dengan metode Forth, yaitu hidrolisis saponin dalam air. Hasil positif saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa (Sangi *et al.*, 2012), namun pada penelitian ini sampel tidak memiliki kemampuan membentuk busa, sehingga pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau dianggap negatif mengandung senyawa saponin. Penelitian terdahulu menunjukkan hasil serupa yaitu reaksi negatif senyawa saponin baik pada ekstrak etanol rimpang Jeringau (Anisah *et al.*, 2014) maupun pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau (Saman, 2013). Rachman *et al.* (2015) menjelaskan bahwa senyawa saponin mudah larut dalam air dan sukar larut dalam pelarut semi polar. Dalam hal ini, saponin lebih efektif diekstraksi dengan pelarut metanol karena memiliki sifat polar. Hasil identifikasi senyawa saponin pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau ditunjukkan pada Gambar 4.8.



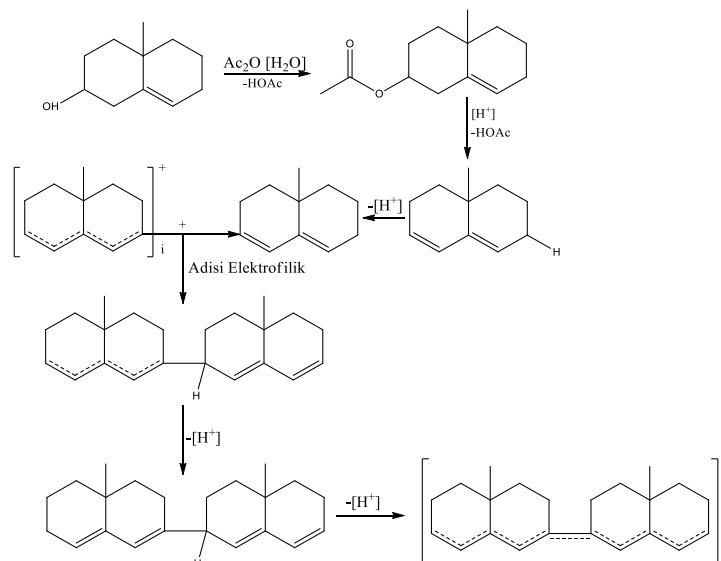
Gambar 4.8 Hasil uji fitokimia saponin (a) ekstrak etanol 70%, (b) fraksi etil asetat

#### 4.3.5 Uji Steroid dan Terpenoid

Pengujian senyawa steroid dan terpenoid dilakukan menggunakan reagen *Lieberman-Burchard* yang terdiri dari kloroform, asam asetat anhidrat, dan asam sulfat. Hasil pengujian senyawa steroid dan terpenoid pada ekstrak etanol 70% rimpang Jeringau menunjukkan reaksi positif terpenoid yang ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan diantara 2 pelarut dengan dugaan reaksi ditampilkan pada Gambar 4.9, sedangkan hasil pengujian pada fraksi etil asetat menunjukkan reaksi negatif dengan tidak terbentuknya cincin. Hal tersebut disebabkan pada tahap ekstraksi senyawa terpenoid dalam sampel terikat pada gugus glikosida sehingga mudah larut dalam pelarut polar. Setelah terputus dari ikatan glikosidanya, baik steroid maupun terpenoid cenderung bersifat non polar dan mudah larut dalam pelarut non polar, sehingga pada tahap partisi dengan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar, kedua senyawa tersebut tidak larut dan menunjukkan reaksi negatif. Taofik *et al.* (2010) menjelaskan bahwa sifat polar dari steroid dan terpenoid didasari oleh adanya gugus hidroksi, sedangkan sifat non polar disebabkan adanya susunan rantai panjang hidrokarbon C<sub>30</sub>.

Hasil pengujian pada penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Masduqi & Rahardhian (2021) yang melakukan skrining fitokimia pada ekstrak etanol 70% rimpang Jeringau dan menunjukkan reaksi positif pada senyawa terpenoid. Hasil serupa juga ditunjukkan pada penelitian Febrianti *et al.* (2018) yang melakukan skrining fitokimia pada ekstrak etanol rimpang Jeringau dan diperoleh hasil positif mengandung senyawa terpenoid. Adapun hasil identifikasi senyawa steroid dan terpenoid ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau ditunjukkan pada Gambar 4.10.





Gambar 4.9 Dugaan reaksi terpenoid dengan pereaksi *Liebermann-Burchard* (Siadi, 2012)



Gambar 4.10 Hasil uji fitokimia steroid dan terpenoid (a) ekstrak etanol 70%, (b) fraksi etil asetat

#### 4.4 Isolasi Flavonoid dengan Kromatografi Kolom Gradien Eluen

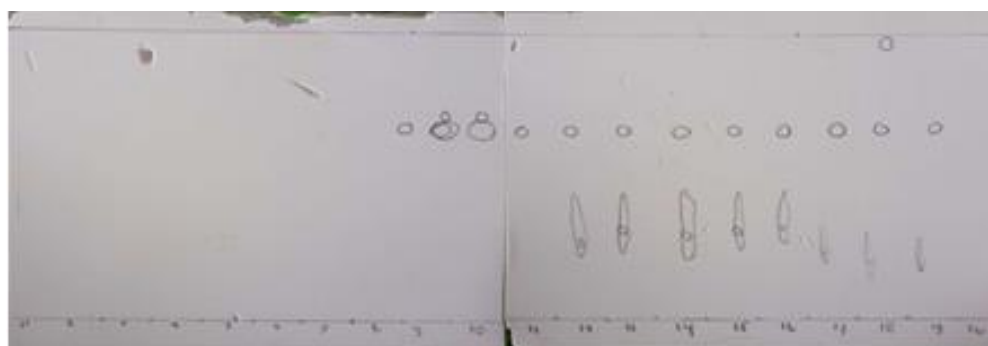
Pemisahan senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam berupa silika gel dan fase gerak berupa eluen yang terdiri dari n-heksana 100%, n-heksana:etil asetat (7:3), n-heksana:etil asetat (6:4), etil asetat 100%, etil asetat:metanol (7:3), etil asetat:metanol (6:4), etil asetat:metanol (4:6), dan metanol 100%. Metode elusi yang digunakan adalah gradien eluen yang bertujuan untuk memperoleh

senyawa yang sesuai dengan tingkat kepolaran eluen. Sebelum dilakukan pemisahan, silika gel diaktivasi terlebih dahulu untuk menghilangkan kandungan air dan mengaktifkan gugus hidroksil (-OH). Selanjutnya silika gel dijadikan *slurry* (bubur silika) menggunakan campuran pelarut n-heksana:etil asetat (7:3) untuk menghomogenkan fasa diam dengan fasa gerak agar kerapatannya lebih tinggi, sehingga tidak terdapat celah udara yang dapat mempengaruhi pemisahan.

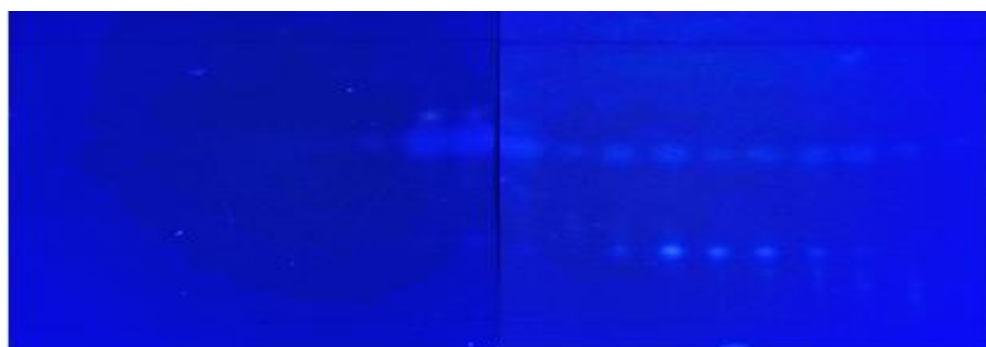
Proses elusi dilakukan secara berurutan dimulai dari eluen non polar hingga polar secara terus-menerus tanpa jeda, sehingga senyawa dalam fraksi etil asetat rimpang Jeringau dapat dipisahkan sesuai dengan tingkat kepolarannya. Senyawa flavonoid yang bersifat non polar akan terelusi lebih dahulu dan keluar dari kolom lebih cepat. Eluat yang keluar ditampung ke dalam vial dan diperoleh 43 vial. Eluat tersebut kemudian dimonitoring menggunakan KLTA dengan fasa diam silika gel F<sub>254</sub> dan fasa gerak n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 7:3. Selanjutnya, diamati dan diidentifikasi bercak noda di bawah lampu UV 366 nm. Identifikasi dilakukan lebih lanjut menggunakan pendeteksi ammonia untuk memperkuat warna noda yang dihasilkan. Beberapa noda yang dihasilkan pada proses monitoring KLTA ditunjukkan pada Gambar 4.11 dan Tabel 4.3.

Berdasarkan Gambar 4.11 dan Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa dari 43 vial hanya 13 vial yang menghasilkan noda pemisahan dan diduga positif mengandung senyawa flavonoid karena menghasilkan bercak noda berwarna ungu, kuning, dan tidak memberikan perubahan yang signifikan terhadap bercak noda setelah dilakukan penyemprotan ammonia pada plat KLT. Hasil positif senyawa flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya bercak noda berwarna hijau kuning, biru, merah jingga, lembayung (Markham, 1981), dan ungu (Djamil & Yenni,

2014; Rusdi *et al.*, 2018) baik sebelum maupun sesudah diuapi ammonia di bawah lampu UV 366 nm. Namun, pada pengujian fitokimia vial 9 dan 10 menunjukkan reaksi negatif flavonoid dan positif tanin. Hal tersebut mengindikasikan tanin yang terkandung dalam isolat merupakan tanin terkondensasi yang terbentuk dari kondensasi flavonoid golongan flavan-3-ols. Asumsi tersebut diperkuat dengan hasil uji fitokimia tanin pada fraksi etil asetat yang direaksikan dengan  $\text{FeCl}_3$  dan menunjukkan perubahan warna hijau kehitaman yang merupakan warna khas dari tanin terkondensasi (Bruneton, 1999; Lisan & Palupi, 2015). Pada tanaman berbeda, senyawa tanin terkondensasi berupa flavan-3,6,7,4',5'-pentaol memiliki nilai  $R_f$  0,68 (Hayati *et al.*, 2010), dan nilai  $R_f$  tersebut sesuai dengan hasil monitoring KLTA yang dilakukan pada penelitian ini.



(a)



(b)

Gambar 4.11 Hasil monitoring KLTA isolat hasil kromatografi kolom gradien eluen (a) pengamatan secara langsung, (b) pengamatan di bawah UV 366 nm

Tabel 4.3 Hasil monitoring KLTA isolat hasil kromatografi kolom gradien eluen

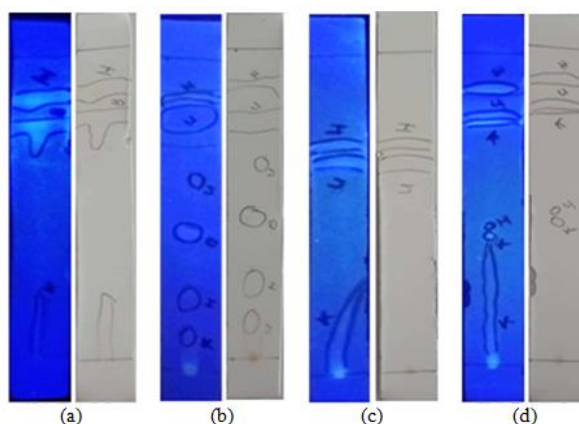
Vial	Warna Noda (UV $\lambda$ 366 nm)	Jarak (cm)		Rf	Dugaan Senyawa
		Noda	Eluen		
08	Ungu	5,3	8	0,663	Flavonol
09	Kuning	5,5	8	0,688	Flavan-3-ols
	Ungu	5,1		0,638	Flavanon
10	Kuning	5,5	8	0,688	Flavan-3-ols
	Ungu	5,1		0,638	Flavanon
11	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
12	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
13	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
14	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
15	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
16	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
17	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
18	Ungu	7,5	8	0,938	-
	Ungu	5,2		0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
19	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
20	Ungu berekor	-	8	-	-

Hasil tersebut menunjukkan bahwa isolat flavonoid yang berhasil ditampung dalam vial belum murni dan dapat dikatakan pemisahan yang dilakukan gagal. Salah satu faktor penyebab kegagalan isolasi tersebut yaitu laju alir yang terlalu cepat sehingga eluat tertampung lebih banyak dan diduga senyawa flavonoid yang terelusi tercampur dengan senyawa lain. Fitri (2017) mengungkapkan bahwa kecepatan laju alir terbaik dalam pemisahan dengan kromatografi kolom adalah 2 mL/menit, sedangkan pada penelitian ini laju alir yang diaplikasikan adalah 5 mL/menit. Dengan demikian, dilakukan identifikasi lebih lanjut menggunakan KLTA dengan eluen yang memberikan pola pemisahan

pada proses monitoring untuk mengetahui perbandingan eluen terbaik yang dapat memisahkan senyawa flavonoid dalam fraksi etil asetat rimpang Jeringau.

#### 4.5 Isolasi Flavonoid dengan KLTA

Pemisahan senyawa flavonoid dengan KLTA dilakukan untuk mencari variasi eluen terbaik yang dapat memisahkan senyawa flavonoid dalam fraksi etil asetat rimpang Jeringau. Variasi eluen yang digunakan merujuk pada hasil kromatografi kolom gradien eluen, yaitu eluen yang dapat memberikan bercak noda pemisahan pada plat KLT, diantaranya n-heksana-etil asetat (7:3) dan n-heksana-etil asetat (6:4). Selain itu, dilakukan pemisahan dengan variasi eluen yang bersifat lebih non polar yaitu n-heksana-etil asetat (8:2) dan eluen yang bersifat lebih polar yaitu n-heksana-etil asetat (4:6) untuk memperkuat pemilihan eluen yang dapat memberikan pemisahan terbaik pada senyawa flavonoid dalam rimpang Jeringau. Pola pemisahan dengan variasi eluen pada plat KLT ketika diamati di bawah lampu UV 366 nm ditunjukkan pada Gambar 4.12 dengan data identifikasi dugaan senyawa flavonoid dirangkum pada Tabel 4.4.



Gambar 4.12 Hasil KLTA senyawa flavonoid dengan eluen (a) n-heksana:etil asetat (8:2), (b) n-heksana:etil asetat (7:3), (c) n-heksana:etil asetat (6:4), dan (d) n-heksana:etil asetat (4:6)

Tabel 4.4 Dugaan senyawa flavonoid fraksi etil asetat dengan variasi eluen

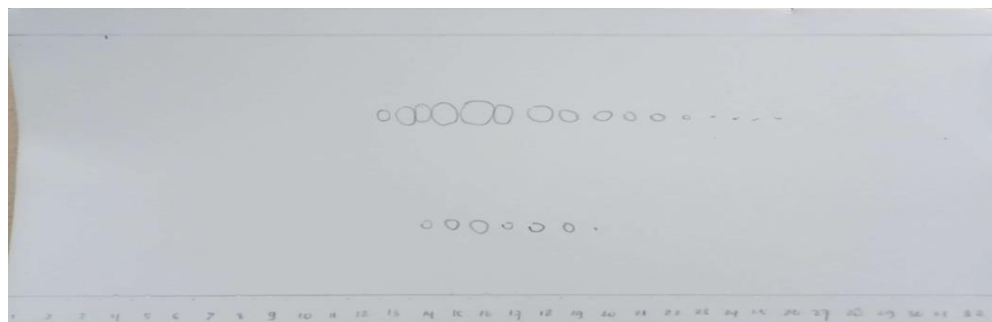
No	Fasa Gerak	Jarak (cm)		Rf	Warna Noda (UV $\lambda$ 366 nm)	Dugaan Senyawa
		Noda	Eluen			
1.	n-heksana- etil asetat (8:2)	-	8	-	Kuning	-
		-	8	-	Biru	-
		7	8	0,875	Hijau	Flavanon
2.	n-heksana- etil asetat (7:3)	0,6	8	0,075	Kuning	Flavonol
		1,6	8	0,200	Hijau	Flavonol
		3,3	8	0,412	Biru	Isoflavon
		4,75	8	0,593	Ungu	Flavon/flavonol
		6,1	8	0,762	Ungu	Flavon
		7	8	0,875	Hijau	Flavanon
3.	n-heksana- etil asetat (6:4)	-	8	-	Kuning	-
		5,3	8	0,662	Ungu	Flavon
		5,7	8	0,712	Hijau	Flavanon
4.	n-heksana- etil asetat (4:6)	-	8	-	Kuning	-
		3,3	8	0,412	Kuning	Flavonol
		3,6	8	0,450	Hijau	Flavanon
		6,3	8	0,787	Kuning	Flavonol
		6,4	8	0,800	Ungu	Flavon
		7	8	0,875	Hijau	Flavanon

Berdasarkan Gambar 4.12 dan Tabel 4.4 diketahui bahwa terdapat beberapa noda terduga flavonoid dengan pola pemisahan yang berbeda pada masing-masing plat KLT. Azah (2019) menjelaskan bahwa eluen terbaik merupakan eluen yang dapat memisahkan senyawa dengan menghasilkan noda yang tidak berekor dan jarak antara satu noda dengan noda lainnya tidak tumpang tindih. Pada penelitian ini, eluen n-heksana-etil asetat (7:3) menghasilkan jumlah noda terduga flavonoid terbanyak dengan pola pemisahan terbaik, karena adanya jarak yang jelas antar noda yang terbentuk dan tidak adanya ekor pada noda yang diduga flavonoid. Sementara eluen n-heksana-etil asetat (6:4), n-heksana-etil asetat (4:6), dan etil asetat:metanol (6:4) menghasilkan noda yang diduga merupakan senyawa flavonoid, namun menghasilkan pola pemisahan dengan jarak yang tidak teratur dan membentuk noda yang berekor. Dengan demikian, eluen yang dipilih untuk

proses pemisahan senyawa flavonoid pada kromatografi kolom non gradien adalah n-heksana-etil asetat (7:3).

#### **4.6 Isolasi Flavonoid dengan Kromatografi Kolom Non Gradien Eluen**

Kromatografi kolom non gradien eluen merupakan metode pemisahan dengan proses dan tujuan yang sama dengan kromatografi kolom gradien eluen yaitu untuk menarik senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat rimpang Jeringau melalui proses elusi. Perbedaan keduanya ialah variasi eluen yang digunakan pada proses elusi. Proses elusi pada kromatografi kolom non gradien hanya menggunakan satu perbandingan eluen, yaitu eluen terbaik hasil KLTA n-heksana:etil asetat (7:3). Pemisahan dilakukan pada sampel hasil partisi berupa fraksi etil asetat rimpang jeringau sebanyak 67 mg dan dielusi menggunakan pelarut n-heksana:etil asetat (7:3) sebanyak 270 mL. Eluet ditampung dalam botol vial dengan laju alir 2 mL/menit yang bertujuan untuk menghindari tercampurnya senyawa yang telah dipisahkan (Pramitania, 2019), dan dihasilkan eluet sebanyak 107 vial. Eluet tersebut kemudian dimonitoring menggunakan KLTA untuk mengidentifikasi dugaan jenis senyawa flavonoid yang terkandung dalam eluat berdasarkan nilai  $R_f$  dan warna noda yang muncul setelah disinari lampu UV 366 nm. Monitoring dilakukan dengan fase diam berupa silika gel F<sub>254</sub> yang berada pada plat dan eluen berupa n-heksana:etil asetat (7:3). Monitoring KLTA pada isolat hasil kromatografi kolom non gradien eluen menunjukkan terdapat 13 vial yang menghasilkan warna noda dan nilai  $R_f$  sama yang mengindikasikan bahwa senyawa pada isolat memiliki karakteristik yang sama. Hasil identifikasi noda dugaan senyawa flavonoid ditunjukkan pada Gambar 4.12 dan Tabel 4.5.



(a)



(b)

Gambar 4.13 Hasil monitoring KLTA isolat hasil kromatografi kolom non gradien eluen (a) pengamatan secara langsung, (b) pengamatan di bawah UV 366 nm

Tabel 4.5 Hasil monitoring KLTA isolat hasil kromatografi kolom non gradien eluen

Vial	Rendemen Sampel Hasil Kolom	Jarak (cm)		<i>R<sub>f</sub></i>	Warna Noda (UV $\lambda$ 366 nm)
		Noda	Eluen		
13	4,03%	5,3	8	0,663	Ungu
14	4,18%	5,3	8	0,663	Ungu
15	4,48%	5,3	8	0,663	Ungu
		2		0,250	
16	5,52%	5,3	8	0,663	Ungu
		2		0,250	
17	5,37%	5,3	8	0,663	Ungu
		2		0,250	
18	4,78%	5,3	8	0,663	Ungu
		2		0,250	
19	5,22%	5,3	8	0,663	Ungu
		2		0,250	
20	4,78%	5,3	8	0,663	Ungu
		2		0,250	
21	3,43%	5,3	8	0,663	Ungu
22	2,39%	5,3	8	0,663	Ungu
23	1,94%	5,3	8	0,663	Ungu
24	3,88%	5,3	8	0,663	Ungu
25	3,28%	5,3	8	0,663	Ungu



Berdasarkan warna noda dan nilai  $R_f$  yang dihasilkan, yaitu warna ungu dengan nilai  $R_f$  sebesar 0,663 dan 0,250 mengindikasikan bahwa senyawa flavonoid merupakan golongan flavonol atau flavon. Hanani (2014) menjelaskan bahwa senyawa golongan flavonol dan flavon akan menghasilkan bercak warna ungu di bawah lampu UV 366 nm dan tidak mengalami perubahan warna ketika direaksikan dengan  $\text{NH}_3$ . Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian ini dimana bercak yang dihasilkan berwarna ungu dan tidak ada perubahan warna yang signifikan pada plat KLT setelah disemprotkan  $\text{NH}_3$ . Beberapa jenis flavonol menunjukkan nilai  $R_f$  sebesar 0,64, 0,66 dan 0,28, sedangkan beberapa jenis flavon menunjukkan nilai  $R_f$  sebesar 0,66 (Harborne, 1987). Hasil penelitian pada tanaman berbeda menunjukkan senyawa positif mengandung flavonoid memiliki bercak noda berwarna ungu pada plat KLT (Nuari *et al.*, 2017; Podungge *et al.*, 2017) dengan nilai  $R_f$  sebesar 0,75 dan 0,625 pada KLT preparatif (Suhendi *et al.*, 2011).

#### **4.7 Perbandingan Hasil Pemisahan Flavonoid Menggunakan Kromatografi Kolom Gradien Eluen dan Non Gradien Eluen**

Pemisahan flavonoid menggunakan metode kromatografi kolom gradien eluen yang dielusi dengan n-heksana, etil asetat, dan metanol menghasilkan 43 vial isolat dari 67 mg sampel fraksi etil asetat rimpang Jeringau dan total eluen sebanyak 240 mL dengan laju alir 5 mL/menit. Hasil monitoring dengan KLTA menunjukkan bahwa senyawa flavonoid dalam fraksi etil asetat rimpang Jeringau menggunakan kromatografi kolom gradien eluen cenderung bersifat non polar-semi polar. Hal tersebut didasarkan pada noda pemisahan yang hanya terbentuk

pada vial 8-20 yang merupakan hasil elusi campuran pelarut n-heksana dan etil asetat (non polar - semi polar) dengan perbandingan n-heksana:etil asetat (7:3) dan n-heksana:etil asetat (6:4), sedangkan pada vial 21-43 yang dielusi menggunakan campuran pelarut etil asetat dan metanol (semi polar - polar) tidak terbentuk noda pemisahan. Hal tersebut diperkuat dengan hasil pengujian fitokimia pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau yang menghasilkan perubahan warna kuning tidak terlalu pekat yang mengindikasikan bahwa sampel hanya mengandung flavonoid semi polar.

Pemisahan flavonoid menggunakan metode kromatografi kolom non gradien eluen menghasilkan 107 vial isolat dari 67 mg sampel fraksi etil asetat rimpang Jeringau dan total eluen sebanyak 270 mL dengan laju alir 2 mL/menit. Elusi dengan n-heksana:etil asetat (7:3) menunjukkan hasil monitoring berupa bercak noda berwarna ungu pada vial 13-25 yang mengindikasikan bahwa isolasi flavonoid menggunakan kromatografi kolom non gradien eluen terelusi hanya pada vial 13-25, sedangkan pada vial 26-107 tidak terbentuk pola pemisahan pada plat KLT. Jumlah isolat terduga flavonoid yang berhasil ditampung pada metode non gradien eluen sama dengan pemisahan pada gradien eluen, yaitu sebanyak 13 vial dan terelusi dengan tingkat kepolaran yang sama yaitu non polar-semi polar. Hendryani *et al.* (2015) menyebutkan bahwa golongan flavonoid yang cenderung bersifat non polar yaitu flavanol dan flavonol. Sedangkan, beberapa jenis flavonoid yang bersifat semi polar terdiri dari isoflavon, flavanon, flavonol yang termetoksilasi, dan flavon (Muhridja *et al.*, 2016).

Namun, pemisahan pada kromatografi kolom gradien eluen menghasilkan noda yang bulat, panjang (berekor), dan tumpang tindih yang menunjukkan bahwa

pemisahan kurang baik sehingga senyawa target tidak terpisah secara sempurna. Sedangkan, noda pemisahan pada kromatografi kolom non gradien eluen berbentuk bulat dan jarak antar noda satu dengan yang lainnya teratur. Mardaneni (2017) dan Masrihanah (2020) menyebutkan bahwa pemisahan senyawa dikatakan baik apabila menghasilkan noda berbentuk bulat, tidak berekor, dan jarak antara noda yang satu dengan yang lainnya terlihat jelas. Sehingga, dapat diketahui bahwa pemisahan menggunakan kromatografi kolom non gradien eluen lebih baik dibandingkan pemisahan menggunakan kromatografi kolom gradien eluen. Hal tersebut disebabkan pada kromatografi kolom gradien eluen, elusi dilakukan menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda dan laju alir yang diaplikasikan lebih besar dibandingkan pada metode non gradien eluen yaitu 5 mL/menit. Dengan demikian, diduga bahwa senyawa yang sebelumnya telah terelusi sesuai dengan tingkat kepolarannya, tercampur dengan hasil elusi berikutnya, karena eluen dengan kepolaran yang berbeda secara bertahap dialiri pada fasa diam dan ditampung dalam jumlah yang cukup banyak.

#### **4.8 Identifikasi Isolat Flavonoid Hasil Kromatografi Kolom dengan FTIR**

Identifikasi menggunakan FTIR bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi yang terkandung dalam suatu senyawa. Gugus fungsi umumnya memiliki ikatan dengan tipe yang berbeda, sehingga setiap gugus fungsi akan mempunyai nilai serapan yang khas. Munculnya spektrum pada FTIR disebabkan adanya interaksi sampel dengan radiasi inframerah yang memiliki dampak berupa vibrasi molekul dalam sampel yang menghasilkan penyerapan dan/atau transmisi energi. Vibrasi molekul yang dapat mengubah momen dipol dalam senyawa akan muncul sebagai

spektrum pada FTIR. Spektrum FTIR dari hasil isolat hasil kromatografi kolom ditunjukkan pada Gambar 4.14 dan interpretasinya dirangkum pada Tabel 4.6.

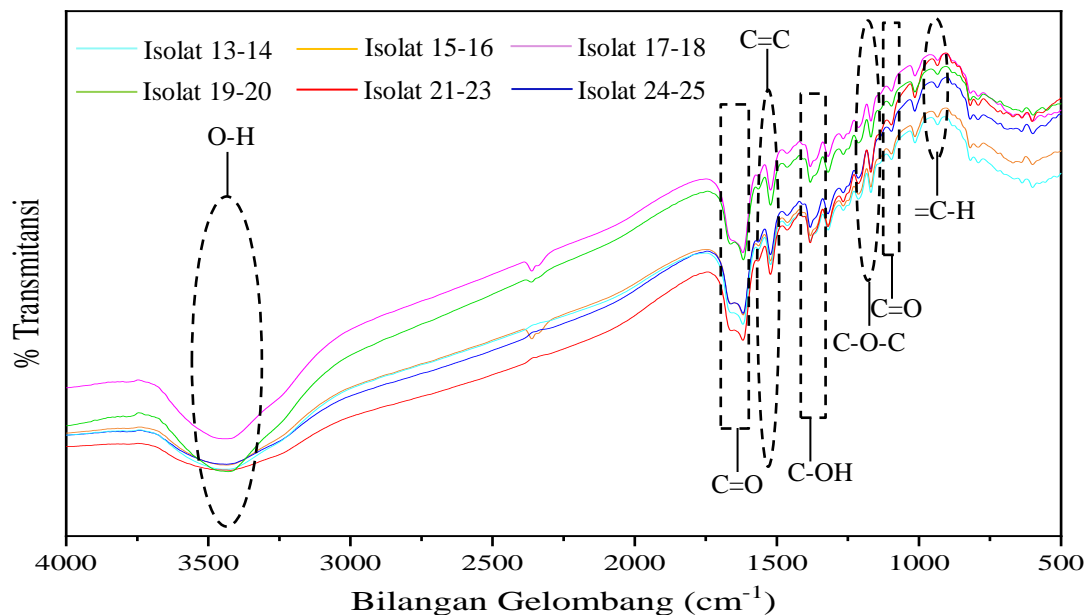
Berdasarkan Gambar 4.14 dan Tabel 4.6 dapat diketahui bahwa keenam isolat yang diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR memiliki gugus –OH terikat dengan bentuk pita melebar pada bilangan gelombang  $3447\text{ cm}^{-1}$  (isolat 13-14),  $3435\text{ cm}^{-1}$  (isolat 15-16),  $3437\text{ cm}^{-1}$  (isolat 17-18),  $3431\text{ cm}^{-1}$  (isolat 19-20),  $3422\text{ cm}^{-1}$  (isolat 21-23), dan  $3436\text{ cm}^{-1}$  (isolat 24-25), selain itu terdapat vibrasi ulur C-O alkohol sekunder pada daerah  $1098\text{ cm}^{-1}$  (isolat 13-14, 15-16, 17-18, 19-20) dan  $1099\text{ cm}^{-1}$  (isolat 20-23 dan 24-25). Kedua serapan tersebut mengindikasikan adanya gugus OH alkohol yang terikat pada atom karbon dengan posisi ikatan sekunder. Pada daerah  $1390 - 1330\text{ cm}^{-1}$  terdapat vibrasi ulur C-O dari gugus fenol yang merupakan senyawa aromatik. Adanya gugus aromatik pada isolat diperkuat dengan serapan pada rentang  $1525 - 1470\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya gugus C=C aromatik sebagai gugus kromofor yang khas dari flavonoid dalam sistem ikatan terkonjugasi. Selain itu, pada daerah  $934\text{ cm}^{-1}$  (isolat 13-14, 17-18) dan  $935\text{ cm}^{-1}$  (isolat 15-16, 19-20, 21-23, 24-25) terdapat vibrasi tekuk gugus =C-H (alkena), dan pada daerah  $790\text{ cm}^{-1}$  (isolat 13-14),  $816\text{ cm}^{-1}$  (isolat 15-16),  $815\text{ cm}^{-1}$  (isolat 17-18),  $817\text{ cm}^{-1}$  (isolat 19-20, 21-23, dan 24-25) menunjukkan adanya gugus C-H aromatik. Gugus alkena yang terkandung dalam isolat mengindikasikan bahwa gugus aromatik pada isolat membentuk ikatan tak jenuh (ikatan rangkap). Selain itu, pada rentang bilangan gelombang  $1310 - 1020\text{ cm}^{-1}$  semua isolat menunjukkan serapan yang sama yaitu daerah  $1168\text{ cm}^{-1}$  yang mengindikasikan adanya regangan dari gugus C-O-C. Pada daerah  $1619\text{ cm}^{-1}$  (isolat 13-14, 17-18, 21-23),  $1618\text{ cm}^{-1}$  (isolat 15-16, 24-25),

dan  $1617\text{ cm}^{-1}$  (isolat 19-20) terdapat vibrasi ulur C=O keton yang berasal dari gugus karbonil, yang merupakan gugus fungsi khas dari senyawa flavonoid.

Interpretasi tersebut diperkuat dengan hasil identifikasi Silva *et al.* (2014) dan Rajhard *et al.* (2021) yang mengungkapkan bahwa senyawa flavonoid memiliki serapan khas pada daerah  $3375 - 3324\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya vibrasi ulur O-H, daerah  $1660 - 1466\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya ikatan C=C aromatik, daerah  $1261 - 1066\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi ulur dari gugus C-O-C, dan pada daerah  $1281 - 1278\text{ cm}^{-1}$  dan  $1071 - 1022\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-OH. Selain itu, hasil identifikasi pada tanaman berbeda menunjukkan serapan khas senyawa flavonoid pada daerah  $3409 - 3369\text{ cm}^{-1}$  (gugus O-H ulur),  $1665 - 1658\text{ cm}^{-1}$  (gugus C=O ulur),  $1611 - 1606\text{ cm}^{-1}$  (gugus C=C ulur),  $1271 - 1143\text{ cm}^{-1}$  (gugus C-O ulur) (Fitrya, 2011; Horizon *et al.*, 2015) dan berdasarkan pengujian NMR diketahui gugus-gugus tersebut merupakan gugus fungsi dari senyawa flavonoid jenis 3,3,4,5,7-pentahidroksi flavon atau kuersetin (Horizon *et al.*, 2015).

Tabel 4.6 Interpretasi spektra FTIR isolat hasil kromatografi kolom

Bilangan Gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )						Literatur (Socrates, 1994)	Gugus Fungsi
13-14	15-16	17-18	19-20	21-23	24-25		
3447	3435	3437	3431	3422	3436	3580-3200	O-H ulur
1619	1618	1619	1617	1619	1618	1640-1600	C=O ulur keton ( $\alpha,\beta$ -tidak jenuh)
1522	1522	1522	1522	1522	1522	1525-1470	C=C aromatik
1382	1382	1382	1382	1382	1382	1390-1330	C-OH ulur fenol
1168	1168	1168	1168	1168	1168	1310-1020	C-O-C ulur
1098	1098	1098	1098	1099	1099	1125-1085	C-O ulur alkohol sekunder
934	935	934	935	935	935	1000-800	=C-H tekuk (alkena)

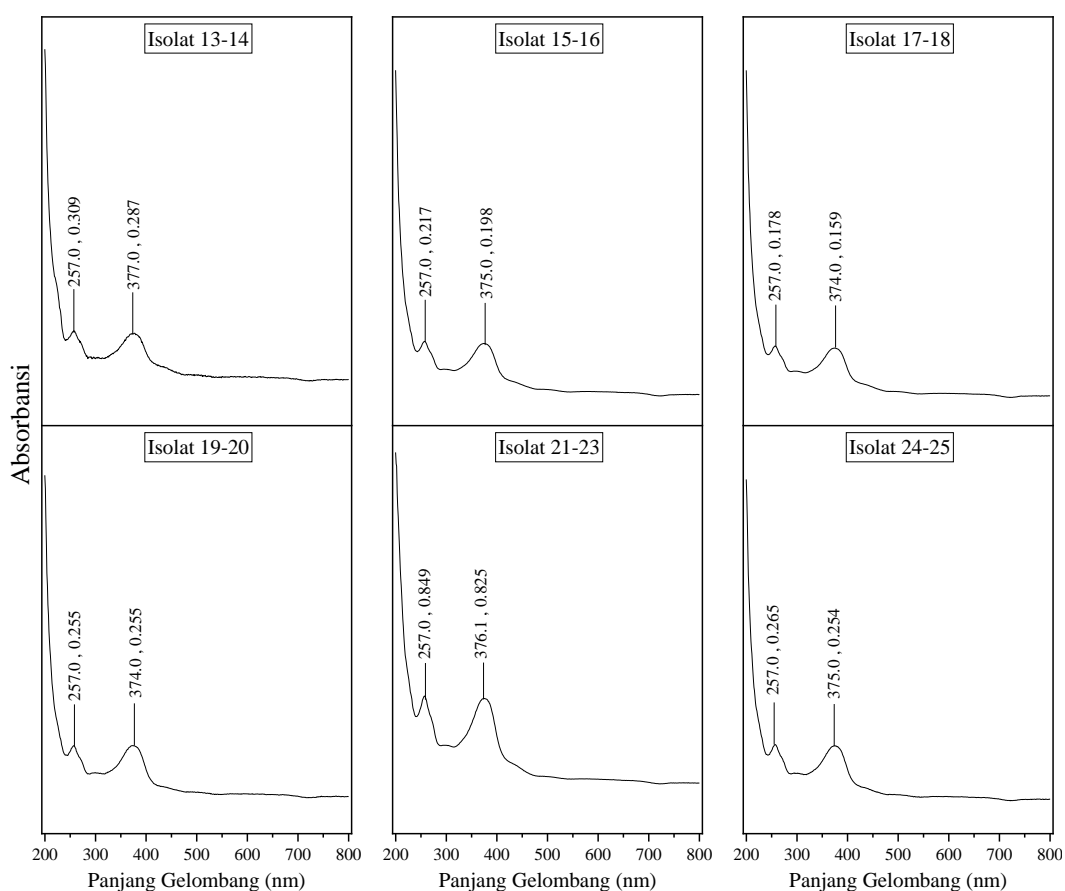


Gambar 4.14 Hasil spektra FTIR gabungan isolat hasil kromatografi kolom

Berdasarkan hasil interpretasi FTIR dan beberapa literatur, diduga isolat hasil kromatografi kolom merupakan senyawa flavonoid yang mengandung gugus fungsi O-H, C=O ulur keton, C=C konjugasi, =C-H tekuk (alkena), C-O-C, C=C ulur, C-O ulur fenol, C-O ulur alkohol sekunder, dan C-H aromatik. Namun, gugus fungsi hasil identifikasi menggunakan FTIR sangat terbatas dalam menentukan suatu jenis senyawa, sehingga perlu adanya identifikasi lain. Identifikasi lain yang dilakukan dalam penelitian ini berupa identifikasi secara kimia dengan uji fitokimia yang menunjukkan adanya endapan kuning yang mengindikasikan sampel positif mengandung senyawa flavonoid, monitoring KLTA yang menunjukkan  $R_f$  dan warna bercak ungu yang mengindikasikan senyawa flavonoid golongan flavon atau flavonol, dan selanjutnya akan dilakukan identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis untuk memperkuat dugaan senyawa flavonoid yang terkandung dalam isolat hasil kromatografi kolom rimpang Jeringau berdasarkan pita serapan sampel pada daerah ultraviolet dan visible.

#### 4.9 Identifikasi Isolat Flavonoid Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

Isolat hasil kromatografi kolom selanjutnya diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200 – 800 nm. Identifikasi dilakukan dengan menganalisis panjang gelombang maksimum isolat sehingga dapat diperoleh beberapa informasi meliputi keberadaan kromofor, gugus utama, pola oksigenasi, struktur, dan dugaan jenis flavonoid yang terkandung dalam isolat. Hasil pengukuran spektra UV-Vis pada isolat hasil kromatografi kolom ditunjukkan pada Gambar 4.15 dengan hasil identifikasi dirangkum pada Tabel 4.7.



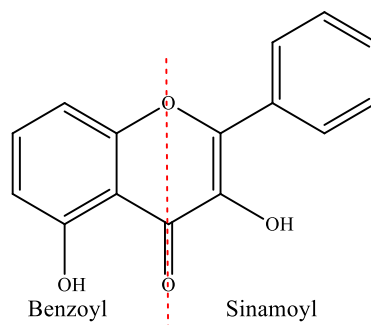
Gambar 4.15 Hasil spektra UV-Vis isolat hasil kromatografi kolom

Tabel 4.7 Data identifikasi spektra UV-Vis pada isolat hasil kromatografi kolom

Isolat	Daerah Serapan				Literatur (Markham, 1981)		Dugaan Jenis Flavonoid
	Pita II (nm)	Abs	Pita I (nm)	Abs	Pita II (nm)	Pita I (nm)	
13-14	257	0,309	377	0,287			
15-16	257	0,217	375	0,198			
17-18	257	0,178	374	0,159	250-280	350-385	Flavonol (3-OH bebas)
19-20	257	0,255	374	0,255			
21-23	257	0,849	376	0,825			
24-25	257	0,265	375	0,254			

Berdasarkan hasil identifikasi di atas, diketahui bahwa keenam isolat memiliki panjang gelombang maksimum pada pita I antara 374 – 377 nm dan pada pita II sebesar 257 nm. Sastrohamidjojo (1991) menjelaskan bahwa daerah serapan 300 – 550 nm (pita I) merupakan daerah serapan khas dari ikatan rangkap C=C terkonjugasi dengan transisi elektron  $\pi \rightarrow \pi^*$  dan pada daerah serapan 210 – 285 nm (pita II) merupakan serapan khas dari kromofor tunggal seperti ikatan C=O dengan transisi elektron  $n \rightarrow \pi^*$ . Dengan demikian dapat diduga bahwa gugus utama dari isolat hasil kromatografi kolom terdiri dari gugus C=C terkonjugasi dan gugus C=O yang merupakan gugus khas dari senyawa flavonoid. Hal tersebut diperkuat dengan penjelasan Bajracharya *et al.* (2017) bahwa semua flavonoid memiliki serapan maksimum oleh gugus benzoil pada daerah 240 – 290 nm (pita II), yang didasarkan pada konjugasi dari cincin A dan pola substitusinya. Pada cincin B dan C yang terkonjugasi (melalui ikatan rangkap antara karbon C<sub>2</sub> dan C<sub>3</sub> pada cincin C), flavonoid memiliki serapan maksimum oleh gugus sinamoil pada daerah 300 – 550 nm (pita I), dengan klasifikasi daerah serapan 460 – 550 nm untuk antosianin dan 305 – 385 nm untuk flavon dan flavonol seperti ditunjukkan pada Gambar 4.16.



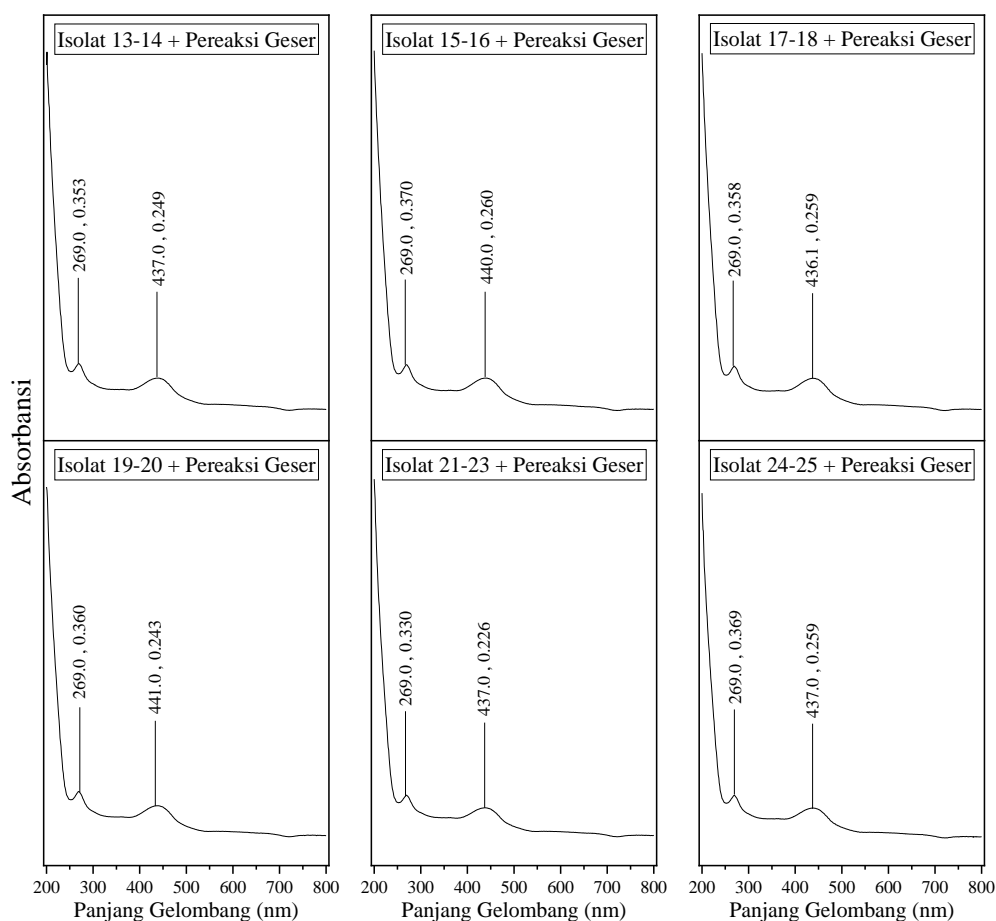


Gambar 4.16 Gugus benzoil dan sinamoil dari golongan flavonol (Parwata *et al.*, 2018)

Lebih spesifik, Markham (1981) dan Mustarichie & Runadi (2021) menjelaskan bahwa pada rentang 350 – 385 nm (pita I) dan 250 – 280 nm (pita II) merupakan daerah serapan khas untuk golongan flavonol dengan 3–OH bebas. Hasil serupa ditunjukkan pada penelitian Nuria *et al.* (2011) yang mengidentifikasi senyawa flavonoid dari daun Jangkang menggunakan beberapa instrumen, hasil UV-Vis menunjukkan sampel memiliki serapan pada daerah 362 nm (pita I) dan 260 nm (pita II) yang mengindikasikan aglikon dari sampel adalah senyawa flavonol dengan 3–OH bebas. Hasil LCMS menunjukkan bahwa sampel merupakan flavonol jenis kaempferol. Hal tersebut memperkuat dugaan bahwa serapan yang ditunjukkan isolat yaitu pada daerah 377 nm dan 257 nm merupakan senyawa flavonoid dengan gugus utama berupa flavonol dengan 3–OH bebas. Setelah diketahui dugaan gugus utama senyawa flavonoid dalam sampel, identifikasi dilanjutkan untuk mengetahui letak gugus gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus utama sampel.

Penentuan gugus tambahan dilakukan dengan menambahkan pereaksi geser berupa  $\text{AlCl}_3$  10% dan natrium asetat pada isolat dan diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200 – 800 nm. Hasil

pengukuran spektra UV-Vis pada isolat hasil kromatografi kolom dengan penambahan pereaksi geser ditunjukkan pada Gambar 4.17 dengan hasil identifikasi dirangkum pada Tabel 4.8.

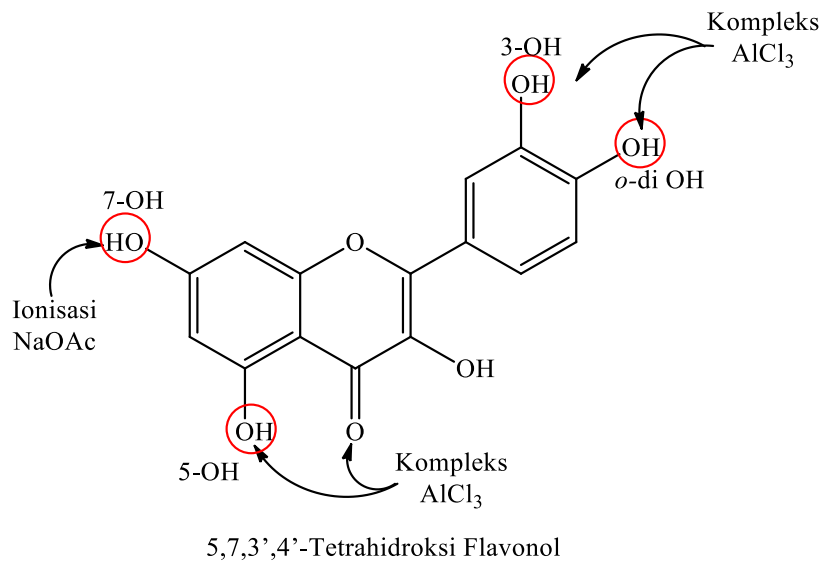


Gambar 4.17 Hasil spektra UV-Vis isolat + pereaksi geser

Tabel 4.8 Data identifikasi spektra flavonoid pada isolat + pereaksi geser

Isolat	Daerah Serapan		Pergeseran		Jenis Flavonoid	Penafsiran (Markham, 1981)
	Pita II (nm)	Pita I (nm)	Pita II (nm)	Pita I (nm)		
13-14	269	437		+60	Flavonol	- 7-OH
15-16	269	440		+65		- 3-OH dengan
17-18	269	436	+12	+62		atau tanpa 5-OH
19-20	269	441		+67		
21-23	269	437		+61		- Ada <i>o</i> -di OH
24-25	269	437		+62		

Suhendi *et al.* (2011) menjelaskan bahwa penambahan  $\text{AlCl}_3$  dapat membentuk kompleks dengan orto hidroksi maupun hidroksi keton, sedangkan penambahan natrium asetat dapat mengionisasi gugus hidroksil flavonoid yang paling tahan asam, yaitu gugus 7-OH menjadi 7-ONa, sehingga spektrum flavonoid akan mengalami pergeseran batokromik. Penambahan  $\text{AlCl}_3$  10% dan natrium asetat pada penelitian ini memberikan pergeseran batokromik sebesar 60 – 67 nm (pita I) yang diduga terjadi karena penambahan  $\text{AlCl}_3$  menyebabkan pembentukan kompleks dari hidroksi keton, sehingga mengindikasikan isolat merupakan golongan flavonol dengan gugus -OH pada  $\text{C}_5$  (5-OH) (Parwata *et al.*, 2018) dan gugus *o*-di-OH pada cincin B (Suhendi *et al.*, 2011). Selain itu, pergeseran batokromik juga terdapat pada pita II sebesar 12 nm yang diduga terjadi karena penambahan natrium asetat yang mengindikasikan sampel mengandung gugus tambahan 7-OH pada cincin A (Tunnisa & Mursiti, 2018). Berdasarkan data interpretasi pergeseran panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis, diduga bahwa senyawa flavonoid dalam isolat hasil kromatografi kolom memiliki gugus utama berupa flavonol dengan 3-OH bebas (flavonol dengan gugus hidroksi pada  $\text{C}_3$  dari cincin B) dengan gugus tambahan berupa gugus hidroksi pada  $\text{C}_5$  dan  $\text{C}_7$  pada cincin A, serta gugus hidroksi dengan posisi orto ( $\text{C}_4$ ) pada cincin B. Dengan demikian, dugaan struktur jenis flavonoid dalam isolat hasil kromatografi kolom berdasarkan pendekatan UV-Vis ditunjukkan pada Gambar 4.18.



Gambar 4.18 Dugaan struktur flavonoid isolat berdasarkan pendekatan UV-Vis

#### 4.10 Penetapan Kadar Flavonoid pada Isolat Hasil Kromatografi Kolom

Penetapan kadar flavonoid dilakukan untuk mengukur kadar flavonoid yang terkandung dalam isolat hasil kromatografi kolom rimpang Jeringau. Pengukuran ini didasarkan pada prinsip pembentukan senyawa kompleks antara flavonoid dengan reagen  $\text{AlCl}_3$  (Al-Flavonoid) yang ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi kuning yang selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Dirujuk dari penjelasan Khoirunnisa *et al.* (2019) pembentukan kompleks tersebut terjadi pada gugus keto dan gugus hidroksil dari flavonoid seperti ditunjukkan pada Gambar 4.18.

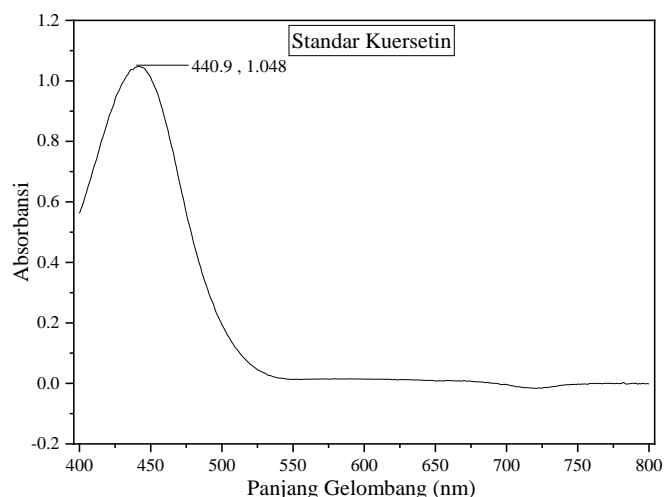
Penetapan kadar flavonoid total diawali dengan menentukan panjang gelombang maksimum standar kuersetin yang telah ditambahkan dengan  $\text{AlCl}_3$  10%, natrium asetat, dan aquabides. Hasil pengukuran pada rentang 400 – 600 nm diperoleh panjang gelombang maksimum sebesar 440,9 nm seperti ditunjukkan pada Gambar 4.19. Penambahan  $\text{AlCl}_3$  10% pada tahap ini memberikan perubahan warna yang semula larutan sampel berwarna putih jernih menjadi

kuning jernih. Sari *et al.* (2021) menjelaskan bahwa terbentuknya kompleks antara  $\text{AlCl}_3$  dengan gugus hidroksi keton dan *o*-hidroksi keton yang terkandung dalam sampel menyebabkan adanya pergeseran panjang gelombang, sehingga terjadi perubahan warna pada sampel. Penambahan asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) berfungsi untuk memberikan intensitas *peak* absorban yang lebih kuat (Kusuma *et al.*, 2010). Setelah semua larutan dicampur dan dihomogenkan, larutan diinkubasi untuk memaksimalkan reaksi yang terjadi sehingga dapat memberikan intensitas warna dan mendeteksi *peak* dengan maksimal (Azizah *et al.*, 2014).

Panjang gelombang maksimum yang diperoleh digunakan untuk menentukan kurva baku kuersetin dan kadar flavonoid pada isolat hasil kromatografi kolom rimpang Jeringau. Penentuan kurva baku kuersetin dilakukan dengan mengukur absorbansi kuersetin yang dibuat dengan variasi konsentrasi 9, 12, 15, 18, 21, dan 24 ppm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Berdasarkan hasil pengukuran, diperoleh absorbansi seperti pada Tabel 4.9 dengan nilai  $y = 0.03195x - 0.02173$  dan  $R^2 = 0.9978$ . Setelah diperoleh kurva baku kuersetin, pengukuran absorbansi dilanjutkan pada isolat hasil kromatografi kolom rimpang Jeringau yang bertujuan untuk menentukan kadar kesetaraan larutan baku kuersetin dengan sampel. Hasil pengukuran absorbansi sampel ditunjukkan pada Tabel 4.10.

Tabel 4.9 Absorbansi kurva larutan standar kuersetin

No.	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
1.	9	0,2709
2.	12	0,3549
3.	15	0,4545
4.	18	0,5642
5.	21	0,6380
6.	24	0,7500



Gambar 4.19 Hasil spektra UV-Vis Kuersetin

Tabel 4.10 Kadar flavonoid pada isolat hasil kromatografi kolom

No.	Sampel	Ulangan	Abs	Kadar Kesetaraan Kuersetin (mg/L)	Kadar Flavonoid (mg QE/g)	Rata-rata Kadar Flavonoid $\pm$ SD (mg QE/g)
1.	Isolat 13-14	1	0,1052	2,6125	4,7500	4,9037 $\pm$ 0,2661
		2	0,1052	2,6125	4,7500	
		3	0,1133	2,8660	5,2110	
2.	Isolat 15-16	1	0,1541	4,1430	6,1836	6,1883 $\pm$ 0,0260
		2	0,1537	4,1305	6,1649	
		3	0,1548	4,1649	6,2163	
3.	Isolat 17-18	1	0,1618	4,3840	6,4471	6,4379 $\pm$ 0,0122
		2	0,1613	4,3684	6,4241	
		3	0,1617	4,3809	6,4425	
4.	Isolat 19-20	1	0,1504	4,0272	6,0108	6,1572 $\pm$ 0,2258
		2	0,1511	4,0491	6,0435	
		3	0,1591	4,2995	6,4172	
5.	Isolat 21-23	1	0,1025	2,5280	4,8616	4,9298 $\pm$ 0,0603
		2	0,1040	2,5750	4,9518	
		3	0,1044	2,5875	4,9759	
6.	Isolat 24-25	1	0,0896	2,1243	4,4255	4,3299 $\pm$ 0,0868
		2	0,0878	2,0679	4,3082	
		3	0,0870	2,0429	4,2560	

Berdasarkan nilai absorbansi sampel tersebut dapat ditentukan kadar flavonoid yang terkandung dalam isolat dan diketahui bahwa isolat memiliki

kandungan flavonoid yang berbeda-beda. Isolat pada vial 13-14 memiliki kadar flavonoid rata-rata sebesar  $4,9037 \pm 0,2661$  mg QE/g, kadar terus meningkat hingga pada vial 17-18 sebesar  $6,4379 \pm 0,0122$  mg QE/g. Selanjutnya pada vial 19-20 kadar flavonoid mengalami penurunan sebesar  $6,1572 \pm 0,2258$  mg QE/g, dan terus menurun hingga pada vial 24-25 sebesar  $4,3299 \pm 0,0868$  mg QE/g.

Beragamnya kadar flavonoid pada isolat hasil kromatografi kolom tersebut disebabkan karena perbedaan berat isolat yang berhasil ditampung oleh masing-masing vial. Vial 13-14 merupakan vial awal yang positif mengandung senyawa flavonoid, sehingga dapat diduga sebagai titik awal turunnya senyawa flavonoid dengan berat total isolat dari kedua vial sebesar 5,5 mg. Selanjutnya, pada vial 15-16, 17-18, dan 19-20 berat isolat yang berhasil ditampung meningkat dengan total secara berturut-turut sebesar 6,7 mg, 6,8 mg, dan 6,7 mg. Namun, pada vial 21-23 dan 24-25 berat isolat mengalami penurunan secara berturut-turut sebesar 5,2 dan 4,8 mg yang diduga bahwa senyawa flavonoid yang turun merupakan sisa dan telah turun secara maksimal pada vial sebelumnya, sehingga pada vial 26 dan seterusnya isolat yang berhasil ditampung menunjukkan hasil negatif senyawa flavonoid. Isolat yang positif senyawa flavonoid diencerkan dengan jumlah pelarut yang sama, sehingga semakin banyak isolat yang berhasil ditampung pada vial, konsentrasi flavonoid yang terkandung dalam sampel akan semakin tinggi dan kadar yang dihasilkan akan semakin tinggi pula.

Kadar flavonoid total dari isolat hasil kromatografi kolom dilakukan dengan menjumlahkan kadar flavonoid dari masing-masing isolat dan diperoleh hasil sebesar 32,9468 mg QE/g dari total isolat sebanyak 35,7 mg. Hasil tersebut menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan kadar flavonoid total pada

fraksi etil asetat rimpang Jeringau. Khoirunnisa *et al.* (2019) menentukan kadar flavonoid total pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau dan diperoleh kadar rata-rata sebesar 14,884 mg QE/g. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa untuk memperoleh kadar flavonoid yang lebih banyak dari suatu sampel dapat diawali dengan mengisolasi senyawa flavonoid dalam sampel tersebut.

#### 4.11 Kajian Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam

Proses isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dalam rimpang Jeringau dilakukan dalam beberapa tahapan yang memberikan pembelajaran kepada penulis untuk senantiasa bertawakkal kepada Allah SWT atas segala ketetapan dan hukum-Nya, sebagaimana dijelaskan dalam Al-Quran Surat ath-Thalaaq [65]: 2 – 3 sebagai berikut:

وَمَنْ يَتَّقِ اللَّهَ يَجْعَلْ لَهُ مَخْرَجًا ﴿٢﴾ وَيَرْزُقْهُ مِنْ حَيْثُ لَا يَحْتَسِبُ ۚ وَمَنْ يَتَوَكَّلْ عَلَى اللَّهِ فَهُوَ حَسْبُهُ ۚ إِنَّ اللَّهَ بَلِغُ أَمْرِهِ ۚ قَدْ جَعَلَ اللَّهُ لِكُلِّ شَيْءٍ قَدْرًا ﴿٣﴾

Artinya: “Barangsiapa bertakwa kepada Allah niscaya Dia akan mengadakan baginya jalan keluar, dan Dia memberinya rezeki dari arah yang tiada disangkanya. Dan barangsiapa yang bertawakkal kepada Allah niscaya Allah akan mencukupkan (keperluan)nya. Sesungguhnya Allah melaksanakan urusan yang (dikehendaki)Nya. Sesungguhnya Allah telah mengadakan ketentuan bagi tiap-tiap sesuatu” (QS. Ath-Thalaaq [65]: 2 – 3).

Tafsir Ibnu Katsir (2004) menjelaskan makna dari *يَحْتَسِبُ لَا يَحْتَسِبُ* وَيَرْزُقْهُ مِنْ حَيْثُ لَا يَحْتَسِبُ bahwa barangsiapa bertakwa kepada Allah dalam seluruh perintah-Nya dan menjauhi seluruh larangan-Nya, maka Dia akan membuatkan baginya jalan keluar dan memberinya rizki dari arah yang tidak diduga-duga, yakni dari arah yang tidak pernah terbesit dalam hatinya. Kemudian makna dari *إِنَّ اللَّهَ بَلِغُ أَمْرِهِ*, Dia-lah



yang menerapkan seluruh ketetapan dan hukum-Nya yang diberlakukan terhadap semua makhluk-Nya sesuai dengan kehendak dan keinginan-Nya. Sebagai orang yang beriman, sebelum melakukan sesuatu, alangkah baiknya jika merencanakan dengan baik. Namun perlu disadari bahwa segala sesuatu yang telah direncanakan tidak akan terjadi tanpa izin dan kehendak Allah. Maka dari itu, selain berusaha juga harus bertawakkal kepada-Nya.

Rimpang Jeringau merupakan salah satu tumbuhan dengan kandungan senyawa metabolit sekunder melimpah yang dapat dimanfaatkan dalam bidang farmakologi. Salah satu wujud syukur peneliti atas nikmat yang telah Allah SWT berikan berupa akal atau pikiran, yakni dengan menggunakannya untuk melakukan penelitian isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dalam rimpang Jeringau. Sebagaimana firman Allah dalam Surah Ibrahim [14]: 7 berikut:

وَإِذْ تَأَذَّنَ رَبُّكُمْ لَئِن شَكَرْتُمْ لَأَزِيدَنَّكُمْ وَلَئِن كَفَرْتُمْ إِنَّ عَذَابِي لَشَدِيدٌ ﴿٧﴾

Artinya: “Dan (ingatlah) ketika Tuhanmu memaklumkan, “Sesungguhnya jika kamu bersyukur, niscaya Aku akan menambah (nikmat) kepadamu, tetapi jika kamu mengingkari (nikmat-Ku), maka pasti azab-Ku sangat berat” (QS. Ibrahim [14]: 7).

Tafsir Jalalain (2008) menjelaskan bahwa bentuk rasa syukur kepada Allah dengan cara menjalankan ketauhidan dan ketaatan kepada-Nya, maka akan mendapatkan nikmat-Nya. Apabila ingkar terhadap nikmat-Nya dengan melakukan kekufuran dan kedurhakaan, niscaya Allah akan menurunkan azab yang sangat keras. Maka berhati-hatilah dengan azab Allah dan takutlah kepada-Nya. Proses dalam memperoleh ilmu pengetahuan memang tidaklah mudah, namun tetaplah harus senantiasa bersyukur dalam bentuk apapun itu. Ketika melakukan isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid, peneliti harus melakukan

serangkaian metode yang telah disiapkan secara terukur dan sistematis guna mendapatkan suatu produk yang memiliki lebih banyak manfaat seperti dalam bidang farmakologi sebagai senyawa antibakteri, antioksidan, antikanker, dan sebagainya. Metode yang digunakan oleh peneliti sebelumnya juga perlu adanya pengembangan agar lebih efektif dan efisien. Demikianlah karunia Allah SWT. yang diberikan kepada orang yang berpikir (pencari ilmu). Dalam hadits shahih Al Bukhari dan Muslim dalam Tafsir Ibnu Katsir (2007) juga dijelaskan bahwa seorang pencari ilmu akan mendapatkan ridha dari Allah SWT. Ketika telah mendapatkan ridha-Nya, segala sesuatu yang akan dikerjakan oleh hamba-Nya pasti diberikan kemudahan, baik dalam hal memperoleh, mengolah, dan mengamalkan ilmu pengetahuan tersebut. Kemudahan yang telah Allah SWT berikan kepada peneliti, salah satunya yakni dapat menyelesaikan isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dalam rimpang Jeringau yang menunjukkan bahwa rimpang Jeringau mengandung senyawa flavonoid golongan flavonol yang diketahui memiliki banyak manfaat dalam bidang farmakologi diantaranya sebagai antibakteri, antikanker, antioksidan, dan lain sebagainya. Adanya kandungan senyawa metabolit sekunder dalam rimpang Jeringau merupakan salah satu bentuk sarana dalam memikirkan dan mengambil pelajaran mengenai kekuasaan dan bentuk kasih sayang Allah SWT.

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh, dapat disimpulkan bahwa:

1. Metode terbaik yang dapat memisahkan senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat rimpang Jeringau adalah metode kromatografi kolom non gradien eluen yang ditandai dengan terbentuknya noda pemisahan bulat dan jarak antar noda satu dengan yang lainnya teratur.
2. Hasil identifikasi isolat hasil kromatografi kolom dengan instrumen FTIR menunjukkan adanya gugus fungsi O-H, C=O keton, C=C aromatik, C-OH fenol, C-O-C, C-O alkohol sekunder, dan =C-H alkena dengan hasil analisis UV-Vis menunjukkan adanya serapan pada daerah 257 nm (pita I) dan 374-377 nm (pita II) dengan pergeseran masing-masing sebesar 12 nm (pita I) dan 60-67 nm (pita II), sehingga diduga isolat hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat rimpang Jeringau mengandung senyawa flavonoid golongan flavonol berupa 5,7,3',4'-Tetrahidroksi flavonol.
3. Kadar flavonoid total diperoleh sebanyak 32,9468 mg QE/g dari total isolat hasil kromatografi kolom sebanyak 35,7 mg. Kadar flavonoid berbanding lurus dengan banyak isolat pada masing-masing vial, semakin banyak isolat yang tertampung maka kadar flavonoid yang terkandung pada masing-masing vial semakin tinggi.

## 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi kolom gradien eluen dengan laju alir 2 mL/menit untuk mengetahui tingkat kemurnian isolat yang diperoleh dibandingkan dengan hasil kromatografi kolom non gradien eluen.
2. Perlu dilakukan identifikasi isolat senyawa flavonoid dengan instrumen LC-MS/MS untuk mengetahui jenis senyawa flavonoid dengan lebih spesifik.
3. Perlu dilakukan uji lanjutan terhadap penggunaan isolat dalam bidang farmakologi, misalnya sebagai antibakteri, antivirus, antialergi, antelmintik, dan lain sebagainya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., & Zhang, X. (2013). An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions. *Food Engineering Reviews*, 5(3), 139–157. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9066-3>
- Abdullah. (2004). *Tafsir Ibnu Katsir*. Abdul Ghoffar, E.M dan Abu Ihsan, A. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi'i
- Achmad, I. E. (2010). Isolasi dan Identifikasi Struktur Molekul Serta Uji Aktivitas Antimikroba Senyawa Kimia dari Ekstrak n-Heksana Rimpang Dringo. *Skripsi*. Jakarta: Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia
- Afif, S., Fasya, A. G., & Ningsih, R. (2015). Extraction, Toxicity Assay and Identification of Active Compounds of Red Algae (*Euचेuma cottonii*) from Sumenep Madura. *ALCHEMY*, 4(2), 101. <https://doi.org/10.18860/al.v4i2.3199>
- Al-Albani, M. N., Tahrij., Mahmud., Walid., Khalid. (2007). *Derajat Hadits-Hadits dalam Tafsir Ibnu Katsir*. Mumtaz Arabia. Jakarta: Pustaka Azzam
- Al-Aboody, M. S., & Mickymaray, S. (2020). Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids. *Antibiotics*, 9(2), 45. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020045>
- Al-Imam Abdul Fida' Ismail Ibnu Katsir Ad-Dimasyqi. (2008). *Terjemahan Tafsir Ibnu Katsir*. Bandung: Sinar Baru Algasindo
- Al-Mahalli, I. J., As-Suyuti, I. J. (2008). *Terjemahan Tafsir Jalalain Jilid 1*. Bandung: Sinar Baru Algensindo
- Alaspure, R. N., & Nagdeve, S. R. (2011). Isolation of Active Constituent of *Acorus calamus* Rhizomes Extract and Evaluation of its Anti-cancer Activity. *Research J. Pharm. and Tech.* 4(12). 8
- Alen, Y., Agresa, F. L., & Yuliandra, Y. (2017). Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Aktivitas Antihiperurisemia Ekstrak Rebung *Schizostachyum brachycladum* Kurz (Kurz) pada Mencit Putih Jantan. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 3(2), 146. <https://doi.org/10.29208/jsfk.2017.3.2.141>
- Anggraini, V. (2018). Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Dengan Variasi Gradien Eluen Fraksi Etil Asetat Makroalga (*Euचेuma cottoni*). *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim

- Anisah, Khotimah, S., & Yanti, A. H. (2014). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Protobiont*, 3(3), 5
- Anwar, K., & Triyasmono, L. (2016). Kandungan Total Fenolik, Total Flavonoid, dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Jurnal Pharmascience*, 3(1), 11
- Arifin, B., & Ibrahim, S. (2018). Struktur, Bioaktivitas, dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1), 21–29. <https://doi.org/10.31629/zarah.v6i1.313>
- Artati, E. K., Irviana, F., & Fatimah. (2012). Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Asam Terhadap Kinetika Reaksi Hidrolisis Pelepah Pisang (*Musa Paradisiaca* L). *EKUILIBIUM*, 11(2). <https://doi.org/10.20961/ekuilibrium.v11i2.2216>
- Asmorowati, H., & Lindawati, N. Y. (2019). Determination of Total Flavonoid Content in Avocado (*Persea americana* Mill.) Using Spectrofotometry Method. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 15(2), 13
- Atun, S. (2014). Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konversi Cagar Budaya Borobudur*. 8(2)
- Azah, S. (2019). Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak n-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* Menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Azizah, D. N., Kumolowati, E., & Faramayuda, F. (2014). Penetapan Kadar Flavonoid Metode  $AlCl_3$  Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2), 14. <https://doi.org/10.26874/kjif.v2i2.14>
- Bajracharya, G. B., Paudel, M., & Rajendra, K. C. (2017). Insight Into the Structure Elucidation of Flavonoids Through UV-Visible Spectral Analysis of Quercetin Derivatives Using Shift Reagents. *J. Nepal Chem. Soc.*, (37)
- Balaji, R. M., & Shanthakumari, D. (2021). Determination of Bioactive Compounds from the Extracts of *Acorus calamus*. *Clinical Medicine*, 7(11), 9
- Barua, C. C., Sen, S., Das, A. S., Talukdar, A., Hazarika, J., Barua, A. G., Baruah, A. M., & Barua, I. (2014). A Comparative Study of The In Vitro Antioxidant Property of Different Extracts of *Acorus calamus* Linn. *Journal National Product Plant Resour*, 4(1), 12.

- Bian, Y., Lei, J., Zhong, J., Wang, B., Wan, Y., Li, J., Liao, C., He, Y., Liu, Z., Ito, K., & Zhang, B. (2022). Kaempferol Reduces Obesity, Prevents Intestinal Inflammation, and Modulates Gut Microbiota in High-Fat Diet Mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 99, 108840. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108840>
- Brodowska, K. M. (2017). Natural Flavonoids: Classification, Potential Role, and Application of Flavonoid Analogues. *European Journal of Biological Research*, 7(2). <https://doi.org/10.5281/ZENODO.545778>
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants*, 2<sup>nd</sup> Edition. France: Lavoisier Publishing
- Budiarti, A., Ulfah, M., & Oktania, F. A. (2014). Aktivitas Antioksidan Fraksi Kloroform Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan Identifikasi Kandungan Senyawa Kimianya. *Prosiding SNST ke-5*, 6
- Caglayan, C., Demir, Y., Kucukler, S., Taslimi, P., Kandemir, F. M., & Gulçin, İ. (2019). The Effects of Hesperidin on Sodium Arsenite-Induced Different Organ Toxicity in Rats on Metabolic Enzymes as Antidiabetic and Anticholinergics Potentials: A Biochemical Approach: XXXX. *Journal of Food Biochemistry*, 43(2), e12720. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12720>
- Candra, L. M. M., Andayani, Y., & Wirasisya, D. G. (2021). Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kandungan Fenolik Total dan Flavonoid Total Pada Ekstrak Etanol Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.). *Jurnal Pijar Mipa*, 16(3), 397. <https://doi.org/10.29303/jpm.v16i3.2308>
- Chandra, D., & Prasad, K. (2017). Phytochemicals of *Acorus calamus* (Sweet flag). *Journal of Medicine Plants Studies*, 6.
- Day, R. A., & Underwood, A. L. (1993). *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keempat*. Jakarta: Erlangga
- Dewi, S. R., Argo, B. D., & Ulya, N. (2018). Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak *Pleurotus ostreatus*. *Rona Teknik Pertanian*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.17969/rtp.v11i1.9571>
- Dinev, T., Tzanova, M., Velichkova, K., Dermendzhieva, D., & Beev, G. (2021). Antifungal and Antioxidant Potential of Methanolic Extracts from *Acorus calamus* L., *Chlorella vulgaris* Beijerinck, *Lemna minuta* Kunth, and *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kützing. *Applied Sciences*, 11(11), 4745. <https://doi.org/10.3390/app11114745>
- Djamil, R., & Yenni, C. (2014). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Fraksi n-Butanol Daun Dewa (*Gynura pseudochina* (L.) DC) secara Spektrofotometri UV-Cahaya Tampak. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 12, 6

- Duarte, K., Justino, C. I. L., Gomes, A. M., Rocha-Santos, T., & Duarte, A. C. (2014). Green Analytical Methodologies for Preparation of Extracts and Analysis of Bioactive Compounds. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 65, pp. 59–78). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63359-0.00004-5>.
- Due, R. (2013). Etnobotani Tumbuhan Obat Suku Dayak Pesaguan dan Implementasinya dalam Pembuatan *Flash Card* Biodiversitas. *Artikel Penelitian*. Pontianak: Universitas Tanjungpura
- Eberle, L., Kobernik, A., Aleksandrova, A., & Kravchenko, I. (2018). Optimization of Extraction Methods for Total Polyphenolic Compounds Obtained from Rhizomes of *Zingiber officinale*. *Trends in Phytochemical Research (TPR)*, 2 (1)
- Endarini, L. H. (2016). *Farmakologi dan Fitokimia*. Jakarta: Kementrian dan Kesehatan Republik Indonesia
- Ergina, N., Siti., & Pursiasari, I. D. (2014). Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang Diekstraksi dengan Pelarut Air dan Etanol Qualitative Test of Secondary Metabolites Compounds in *Palado Leaves* (Agave). *Jurnal Akademika Kimia*, 3(3), 165–172
- Escribano-Ferrer, E., Queralt Regué, J., Garcia-Sala, X., Boix Montañés, A., & Lamuela-Raventos, R. M. (2019). *In Vivo* Anti-inflammatory and Antiallergic Activity of Pure Naringenin, Naringenin Chalcone, and Quercetin in Mice. *Journal of Natural Products*, 82(2), 177–182. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00366>
- Fadlilaturrahmah, F., Wathan, N., Firdaus, A. R., & Arishandi, S. (2020). Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Kadar Flavonoid Daun Kareho (*Callicarpa Longifolia* Lam). *Pharma Xplore: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 5(1), 23–33. <https://doi.org/10.36805/farmasi.v5i1.977>
- Fajrin, F. I., & Susila, I. (2019). Uji Fitokimia Ekstrak Kulit Petai Menggunakan Metode Maserasi. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi dan Sains (SNas TekS)*, 8.
- Fan, W., Qian, S., Qian, P., & Li, X. (2016). Antiviral Activity of Luteolin Against Japanese Encephalitis Virus. *Virus Research*, 220, 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.021>
- Fasya, A. G., Dinasti, A. R., Shofiyah, M., Rahmawati, L. M., Millati, N., Safitri, D. A., Handoko, S., Hanapi, A., & Ningsih, R. (2016). Ekstraksi, Hidrolisis, dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga *Chlorella* sp. *ALCHEMY*, 5(1), 5. <https://doi.org/10.18860/al.v5i1.3686>



- Fasya, A. G., Purwantoro, B., Ulya, L. H., & Ahmad, M. (2020). Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis dari Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*. *ALCHEMY*, 8(1), 23–34. <https://doi.org/10.18860/al.v8i1.9936>
- Fasya, A. G., Tyas, A. P., Mubarakah, F. A., Ningsih, R., & Madjid, A. D. R. (2018). Variasi Diameter Kolom dan Rasio Sampel-Silika pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *ALCHEMY*, 6(2), 57. <https://doi.org/10.18860/al.v6i2.7015>
- Febrianti, D. R., Khairina, N., & Alisa, P. N. (2018). Uji Aktivitas Anti Mikroorganisme Ekstrak Jeringau. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 1(1), 96–103
- Ferdinand, A., & Rizki, F. S. (2021). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Pandan Hutan Jenis Baru *Freycinetia sessiliflora* Rizki. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.36387/jifi.v4i1.642>
- Fithrony, A. H. (2021). Uji Toksisitas dan Identifikasi Senyawa Aktif Fraksi Air, n-Heksana, dan Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Etanol Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) Ekstraksi Sonikasi. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Fitri, K. N. (2017). Variasi Laju Alir pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Fitrya. (2011). Flavonoid Kuersetin dari Tumbuhan Benalu Teh (*Scurulla atropurpurea* BL. Dans). *Jurnal Penelitian Sains*, 14(4)
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Putaka Pelajar
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2015). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Putaka Pelajar
- Gholkar, M., Laddha, K., & Mulik, M. (2013). Fate of  $\beta$ -asarone in Ayurvedic Sodhana Process of Vacha. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 4(1), 19. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.109545>
- Haghighi, S. R., Asadi, M. H., & Akrami, H. (2017). Anti-Carcinogenic and Anti-Angiogenic Properties of The Extracts of *Acorus calamus* on Gastric Cancer Cells. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 7(2), 12.
- Hamada, H., Hamada, H., Ishihara, K., Kuboki, A., Iwaki, T., & Kiriake, Y. (2021). Enzymatic Synthesis of  $\alpha$ -Tocopherol Derivative Glycoside,

- Daidzein Glycoside, Daidzein Oligosaccharide, Resveratrol Oligosaccharide, and Curcumin Oligosaccharides and Their Anti-Allergic Activity and Neuroprotective Activity. *Natural Product Communications*, 16(10), 1934578X2110290. <https://doi.org/10.1177/1934578X211029095>
- Hanani, E. (2014). *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG
- Handayani, H., Sriherfyna, F. H., Veteran, J., & Korespodensi, P. (2016). Ekstraksi Antioksidan Daun Sirsak Metode Ultrasonic Bath (Kajian Rasio Bahan: Pelarut dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 4(1), 11
- Handayani, S., Mursiti, S., & Wijayati, N. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Rimpang Temu Kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb.) terhadap *Streptococcus mutans*. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 7(2), 7.
- Handoko, S. (2016). Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter (PE) Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Metode Kromatografi Kolom Pembuatan Fasa Diam Cara Basah dan Kering. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Harbone, J. (1987). *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB
- Hardiansi, F., Afriliana, D., Munteira, A., & Wijayanti, E. D. (2020). Perbandingan Kadar Fenolik dan Aktivitas Antimikroba Rimpang Jeringau (*Acorus calamus*) Segar dan Terfermentasi. *Jurnal Farmasi Medica/Pharmacy Medical Journal (PMJ)*, 3(1), 16. <https://doi.org/10.35799/pmj.3.1.2020.28959>
- Hartati, S., Atiek, S., & Irmawati A. E. (2013). Isolasi  $\beta$ -asaron dari Rimpang Dringo (*Acorus calamus* Linn.) Serta Uji Aktivitas Antimikroba. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 8 (2)
- Hashemi, Z., Ebrahimzadeh, M. A., & Khalili, M. (2019). Sun Protection Factor, Total Phenol, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Medicinal Plants from Iran. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18(7), 1443–1448. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v18i7.11>
- Hayati, E. K., Muti'ah, R., & Chusna, I. (2013). Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak n-Heksana Batang Kesembukan (*Paederia foetida* Linn). *ALCHEMY*. <https://doi.org/10.18860/al.v0i0.2903>
- Hayati, E. K., Ningsih, R., & Latifah, L. (2015). Antioxidant Activity of Flavonoid from Rhizome *Kaempferia galanga* L. Extract. *ALCHEMY*, 4(2), 127. <https://doi.org/10.18860/al.v4i2.3203>

- Hendryani, R., Lutfi, M., & Hawa, L. C. (2015). Ekstraksi Antioksidan Daun Sirih Merah Kering (*Piper croctatum*). *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*, 3, 6
- Hidayah, N., Hisan, A. K., Solikin, A., & Mustikaningtyas, D. (2016). Uji Efektivitas Ekstrak *Sargassum muticum* sebagai Alternatif Obat Bisul Akibat Aktivitas *Staphylococcus aureus*. *Journal of Creativity Students*, 1(1), 9
- Hikmawanti, N. P. E., Fatmawati, S., Arifin, Z., & . V. (2021). Pengaruh Variasi Metode Ekstraksi Terhadap Perolehan Senyawa Antioksidan pada Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr). *Jurnal Farmasi Udayana*, 1. <https://doi.org/10.24843/JFU.2021.v10.i01.p01>
- Hismath, I., Wan Aida, W. M., & Ho, C. W. (2011). Optimization of Extraction Conditions for Phenolic Compounds from Neem (*Azadirachta indica*) Leaves. *International Food Research Journal*, 18(3), 9
- Hong, E., & Kim, G.-H. (2010). Comparison of Extraction Conditions for Phenolic, Flavonoid Content, and Determination of Rosmarinic Acid from *Perilla frutescens* var. *acuta*: Comparison Extraction Conditions from PFL. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(7), 1353–1359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02250.x>
- Horizon., Pujiastuti, B., Kurnia, D., Sumiarsa, D., Supratman, U., & Shiono, Y. (2015). Kuersetin dan Kuersetin-3-O-Glukosida dari Kulit Batang *Sonneratia alba* (Lythraceae). *Jurnal Kimia VALENSI: Jurnal Penelitian dan Pengembangan*, 1(1), 33-38
- Hossain, M. K., Abdal Dayem, A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Kumar Saha, S., Yang, G.-M., Choi, H., & Cho, S.-G. (2016). Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 569. <https://doi.org/10.3390/ijms17040569>
- Ilyas, A., Novianty, I., & Irmayanti, I. (2015). Senyawa Golongan Steroid dari Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) dan Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach. *Chimica et Natura Acta*, 3(3). <https://doi.org/10.24198/cna.v3.n3.9220>
- Istianah. (2015). Upaya Pelestarian Lingkungan Hidup dalam Perspektif Hadis. *RIWAYAH*, 1 (2).
- Izza, K. N. (2021) Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Flavonoid Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat Daun Katuk (*Sauropus androgynus* L. Merr). *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Karak, P. (2019). Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 10(4), 8

- Kasture, A., Patel, S., Chauhan, J., & Krishnamurthy, R. (2015). In Vitro Antimicrobial Effect of Essential Oil from Leaf and Rhizome of Various Accessions of *Acorus calamus* Linn., and Its Phytochemical Screening. *European Journal of Medicinal Plants*, 9(2), 1–13. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2015/17318>
- Khanam, M. N., & Anis, M. (2018). Organogenesis and Efficient In Vitro Plantlet Regeneration from Nodal Segments of *Allamanda cathartica* L. Using TDZ and Ultrasound Assisted Extraction of Quercetin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(2), 241–250. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1416-7>
- Khoiriyah, S., Hanapi, A., & Fasya, A. G. (2014). Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform, dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *ALCHEMY*, 3(2), 133–144. <https://doi.org/10.18860/al.v0i1.2914>
- Khoirunnisa, R., Susanti, R., Purwanti, N. U., & Nawawi, J. D. H. (2019). Penetapan Kadar Total Flavonoid dan Fenol Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Etanol Rimpang *Acorus* sp. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), 16
- Kristanti, A. N., Nanik, S. A., Mulyadi, T., & Bambang, K. (2008). *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga
- Kristiani, V., & Halim, F. I. (2014). Pengaruh Konsentrasi Etanol dan Waktu Maserasi Terhadap Perolehan Fenolik, Flavonoid, dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rambut Jagung. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Katolik Widya Mandala
- Kusmiyati, K., Aznam, N., & Handayani, S. (2011). Isolasi dan Identifikasi Zat Aktif Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma mangga* Val) Fraksi Etil Asetat. *Pharmaciana*, 1(2). <https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v1i2.519>
- Kusuma, F. A. (2021). Uji Toksisitas dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Pada Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) Hasil Ekstraksi Ultrasonik Variasi Pelarut. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Latif, R. A., Mustapa, M. A., & Duengo, S. (2018). Analisis Kadar Senyawa Flavonoid Ekstrak Metanol Kulit Batang Waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) dengan Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Seminar Nasional Farmasi Universitas Negeri Gorontalo*, 14
- Leong, T., Ashokkumar, M., & Kentish, S. (2016). The Growth of Bubbles in an Acoustic Field by Rectified Diffusion. In *Handbook of Ultrasonics and*

*Sonochemistry* (pp. 69–98). Springer Singapore.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-287-278-4\\_74](https://doi.org/10.1007/978-981-287-278-4_74)

- Lisan, F. R., & Palupi, S. (2015). Penentuan Jenis Tanin Secara Kualitatif dan Penetapan Kadar Tanin dari Serabut Kelapa (*Cocos nucifera* L.) Secara Permanganometri. *Calyptra: Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*, 4(1), 16.
- Mamonto, K. D., Ramadhan, A. M., & Rijai, L. (2015). Profil Kromatografi Lapis Tipis Metabolit Sekunder Ekstrak Fraksi Etil Asetat Daun Alpukat (*Persea americana* Mill) Hasil Pemisahan Kromatografi Kolom Gravitasi. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 100–107.  
<https://doi.org/10.25026/mpc.v1i1.14>
- Mamta, S., & Jyoti, S. (2012). Phytochemical Screening of *Acorus calamus* and *Lantana camara*. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(5), 3.
- Mardiyah, U., Fasya, A. G., & Amalia, S. (2014). Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Euclima spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *ALCHEMY*.  
<https://doi.org/10.18860/al.v0i0.2895>
- Mardaneni, I. (2017). Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Alga Merah (*Euclima cottoni*) Fraksi Etil Asetat Perairan Wongsorejo-Banyuwangi dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Mardiyah, U., Fasya, A. G., & Amalia, S. (2014). Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Euclima spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *ALCHEMY*.  
<https://doi.org/10.18860/al.v0i0.2895>
- Mariana, L., Andayani, Y., & Gunawan, E. R. (2013). Analisis Senyawa Flavonoid Hasil Fraksinasi Ekstrak Diklorometana Daun Keluwih. *Chemistry Progress*, 6, 6.
- Markham, K. (1981). *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: Penerbit ITB
- Maryam, F., Subehan, S., & Musthainah, L. (2020). Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Steroid Dari Ekstrak Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni* Jacq.). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 7(2), 6–11.  
<https://doi.org/10.33096/jffi.v7i2.647>
- Masduqi, A. F., & Rahardhian, M. R. R. (2021). Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) dengan Perbedaan. *Media Farmasi Indonesia*, 16(1), 7

- Maskura, N. (2021). Perbandingan Kadar Flavonoid Total Berdasarkan Perbedaan Konsentrasi Pelarut Etanol dari Ekstrak Daun Suruhan (*Peperomia pellucida* L. Kunth). *Skripsi*. Banjarmasin: Universitas Sari Mulia
- Masrihanah, A. (2020). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Ultrasonik Air, Metanol, Etanol, Etil Asetat, dan Petroleum Eter Daun Katuk (*Sauropus androgynous* L. Merr). *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Mawaddah. (2019). Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Mondong, F. R., Sangi, M. S., & Kumaunang, M. (2015). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Patikan Emas (*Euphorbia prunifolia* Jacq.) dan Bawang Laut (*Proiphys amboinensis* (L.) Herb). *Jurnal MIPA*, 4(1), 81. <https://doi.org/10.35799/jm.4.1.2015.6910>
- Muhridja, M., Bialangi, N., & Musa, W. JA. (2016). Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Repellent Nyamuk dari Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus*). *Jurnal ENTROPI*, 11 (2)
- Mulyono. (2012). *Kamus Kimia*. Jakarta: Bumi Aksara
- Mustarichie, R., & Runadi, D. (2021). Isolation and Identification of Flavonoids from Avocado Leaves (*Persea americana* Mill). *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 9(6), 7
- Muthulakshmi, T., Saleh, A. M., Kumari, N. V., Mohana, P. K., Palanichamy, V. (2015). Screening of Phytochemicals and In Vitro Antioxidant Activity of *Acorus calamus*. *Int. J. Drug Dev. & Res*, 7 (1)
- Najib, A. (2020). *Acorus calamus* L On Type 2 Diabetes Mellitus Medication. *Universal Journal of Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.22270/ujpr.v5i2.391>
- Nayaka, H. B., Londonkar, R. L., Umesh, M. K., & Tukappa, A. (2014). Antibacterial Attributes of Apigenin, Isolated from *Portulaca oleracea* L. *International Journal of Bacteriology*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/175851>
- Neha, B., Honey, J., Ranjan, B., & Mukesh, B. (2012). Pharmacognostical and Preliminary Phytochemical Investigation of *Acorus calamus* linn. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 2(1), 4. <https://doi.org/10.5958/2231-5691>
- Nelawati, Christina Dewi. (2007). Uji Potensi Antibakteri Ekstrak Polar Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) Terhadap *Bacillus subtilis*

ATCC 6633 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma

- Neldawati, Ratnawulan, & Gusnedi. (2013). Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pillar of Physics*, 2, 8
- Nuari, S., Anam, S., & Khumaidi, A. (2017). Isolation and Identification of Flavonoid Compounds from Ethanol Extract of Red Dragon Fruits (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C.Weber) Britton & Rose). *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 3(2), 118–125. <https://doi.org/10.22487/j24428744.0.v0.i0.8771>
- Nugraha, A. C., Prasetya, A. T., & Mursiti, S. (2017). Isolasi, Identifikasi, Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid sebagai Antibakteri dari Daun Mangga. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 6(2), 6
- Nugrahani, R., Andayani, Y., & Hakim, A. (2016). Skrining Fitokimia dari Ekstrak Buah Buncis (*Phaseolus vulgaris* L) dalam Sediaan Serbuk. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, 2(1). <https://doi.org/10.29303/jppipa.v2i1.38>
- Nuria, M., Wahyono, & Susidarti, R. A. (2011). Isolasi dan Identifikasi Kaempferol dari Daun Jangkang (*Homalocladium platycladum* (F. Muell) Bailey) Serta Aktivitas Antibakterinya. *Majalah Farmasi Indonesia*, 22(1), 1-8
- Nurmila, N., Sinay, H., & Watuguly, T. (2019). Identifikasi dan Analisis Kadar Flavonoid Ekstrak Getah Angsana (*Pterocarpus indicus* Willd) di Dusun Wanath Kecamatan Leihitu Kabupaten Maluku Tengah. *Biopendix: Jurnal Biologi, Pendidikan dan Terapan*, 5(2), 65–71. <https://doi.org/10.30598/biopendixvol5issue2page65-71>
- Pacheco-Fernández, I., & Pino, V. (2020). Extraction With Ionic Liquids-Organic Compounds. In *Liquid-Phase Extraction* (pp. 499–537). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00017-7>
- Padmasari, P. D., Astuti, K. W., & Warditiani, N. K. (2013). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Rimpang Bangle (*Zigiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(4)
- Paithankar, V. V., Belsare, S. L., Charde, R. M., & Vyas, J. V. (2011). *Acorus calamus*: An Overview. *International Journal of Biomedical Research*, 2(10), 518–529. <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i10.174>
- Paka, Y. R. (2019). Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.). *Karya Tulis Ilmiah*. Samarinda: Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Samarinda

- Panji, T. (2012). *Teknik Spektroskopi untuk Elusidasi Struktur Molekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Parki, A., Chaubey, P., Prakash, O., Kumar, R., & Pant, A. K. (2017). Seasonal Variation in Essential Oil Compositions and Antioxidant Properties of *Acorus calamus* L. Accessions. *Medicines*, 4(4), 81. <https://doi.org/10.3390/medicines4040081>
- Parubak, A. S. (2013). Senyawa Flavonoid yang Bersifat Antibakteri dari Akway (*Drimys beccariana*.Gibbs). *Chemistry Progress*, 6(1), 4.
- Parwata, A., Manuaba, P., & Yasa, S. (2018). The Potency of Flavonoid Compounds in Water Extract *Gyrinops Versteegii* Leaves as Natural Antioxidants Sources. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 11(3), 1501–1511. <https://doi.org/10.13005/bpj/1517>
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. (2009). *Introduction to Spectroscopy, Fourth Edition*. Canada: Nelson Education, Ltd. (Brooks/Cole Cengage Learning)
- Pękal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Podungge, M. R., Salimi, Y. K., & Duengo, S. (2017). Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Miana (*Coleus Scutelleroides* Benth.). *Jurnal Entropi*, 12(1), 8
- Pramitania, A. V. (2019). Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi N-Heksana Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Prisilla, D. H., Balamurugan, R., & Shah, H. R. (2012). Antidiabetic Activity of Methanol Extract of *Acorus calamus* in STZ Induced Diabetic Rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S941–S946. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60341-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60341-4)
- Purwanti, N. U., & Susanti, R. (2016). Uji Aktivitas Antibakteri dan Antifungal Ekstrak Etanol Rimpang *Acorus* sp. *Jurnal Kesehatan Khatulistiwa*, 2(1)
- Purwanto, B. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Putri, A. H., Putriyana, R. S., & Silviani, N. (2019). Isolasi dan Ekstraksi Kelompok Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Daun Cocor Bebek (*Kalanchoe*



- pinnata*). *Fullerene Journal of Chemistry*, 4(2), 28. <https://doi.org/10.37033/fjc.v4i2.52>
- Putri, D. M., & Lubis, S. S. (2020). Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Daun Kalayu (*Erioglossum rubiginosum* (Roxb.) Blum). *AMINA: Ar-Raniry Chemistry Journal*, 2(3), 6.
- Quiroz, J. Q., Duran, A. M. N., Garcia, M. S., Gomez, G. L. C., & Camargo, J. J. R. (2019). Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from *Annatto seeds*, Evaluation of Their Antimicrobial and Antioxidant Activity, and Identification of Main Compounds by LC/ESI-MS Analysis. *International Journal of Food Science*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/3721828>
- Rachman, A., Wardatun, S., & Weandarlina, I. Y. (2015). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Saponin Ekstrak Metanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Farmasi*, 1(1), 6.
- Rahmawati, Y. D. (2017). Variasi Eluen pada Pemisahan Senyawa Triterpenoid dan Steroid Alga Merah *Eucheuma spinosum* Menggunakan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Rajhard, S., Hladnik, L., Vicente, F. A., Srčić, S., Grilc, M., & Likozar, B. (2021). Solubility of Luteolin and Other Polyphenolic Compounds in Water, Nonpolar, Polar Aprotic, and Protic Solvents by Applying FTIR/HPLC. *Processes*, 9(11), 1952. <https://doi.org/10.3390/pr9111952>
- Rajput, S. B., Tonge, M. B., & Karuppaiyil, S. M. (2013). An Overview on Traditional Uses and Pharmacological Profile of *Acorus calamus* Linn. (Sweet flag) and Other *Acorus* Species. *Phytomedicine*, 21(3), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.020>
- Reddy, A. V. B., Moniruzzaman, M., Madhavi, V., & Jaafar, J. (2020). Recent Improvements in The Extraction, Cleanup, and Quantification of Bioactive Flavonoids. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 66, pp. 197–223). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817907-9.00008-8>
- Rengarajan, S., Melanathuru, V., Govindasamy, C., Chinnadurai, V., & Elsadek, M. F. (2020). Antioxidant Activity of Flavonoid Compounds Isolated from The Petals of *Hibiscus rosa sinensis*. *Journal of King Saud University - Science*, 32(3), 2236–2242. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.02.028>
- Rita, W. S., & Kawuri, R. (2017). The Essential Oil Contents of Jeringau (*Acorus calamus* L.) Rhizomes and Their Antifungal Activity Against *Candida albicans*. *Journal of Health Sciences and Medicine*, 1(1), 6.

- Rita, W. S., Suirta, I. W., & Utami, P. P. P. (2017). Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Rimpang Jeringau. *Journal of Applied Chemistry*, 5, 7.
- Ritna, A., Anam, S., & Khumaidi, A. (2016). Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Fraksi Etil Asetat Benalu Batu (*Begonia* sp.) Asal Kabupaten Morowali Utara. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 2(2), 83–89. <https://doi.org/10.22487/j24428744.2016.v2.i2.5957>
- Riwanti, P., Izazih, F., & Amaliyah, A. (2018). Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Etanol Pada Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 50,70 dan 96% *Sargassum polycystum* dari Madura. *Journal of Pharmaceutical-care Anwar Medika*, 2(2), 35–48. <https://doi.org/10.36932/jpcam.v2i2.1>
- Romadanu., Rachmawati, S. H., & Lestari, S. D. (2014). Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Fishtech*, 3(1), 7
- Roohinejad, S., Nikmaram, N., Brahim, M., Koubaa, M., Khelfa, A., & Greiner, R. (2017). Chapter 16—Potential of Novel Technologies for Aqueous Extraction of Plant Bioactives. *Water Extraction of Bioactive Compounds*, 16, 21
- Rosita, J. M., Taufiqurrahman, I., & Edyson. (2017). Perbedaan Total Flavonoid antara Metode Maserasi dengan Sokletasi pada Ekstrak Daun Binjai (*Mangifera caesia*). *DENTINO: Jurnal Kedokteran Gigi*, 1(1), 6
- Rusdi, N. K., Hikmawanti, N. P. E., Maifitrianti, M., Ulfah, Y. S., & Annisa, A. T. (2018). Aktivitas Afrodisiaka Fraksi dari Ekstrak Etanol 70% Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L). Merr) pada Tikus Putih Jantan. *Pharmaceutical Science and Research*, 5(3), 10
- Safrina, N., & Susanti, R. (2018). Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Rimpang Jeringau Merah (*Acorus* Sp.) Terhadap Radang Kaki Tikus Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Karagenan. *Jurnal Cermin Dunia Kedokteran*, 45(6), 5
- Saleh, H. A., Saokani, J., & Rijal, S. (2016). Penentuan Nilai Kalor Serta Pengaruh Asam Klorida (Hcl) Terhadap Kadar Bioetanol Bonggol Pisang (*Musa Paradisiacal*). *Al-Kimia*, 4(1), 68–77. <https://doi.org/10.24252/al-kimia.v4i1.1458>
- Salim, Z., & Munadi, E. (2017). *Info Komoditi Tanaman Obat*. Jakarta: Kementerian Perdagangan Republik Indonesia
- Saman, Sri Iin. (2013). Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Rimpang Jeringau. *Skripsi*. Gorontalo: Universitas Negeri Gorontalo

- Sangi, M. S., Momuat, L. I., & Kumaunang, M. (2012). Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Tepung Gabah Pelepah Aren (*Arenga pinnata*). *Jurnal Ilmiah Sains*, 12(2), 127. <https://doi.org/10.35799/jis.12.2.2012.716>
- Saputra, T. R., Ngatin, A., & Sarungu, Y. T. (2018). Penggunaan Metode Ekstraksi Maserasi dan Partisi Pada Tumbuhan Cocor Bebek (*Kalanchoe pinnata*) dengan Kepolaran Berbeda. *Fullerene Journal of Chemistry*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.37033/fjc.v3i1.26>
- Sari, D. Y., R, W., & An, T. (2021). Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Jamur Susu Harimau (*Lignosus rhinocerus*). *Jurnal Farmasi Udayana*, 23. <https://doi.org/10.24843/JFU.2021.v10.i01.p03>
- Sari, R. Y., Wardenaar, E., & Muflihati. (2014). Ethnobotany of Medical Plants in Serembai Village, Sub-District of Kembayan, Sanggau, West Kalimantan. *Jurnal Hutan Lestari*, 2(3) 9.
- Sastrohamidjojo. (1991). *Spektroskopi*. Yogyakarta: Liberty
- Satolom, C. C., Runtuwene, M. R. J., & Abidjulu, J. (2015). Isolasi Senyawa Flavonoid Pada Biji Pinang Yaki (*Areca vestiaria* Giseke). *Jurnal MIPA*, 4(1), 40. <https://doi.org/10.35799/jm.4.1.2015.6903>
- Saxena, P., & Saxena, P. (2014). In-Vitro and in-Vivo Evaluation of Anti Asthmatic Activity of Rhizomes Extract of *Acorus calamus* (Linn.) in Guinea Pigs. *Research Journal of Pharmaceutical Science*, 3(5) 1 - 6
- Septyaningsih, Dyah. (2010). Isolasi dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* lamk). *Skripsi*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret Surakarta
- Sharma, V., Singh, I., & Chaudhary, P. (2014). *Acorus calamus* (The Healing Plant): A Review on Its Medicinal Potential, Micropropagation, and Conservation. *Natural Product Research*, 28(18), 1454–1466. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.915827>
- Shihab, M. Q. (2002). *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian AlQur'an Volume 10 Surah Asy-Syu'ara, Surah An-naml, Surah Al-Qashash, Surah Al-Ankabut*. Jakarta: Lentera Hati
- Sholihah, M., Ahmad, U., & Budiastira, I. W. (2017). Application of Ultrasonic Wave to Increase Extraction Yield and Effectiveness of Antioxidant from *Mangosteen Rind*. *Jurnal Keteknik Pertanian*, 05(2), 1–11. <https://doi.org/10.19028/jtep.05.2.161-168>
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A

- critical evaluation. *LWT*, 150, 111932.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
- Siadi, K. (2012). Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar *Jatropha curcas* Sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl
- Silaa, A. E., Paransa, D. S., Rumengan, A. P., Kemer, K., Rumampuk, N. D., & Manoppo, H. (2019). Pemisahan Jenis Pigmen Karotenoid dari Kepiting *Grapsus* sp Jantan Menggunakan Metode Kromatografi Kolom. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 7(2), 121.  
<https://doi.org/10.35800/jplt.7.2.2019.24247>
- Silalahi, M. (2018). Senyawa Bioaktif Pada *Acorus calamus* (L.) dan Pemanfaatannya Sebagai Obat Kanker dan Antimikroba. *Jurnal Dinamika Pendidikan*, 11(1), 95. <https://doi.org/10.33541/jdp.v11i1.799>
- Silva, S. D., Feliciano, R. P., Boas, L. V., & Bronze, M. R. (2014). Application of FTIR-ATR to Moscatel Dessert Wines for Prediction of Total Phenolic and Flavonoid Contents and Antioxidant Capacity. *Food Chemistry*, 150, 489–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.028>
- Socrates, G. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies Tables and Charts Second Edition*. United Kingdom: The University of West London
- Sofyan, A., Widodo, E., & Natsir, H. (2017). Bioactive Component, Antioxidant Activity, and Fatty Acid Profile of Red Beewort (*Acorus* sp) and White Beewort (*Acorus calamus*). *Jurnal Teknologi Pertanian*, 18(3), 173–180.  
<https://doi.org/10.21776/ub.jtp.2017.018.03.17>
- Srividya, A., Aishwaria, S., & Vishnuvarthan, V. (2014). Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxicity Activity of Hydroethanolic Extract and its Fractions of *Acorus calamus* linn. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS)*, 3(1), 13.
- Suhaenah, A., & Nuryanti, S. (2017). Skrining Fitokimia Ekstrak Jamur Kancing (*Agaricus bisporus*). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 4(1), 199–204.  
<https://doi.org/10.33096/jffi.v4i1.228>
- Suharyanto, S., & Hayati, T. N. (2021). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Buah Gambas (*Luffa acutangula* (L.) Roxb.) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia*, 18(1), 82–88. <https://doi.org/10.23917/pharmacon.v18i01.10916>
- Suhendi, A., Sjahid, L. R., & Hanwar, D. (2011). Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.). *Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia*, 12(2), 73–81.  
<https://doi.org/10.23917/pharmacon.v12i2.36>

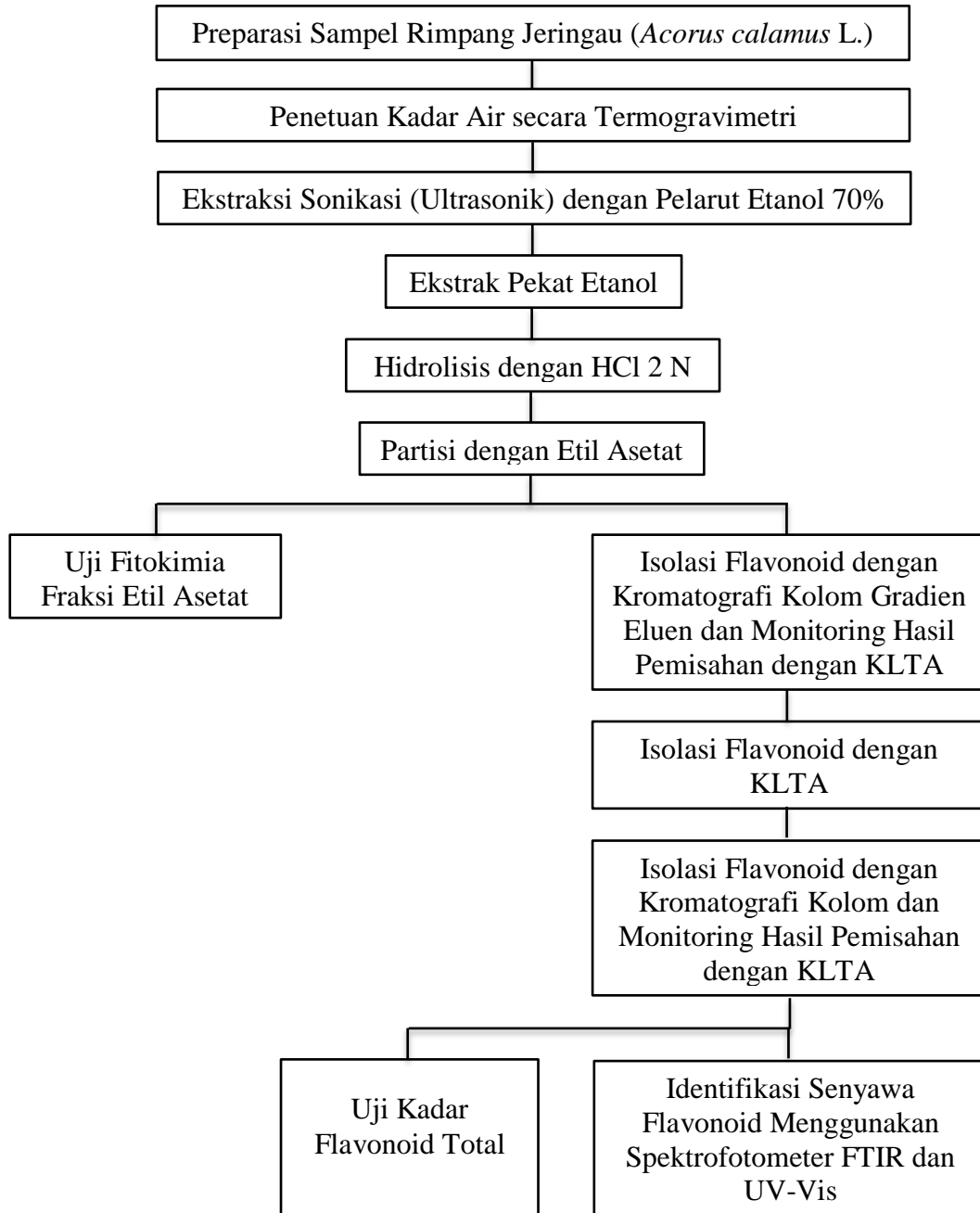
- Suhendra, C. P., Widarta, I. W. R., & Wiadnyani, A. A. I. S. (2019). Pengaruh Konsentrasi Etanol Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rimpang Ilalang (*Imperata cylindrica* (L) Beauv.) Pada Ekstraksi Menggunakan Gelombang Ultrasonik. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 8(1), 27. <https://doi.org/10.24843/itepa.2019.v08.i01.p04>
- Sukmawati, N. A. (2012). Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Dlingo (*Acorus calamus* Linn). *Skripsi*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret
- Sulastris, S., & Kristianingrum, S. (2010). Berbagai Macam Senyawa Silika: Sintesis, Karakterisasi, dan Pemanfaatan. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan, dan Penerapan MIPA*, 6
- Suteja, I. K. P., Rita, W. S., & Gunawan, I. W. G. (2016). Identifikasi dan Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Daun Trembesi (*Albizia saman* (Jacq.) Merr) sebagai Antibakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia*. <https://doi.org/10.24843/JCHEM.2016.v10.i01.p19>
- Tagousop, C. N., Tamokou, J.-D., Ekom, S. E., Ngnokam, D., & Voutquenne-Nazabadioko, L. (2018). Antimicrobial Activities of Flavonoid Glycosides from *Graptophyllum grandulosum* and Their Mechanism of Antibacterial Action. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 252. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2321-7>
- Tambun, R., Limbong, H. P., Pinem, C., & Manurung, E. (2016). Pengaruh Ukuran Partikel, Waktu, dan Suhu Pada Ekstraksi Fenol dari Lengkuas Merah. *Jurnal Teknik Kimia USU*, 5(4), 53–56. <https://doi.org/10.32734/jtk.v5i4.1555>
- Taofik, M., Yulianti, E., Barizi, A., & Hayati, E. K. (2010). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Air Daun Paitan (*Thitonia Diversifolia*) sebagai Bahan Insektisida Botani untuk Pengendalian Hama Tungau Eriophyidae. *Alchemy*, 2(1), 104-157
- Tarakanita, D. N. S., Satriadi, T., & Jauhari, A. (2019). Potensi Keberadaan Fitokimia Kamalaka (*Phyllanthus emblica*) Berdasarkan Perbedaan Ketinggian Tempat Tumbuh. *Jurnal Sylva Scientiae*, 02(4), 10.
- Tiwari, N., Mishra, A., Bhatt, G., & Chaudhary, A. (2015). Anti-stress Activity of A Bioflavanoid: Quercetin from *Euphorbia hirta*. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 6(2), 68–75. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2015/16143>
- Tonius, J., Wibowo, M. A., & Idiawati, N. (2016). Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid Fraksi n-Heksana. *JKK* 5(1), 7

- Trinovita, Y., Mundriyastutik, Y., Fanani, Z., & Fitriyani, A. N. (2019). Evaluasi Kadar Flavonoid Total Pada Ekstrak Etanol Daun Sangketan (*Achyranthes aspera*) dengan Spektrofotometri. *Indonesia Jurnal Farmasi*, 4(1), 7.
- Tungmunnithum, D., Drouet, S., Kabra, A., & Hano, C. (2020). Enrichment in Antioxidant Flavonoids of Stamen Extracts from *Nymphaea lotus* L. Using Ultrasonic-Assisted Extraction and Macroporous Resin Adsorption. *Antioxidants*, 9(7), 576. <https://doi.org/10.3390/antiox9070576>
- Tunnisa, T., & Mursiti, S. (2018). *Isolasi Flavonoid Kulit Buah Durian dan Uji Aktivasnya sebagai Antirayap*. 7.
- Umamaheshwari, N., & Rekha, A. (2018). Sweet flag: (*Acarus calamus*)-An Incredible Medicinal Herb. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(7), 8.
- Vijayalakshmi, A., Kumar, P. R., Sakthi Priyadarsini, S., & Meenaxshi, C. (2013). In Vitro Antioxidant and Anticancer Activity of Flavonoid Fraction from the Aerial Parts of *Cissus quadrangularis* Linn. Against Human Breast Carcinoma Cell Lines. *Journal of Chemistry*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/150675>
- Wahyudi, J., Wibowo, W. A., Rais, Y. A., & Kusumawardani, A. (2011). Pengaruh Suhu Terhadap Kadar Glukosa Terbentuk dan Konstanta Kecepatan Reaksi pada Hidrolisa Kulit Pisang. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan,"* 5.
- Wang, T., Li, Q., & Bi, K. (2018). Bioactive Flavonoids in Medicinal Plants: Structure, Activity, and Biological Fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- Wati, N. F. N. (2016). Peningkatan Kualitas Minyak Nilam Melalui Proses Adsorpsi Menggunakan Adsorben  $\Gamma$ -Alumina dengan Sistem Flow. *Indonesian Journal of Chemical Research*, 2(1), 84–95. <https://doi.org/10.20885/chemical.vol2.iss1.art10>
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., & Luo, X. (2018). Advances in Ultrasound Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Cash Crops – A Review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>
- Wilantari, P. D., Putri, N. R. A., Putra, D. G. P., & Samirana, P. O. (2019). Isolasi Kafein dengan Metode Sublimasi dari Fraksi Etil Asetat Serbuk Daun Teh Hitam (*Camelia sinensis*). *Jurnal Farmasi Udayana*, 8(1), 10
- Winangsih, Prihastanti, E., & Parman, S. (2013). Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Kualitas Simplisia. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, XXI(1), 7. <https://doi.org/10.14710/baf.v21i1.6268>

- Wonorahardjo, S. (2013). *Metode-Metode Pemisahan Kimia*. Jakarta: Akademia Permata
- Wulandari, R., Wibowo, M. A., & Liana, D. F. (2015). Rimpang Jeringau Merah (*Acorus calamus* Linn.). *Jurnal Cerebellum*, 1(4), 15.
- Yamagata, K. (2019). Metabolic Syndrome: Preventive Effects of Dietary Flavonoids. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 60, pp. 1–28). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64181-6.00001-2>
- Yuniwati, M., Ismiyati, D., & Kurniasih, R. (2011). Kinetika Reaksi Hidrolisis Pati Pisang Tanduk dengan Katalisator Asam Chlorida. *Jurnal Teknologi*, 4, 7
- Zahari, N. A. A. R., Chong, G. H., Abdullah, L. C., & Chua, B. L. (2020). Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) Process on Thymol Concentration from *Plectranthus amboinicus* Leaves: Kinetic Modeling and Optimization. *Processes*, 8(3), 322. <https://doi.org/10.3390/pr8030322>
- Zaki, M. M. (2013). Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak n-Heksana Lumut Hati *Mastigophora diclados* (Bird. Ex Web) Ness. *Skripsi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
- Zheng, L.-L., Wen, G., Yuan, M.-Y., & Gao, F. (2016). Ultrasound-Assisted Extraction of Total Flavonoids from Corn Silk and Their Antioxidant Activity. *Journal of Chemistry*, 2016, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2016/8768130>

## LAMPIRAN

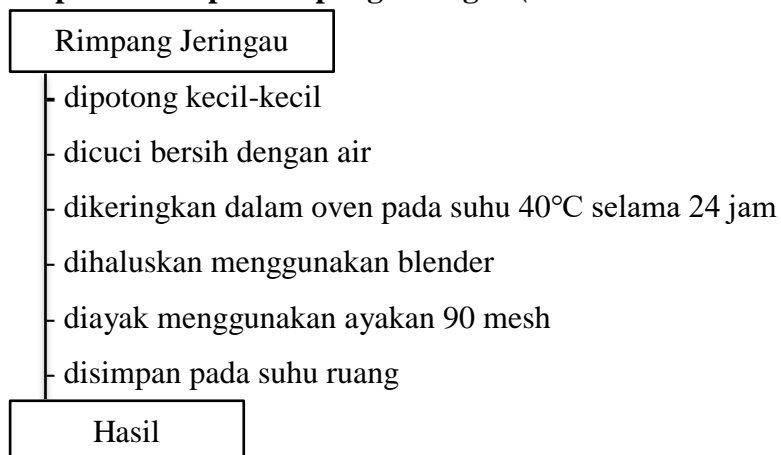
### Lampiran 1. Rancangan Penelitian



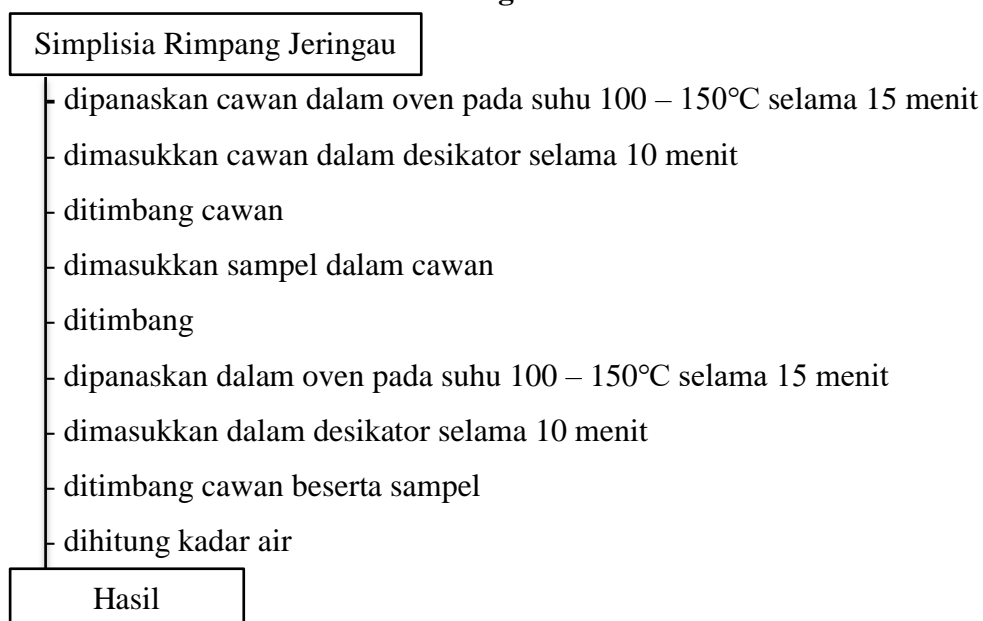


## Lampiran 2. Diagram Alir

### 2.1 Preparasi Sampel Rimpang Jeringau (*Acorus calamus L.*)



### 2.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri



### 2.3 Ekstraksi Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) Menggunakan Metode Sonikasi (Ultrasonik)

#### Simplisia Rimpang Jeringau

- ditimbang sebanyak 30 g
- dilarutkan dalam 300 mL pelarut etanol 70%
- diekstraksi menggunakan *ultrasonic* selama 30 menit pada suhu kamar dan frekuensi 47 kHz
- disaring menggunakan *corong buchner*
- dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C selama 10 - 30 menit hingga pelarut benar-benar menguap
- ditimbang rendemen
- dihitung rendemen

Hasil

### 2.4 Hidrolisis Ekstrak Etanol Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

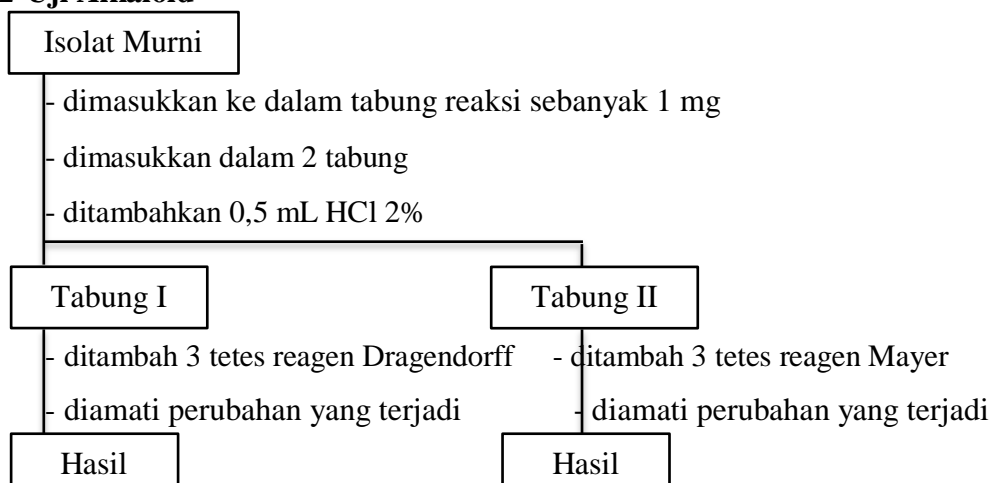
#### Ekstrak Pekat Etanol

- ditimbang sebanyak 5 g
- ditambahkan dengan HCl 2 N sebanyak 10 mL
- dihomogenkan menggunakan *shaker* pada suhu ruang selama 1 jam
- ditambahkan dengan natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) hingga pH netral

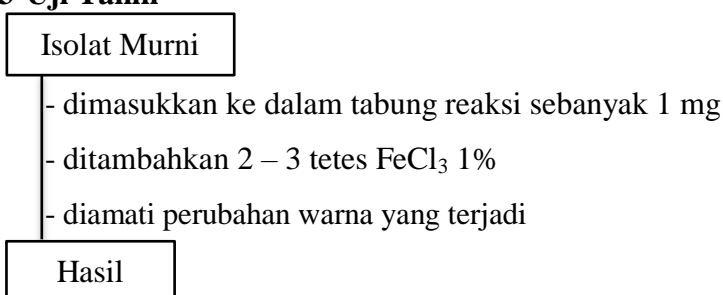
Hasil



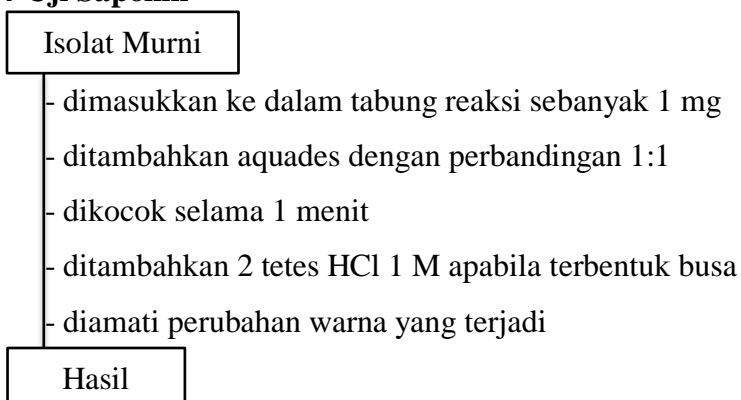
### 2.6.2 Uji Alkaloid



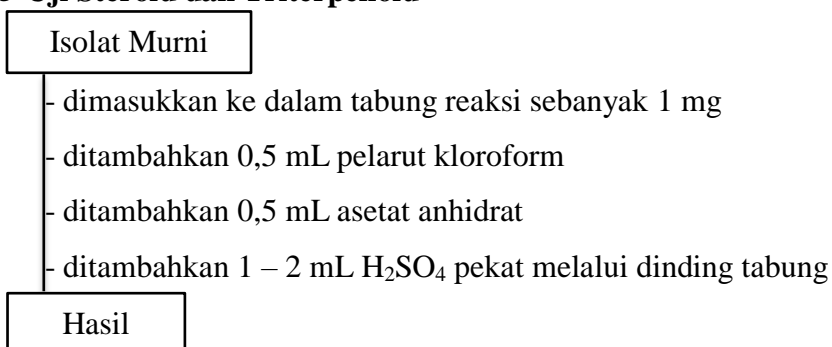
### 2.6.3 Uji Tanin



### 2.6.4 Uji Saponin

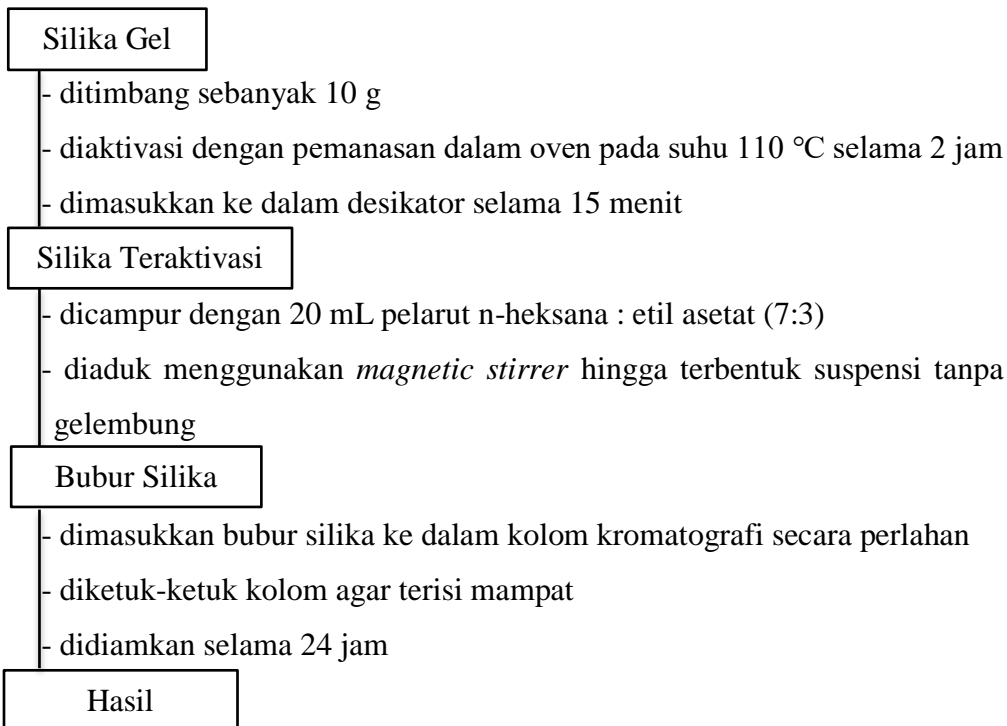


### 2.6.5 Uji Steroid dan Triterpenoid

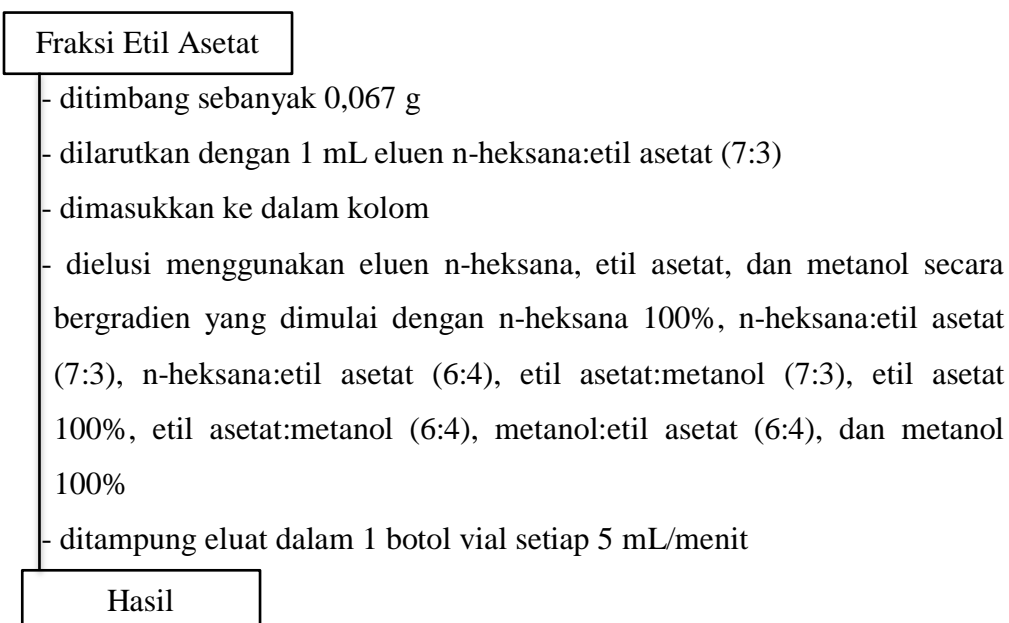


## 2.7 Isolasi Flavonoid dengan Kromatografi Kolom Gradien Eluen dan Monitoring Hasil Pemisahan dengan KLTA

### 2.7.1 Pembuatan Bubur Silika dan Persiapan Kolom



### 2.7.2 Pemisahan Fraksi Etil Asetat dengan Kromatografi Kolom Gradien Eluen



### 2.7.3 Monitoring Hasil Kromatografi Kolom dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Analitik

#### Isolat Hasil Kromatografi Kolom

- disiapkan eluen n-heksana:etil asetat (7:3) dalam bejana pengembang
- dijenuhkan selama 1 jam
- ditandai plat silika gel 1 cm pada batas atas dan bawah
- dioven plat silika gel pada suhu 110°C selama 30 menit
- ditotolkan isolat pada plat silika gel sebanyak 10 kali
- dimasukkan plat silika ke dalam bejana pengembang
- dielusi sampai tanda batas atas
- dideteksi noda/spot hasil pemisahan dengan menyemprotkan ammoniak
- diamati noda/spot hasil pemisahan di bawah sinar UV (366 nm)
- dihitung nilai  $R_f$

Hasil

### 2.8 Isolasi Flavonoid dengan KLTA

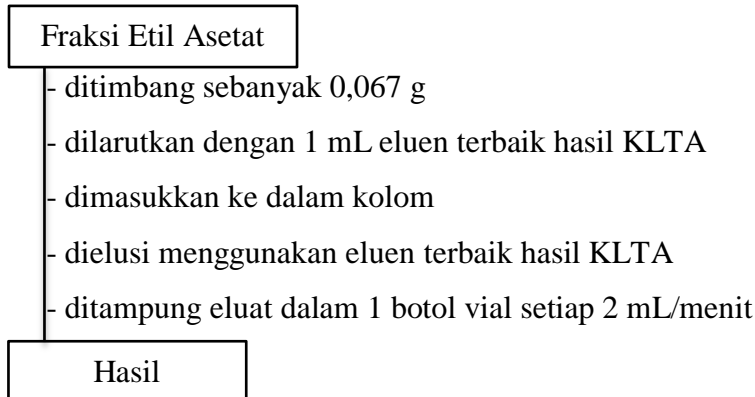
#### Fraksi Etil Asetat Rimpang Jeringau

- disiapkan eluen campuran n-heksana:etil asetat (8:2), n-heksana:etil asetat (7:3), n-heksana:etil asetat (6:4), dan n-heksana:etil asetat (4:6) dalam bejana pengembang
- dijenuhkan selama 1 jam
- ditandai plat silika gel 1 cm pada batas atas dan bawah
- dioven plat silika gel pada suhu 110°C selama 30 menit
- ditotolkan isolat pada plat silika gel sebanyak 10 kali
- dimasukkan plat silika ke dalam bejana pengembang
- dielusi sampai tanda batas atas
- dideteksi noda/spot hasil pemisahan dengan menyemprotkan ammoniak
- diamati noda/spot hasil pemisahan di bawah sinar UV (366 nm)
- dihitung nilai  $R_f$

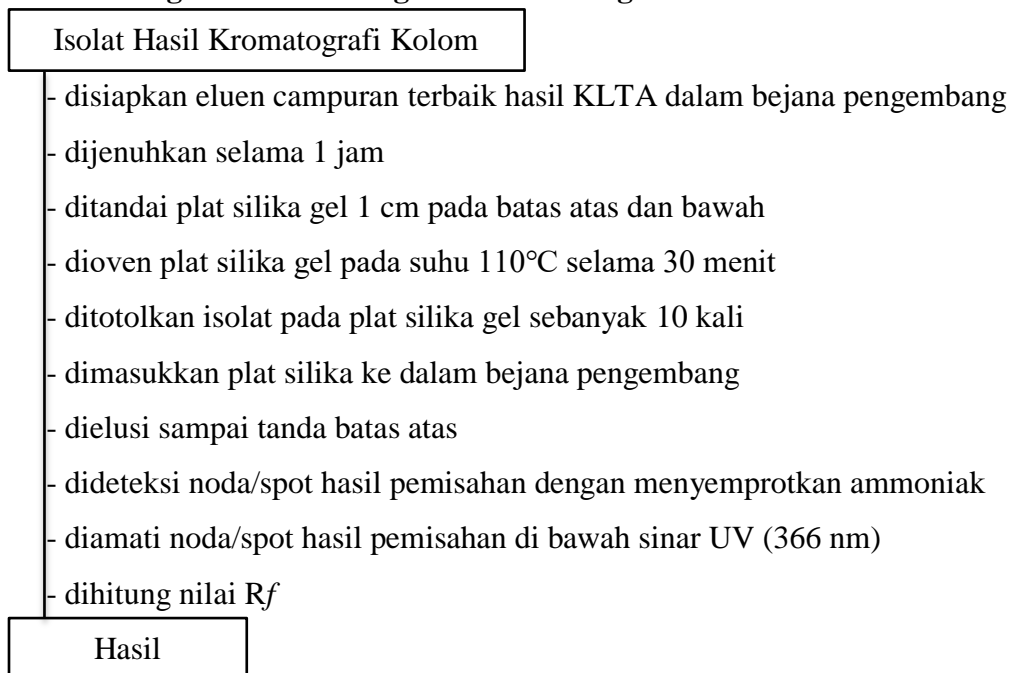
Hasil

## 2.9 Isolasi Flavonoid dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring Hasil Pemisahan dengan KLTA

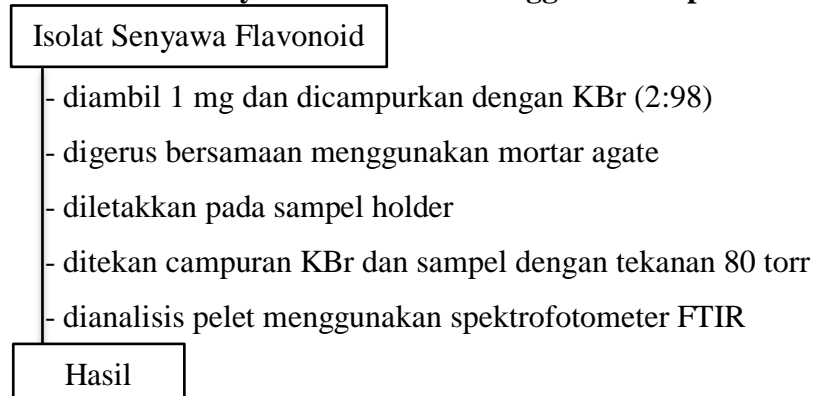
### 2.9.1 Pemisahan Fraksi Etil Asetat dengan Kromatografi Kolom



### 2.9.2 Monitoring Hasil Kromatografi Kolom dengan KLTA



## 2.10 Identifikasi Senyawa Flavonoid Menggunakan Spektrofotometer FTIR



## 2.11 Identifikasi Senyawa Flavonoid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

### 2.11.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Isolat

Isolat Flavonoid

- dilarutkan masing-masing isolat dalam 10 mL etanol p.a
- diambil masing-masing isolat sebanyak 2 mL
- dilakukan analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200 – 800 nm
- dicatat hasil analisis berupa panjang gelombang maksimum dan absorbansi sampel

Hasil

### 2.11.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Isolat + Pereaksi Geser

Isolat Flavonoid

- dilarutkan masing-masing isolat dalam 10 mL etanol p.a
- diambil masing-masing isolat sebanyak 2 mL
- ditambahkan 6 tetes  $\text{AlCl}_3$  10%
- ditambahkan 250 mg bubuk natrium asetat
- dikocok hingga homogen
- dilakukan analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200 – 800 nm
- dicatat hasil analisis berupa panjang gelombang maksimum dan absorbansi sampel

Hasil

## 2.12 Pembuatan Larutan Blanko

Etanol p.a

- diambil sebanyak 2 mL
- ditambahkan 0,10 mL  $\text{AlCl}_3$  10%
- ditambahkan 0,10 mL natrium asetat 1 M
- ditambahkan 2,80 mL akuabides

Hasil



### 2.12.1 Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Kuersetin

- ditimbang sebanyak 0,01 g
- dilarutkan dengan 10 mL etanol p.a

Larutan Baku Kuersetin 1000  $\mu\text{g/mL}$

- dibuat larutan standar dengan konsentrasi 9, 12, 15, 18, 21, dan 24  $\mu\text{g/mL}$
- diambil masing-masing larutan standar sebanyak 2 mL
- ditambahkan 0,10 mL  $\text{AlCl}_3$  10%
- ditambahkan 0,10 mL natrium asetat 1 M
- ditambahkan 2,80 mL akuabides
- diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar
- diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum kuersetin
- dibuat kurva kalibrasi

Hasil

### 2.12.2 Penetapan Kadar Flavonoid Pada Isolat Hasil Kromatografi Kolom

Isolat Hasil Kolom

- diambil sebanyak 1,5 mL
- ditambahkan 0,075 mL  $\text{AlCl}_3$  10%
- ditambahkan 0,075 mL natrium asetat 1 M
- ditambahkan 2,10 mL akuabides
- diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar
- diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum larutan baku

Hasil

### Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

#### L.3.1 Pembuatan Larutan HCl 2 N

Diketahui:

- Konsentrasi HCl = 37%
- Berat jenis larutan HCl = 1,19 g/mL = 1190 g/L
- Berat molekul HCl = 36,46 g/mol
- n = 1 (jumlah ion H<sup>+</sup>)

Ditanya: Larutan HCl 2 N?

Jawab:

$$\begin{aligned}
 \text{- Normalitas HCl} &= n \times \text{Molalitas HCl} \\
 &= n \times \frac{\text{Konsentrasi HCl} \times \text{Berat Jenis HCl}}{\text{Berat Molekul HCl}} \\
 &= 1 \times \frac{37\% \times 1190 \text{ g/L}}{36,46 \text{ g/mol}} \\
 &= 12,08 \text{ N}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 - V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\
 V_1 \times 12,08 \text{ N} &= 100 \text{ mL} \times 2 \text{ N} \\
 V_1 &= 16,6 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl 37% sebanyak 16,6 mL. Kemudian, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Selanjutnya, ditambah aquades hingga tanda batas dan dihomogenkan.

#### L.3.2 Pembuatan Larutan HCl 2%

Diketahui:

- M<sub>1</sub> HCl = 37%
- M<sub>2</sub> HCl = 2%
- V<sub>2</sub> HCl = 100 mL

Ditanya: V<sub>1</sub> HCl?

Jawab:

$$\begin{aligned}
 - V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 \times 37\% &= 100 \text{ mL} \times 2\% \\
 V_1 &= 5,4 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl 37% sebanyak 5,4 mL. Kemudian, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Selanjutnya, ditambah aquades hingga tanda batas dan dihomogenkan.

### L.3.3 Pembuatan Larutan NaHCO<sub>3</sub>

NaHCO<sub>3</sub> memiliki kelarutan sebesar 9,99 gram dalam 100 mL akuades, untuk membuat larutan NaHCO<sub>3</sub> jenuh dengan ditimbang NaHCO<sub>3</sub> dengan berat lebih dari 9,99 gram. Kemudian dilarutkan dalam akuades sampai terdapat endapan padat yang tidak larut. Lalu disaring untuk memisahkan endapan dan filtrat sehingga didapatkan larutan NaHCO<sub>3</sub> jenuh.

### L.3.4 Pembuatan Larutan FeCl<sub>3</sub> 1%

$$\begin{aligned} \text{BM FeCl}_3 &= 162,2 \text{ g/mol} \\ \text{Massa FeCl}_3 &= \frac{1\% \times \text{BM FeCl}_3 \times V}{22,4 \text{ mol}} \\ &= \frac{1\% \times 162,2 \text{ g/mol} \times V}{22,4 \text{ mol}} \\ &= 0,072 \text{ g} = 72 \text{ mg} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan FeCl<sub>3</sub> 1% adalah ditimbang serbuk besi (III) klorida sebanyak 72 mg. Kemudian, dimasukkan ke dalam beaker glass 50 mL. Selanjutnya, ditambahkan ± 3 mL aquades untuk melarutkan dengan dibantu pengadukan. Kemudian, dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditandabatkan dengan aquades dan dihomogenkan.

### L.3.5 Pembuatan Eluen

#### L.3.5.1 Eluen Kromatografi Kolom

Eluen yang digunakan adalah n-heksana, etil asetat, dan metanol dengan perbandingan n-heksana:etil asetat (7:3 dan 6:4), etil asetat:metanol (7:3, 6:4, dan 4:6) dengan volume total pada masing-masing perbandingan sebesar 30 mL.

- a. n-heksana:etil asetat (7:3)

$$\text{n-heksana} = \frac{7}{10} \times 30 \text{ mL} = 21 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{3}{10} \times 30 \text{ mL} = 9 \text{ mL}$$

b. n-heksana:etil asetat (6:4)

$$\text{n-heksana} = \frac{6}{10} \times 30 \text{ mL} = 18 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{4}{10} \times 30 \text{ mL} = 12 \text{ mL}$$

c. etil asetat:metanol (7:3)

$$\text{etil asetat} = \frac{7}{10} \times 30 \text{ mL} = 21 \text{ mL}$$

$$\text{metanol} = \frac{3}{10} \times 30 \text{ mL} = 9 \text{ mL}$$

d. etil asetat:metanol (6:4)

$$\text{etil asetat} = \frac{6}{10} \times 30 \text{ mL} = 18 \text{ mL}$$

$$\text{metanol} = \frac{4}{10} \times 30 \text{ mL} = 12 \text{ mL}$$

e. etil asetat:metanol (4:6)

$$\text{etil asetat} = \frac{4}{10} \times 30 \text{ mL} = 12 \text{ mL}$$

$$\text{metanol} = \frac{6}{10} \times 30 \text{ mL} = 18 \text{ mL}$$

### L.3.5.2 Eluen Monitoring KLTA

Eluen yang digunakan untuk monitoring KLTA hasil kromatografi kolom adalah n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 7:3 dalam 10 mL.

$$\text{n-heksana} = \frac{7}{10} \times 10 \text{ mL} = 7 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{3}{10} \times 10 \text{ mL} = 3 \text{ mL}$$

### L.3.6 Pembuatan Larutan $\text{AlCl}_3$ 10%

$$\text{BM AlCl}_3 = 133,5 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa AlCl}_3 = \frac{10\% \times \text{BM AlCl}_3 \times V}{22,4 \text{ mol}}$$

$$= \frac{10\% \times 133,5 \text{ g/mol} \times V}{22,4 \text{ mol}}$$

$$= 0,596 \text{ g} = 596 \text{ mg}$$

Pembuatan larutan  $\text{AlCl}_3$  10% adalah ditimbang serbuk besi (III) klorida sebanyak 596 mg. Kemudian, dimasukkan ke dalam beaker glass 50 mL.

Selanjutnya, ditambahkan  $\pm 3$  mL aquades untuk melarutkan dengan dibantu pengadukan. Kemudian, dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditandabatkan dengan aquades dan dihomogenkan.

### L.3.7 Pembuatan Larutan Baku Kuersetin 100 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm} &= \mu\text{g/mL} \\ \mu\text{g} &= \text{ppm} \times \text{mL} \\ &= 1000 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\ &= 10.000 \mu\text{g} = 10 \text{ mg} = 0,01 \text{ g} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan stok 1000 ppm dilakukan dengan dimasukkan 10 mg kuersetin ke dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya, dilarutkan dengan etanol p.a hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan baku kuersetin 100 ppm dibuat dengan melarutkan 1 mL larutan stok dengan etanol p.a hingga volume larutan 10 mL.

### L.3.8 Pembuatan Larutan Standar Kuersetin 9, 12, 15, 18, 21, dan 24 ppm

#### a. 9 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ 10 \text{ mL} \times 9 \text{ ppm} &= V_2 \times 100 \text{ ppm} \\ &= \frac{10 \text{ mL} \times 9 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 0,9 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 10 mL larutan standar 9 ppm diperlukan larutan baku 100 ppm sebanyak 0,9 mL.

#### b. 12 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ 10 \text{ mL} \times 12 \text{ ppm} &= V_2 \times 100 \text{ ppm} \\ &= \frac{10 \text{ mL} \times 12 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 1,2 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 10 mL larutan standar 12 ppm diperlukan larutan baku 100 ppm sebanyak 1,2 mL.

**c. 15 ppm**

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 10 \text{ mL} \times 15 \text{ ppm} &= V_2 \times 100 \text{ ppm} \\
 &= \frac{10 \text{ mL} \times 15 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\
 &= 1,5 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 10 mL larutan standar 15 ppm diperlukan larutan baku 100 ppm sebanyak 1,5 mL.

**d. 18 ppm**

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 10 \text{ mL} \times 18 \text{ ppm} &= V_2 \times 100 \text{ ppm} \\
 &= \frac{10 \text{ mL} \times 18 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\
 &= 1,8 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 10 mL larutan standar 18 ppm diperlukan larutan baku 100 ppm sebanyak 1,8 mL.

**e. 21 ppm**

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 10 \text{ mL} \times 21 \text{ ppm} &= V_2 \times 100 \text{ ppm} \\
 &= \frac{10 \text{ mL} \times 21 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\
 &= 2,1 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 10 mL larutan standar 21 ppm diperlukan larutan baku 100 ppm sebanyak 2,1 mL.

**f. 24 ppm**

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 10 \text{ mL} \times 24 \text{ ppm} &= V_2 \times 100 \text{ ppm} \\
 &= \frac{10 \text{ mL} \times 24 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\
 &= 2,4 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 10 mL larutan standar 24 ppm diperlukan larutan baku 100 ppm sebanyak 2,4 mL.

## Lampiran 4. Data Pengamatan dan Hasil Perhitungan

### L.4.1 Penentuan Kadar Air Rimpang Jeringau (*Acorus calamus L.*)

Tabel L.4.1 Data berat cawan kosong

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (g)				Berat Cawan Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
C1	58,6673	58,6609	58,6601	58,6599	58,6597
C2	57,1222	57,1160	57,1157	57,1156	57,1156
C3	54,8959	54,8897	54,8887	54,8886	54,8886

Keterangan: C = Cawan, P = Ulangan

Berat cawan kosong konstan kemudian ditambah 0,5 g serbuk rimpang jeringau dan ditimbang kembali sampai berat konstan pada data berat cawan + sampel.

Tabel L.4.2 Data berat cawan + sampel

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (g)				Berat Cawan Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
C1	59,1597	59,1231	59,1206	59,1198	59,1198
C2	57,6157	57,5776	57,5770	57,5764	57,5764
C3	55,3888	55,3514	55,3510	55,3509	55,3510

Keterangan: C = Cawan, P = Ulangan

Data berat konstan yang diperoleh adalah data berat cawan + sampel konstan yang akan dihitung kadar airnya.

#### 1. Kadar air sampel pada cawan C1

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\
 &= \frac{(59,1597 - 59,1198) \text{ g}}{(59,1597 - 58,6597) \text{ g}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,0399}{0,5000} \times 100\% \\
 &= 7,98\%
 \end{aligned}$$

#### 2. Kadar air sampel pada cawan C2

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\
 &= \frac{(57,6157 - 57,5764) \text{ g}}{(57,6157 - 57,1156) \text{ g}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,0393}{0,5001} \times 100\%
 \end{aligned}$$

$$= 7,86\%$$

### 3. Kadar air sampel pada cawan C3

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{(55,3888-55,3510) \text{ g}}{(55,3888-54,8888) \text{ g}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0378}{0,5000} \times 100 \\ &= 7,56\% \end{aligned}$$

### 4. Kadar air rata-rata rimpang jeringau (*Acorus calamus* L.)

$$\begin{aligned} \text{Kadar air rata-rata} &= \frac{\text{Kadar air cawan 1}+\text{kadar air cawan 2}+\text{kadar air cawan 3}}{3} \times 100\% \\ &= \frac{7,98\%+7,86\%+7,56\%}{3} \times 100\% \\ &= \frac{23,4\%}{3} \times 100\% \\ &= 7,80\% \end{aligned}$$

## L.4.2 Rendemen Ekstraksi Ultrasonik Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Tabel L.4.3 Data hasil ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70%

Ulangan	Berat Sampel (g)	Berat Wadah (g)	Berat Wadah+Ekstrak Pekat (g)	Berat Ekstrak Pekat (g)
1	30	62,2661	67,6645	5,3984
2	30	62,6777	68,3217	5,6494
3	30	128,5460	133,9627	5,4167
4	30	130,2400	136,2496	6,0096

#### 1. Rendemen ulangan 1

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak etanol}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{5,3984 \text{ g}}{30 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 17,99\% \end{aligned}$$

#### 2. Rendemen ulangan 2

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak etanol}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$



$$= \frac{5,6494 \text{ g}}{30 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 18,83\%$$

### 3. Rendemen ulangan 3

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak etanol}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{5,4167 \text{ g}}{30 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 18,06\%$$

### 4. Rendemen ulangan 4

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak etanol}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{6,0096 \text{ g}}{30 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 20,03\%$$

### 5. Rendemen rata-rata ekstrak etanol 70% rimpang jeringau (*Acorus calamus* L.)

$$\text{Rendemen rata-rata} = \frac{\text{Rendemen ulangan (1+2+3+4)}}{4} \times 100\%$$

$$= \frac{17,99\% + 18,83\% + 18,06\% + 20,03\%}{4} \times 100\%$$

$$= \frac{23,4\%}{4} \times 100\%$$

$$= 18,73\%$$

#### L.4.3 Rendemen Fraksi Etil Asetat Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Tabel L.4.4 Data hasil partisi menggunakan pelarut etil asetat

Hasil Ekstraksi	Berat Sampel (g)	Berat Wadah (g)	Berat Wadah+Fraksi (g)	Berat Fraksi (g)
1	5,0009	34,7062	35,2702	0,5640
2	5,0005	36,0105	36,5484	0,5379
3	5,0003	62,6895	63,2266	0,5371
4	5,0002	51,0198	51,5410	0,5212

**1. Rendemen fraksi etil asetat 1**

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat fraksi etil asetat}}{\text{Berat ekstrak etanol}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,5640 \text{ g}}{5,0009 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 11,28\%
 \end{aligned}$$

**2. Rendemen fraksi etil asetat 2**

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat fraksi etil asetat}}{\text{Berat ekstrak etanol}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,5379 \text{ g}}{5,0005 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 10,76\%
 \end{aligned}$$

**3. Rendemen fraksi etil asetat 3**

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat fraksi etil asetat}}{\text{Berat ekstrak etanol}} \times 100 \\
 &= \frac{0,5371 \text{ g}}{5,0003 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 10,74\%
 \end{aligned}$$

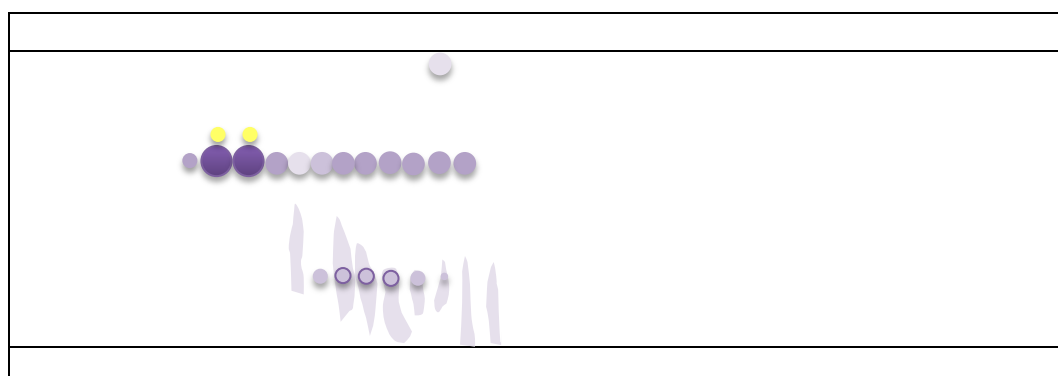
**4. Rendemen fraksi etil asetat 4**

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat fraksi etil asetat}}{\text{Berat ekstrak etanol}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,5212 \text{ g}}{5,0002 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 10,42\%
 \end{aligned}$$

**5. Rata-Rata Rendemen Hasil Partisi**

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen rata-rata} &= \frac{\text{Rendemen fraksi etil asetat (1+2+3+4)}}{4} \times 100\% \\
 &= \frac{11,28\%+10,76\%+10,74+10,42\%}{4} \times 100\% \\
 &= \frac{43,20\%}{4} \times 100\% \\
 &= 10,80\%
 \end{aligned}$$

#### L.4.4 Hasil Kromatografi Kolom Gradien Eluen



Gambar L.4.1 Ilustrasi monitoring KLTA isolat hasil kromatografi kolom gradien eluen di bawah UV 366 nm

Tabel L.4.5 Hasil monitoring KLTA isolat kolom gradien eluen

Vial	Warna Noda (UV $\lambda$ 366 nm)	Jarak (cm)		Rf	Dugaan Senyawa
		Noda	Eluen		
08	Ungu	5,3	8	0,663	Flavonol
09	Kuning	5,5	8	0,688	Flavan-3-ols
	Ungu	5,1		0,638	Flavanon
10	Kuning	5,5	8	0,688	Flavan-3-ols
	Ungu	5,1		0,638	Flavonoid
11	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
12	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
13	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
14	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
15	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
16	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
17	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
18	Ungu	7,5	8	0,938	-
	Ungu	5,2		0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
19	Ungu	5,2	8	0,650	Flavonol
	Ungu berekor	-		-	-
20	Ungu berekor	-	8	-	-

### L.4.5 Rendemen Hasil Kromatografi Kolom Non Gradien Eluen

Tabel L.4.6 Data rendemen hasil kromatografi kolom non gradien eluen

Vial	Berat Sampel (mg)	Berat Isolat (mg)	Rendemen	Vial	Berat Sampel (mg)	Berat Isolat (mg)	Rendemen
13	67	2,7	4,03%	20	67	3,2	4,78%
14	67	2,8	4,18%	21	67	2,3	3,43%
15	67	3,0	4,48%	22	67	1,6	2,39%
16	67	3,7	5,52%	23	67	1,3	1,94%
17	67	3,6	5,37%	24	67	2,6	3,88%
18	67	3,2	4,78%	25	67	2,2	3,28%
19	67	3,5	5,22%				

#### 1. Isolat vial 13

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,7 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 4,03\% \end{aligned}$$

#### 8. Isolat vial 20

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,2 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 4,78\% \end{aligned}$$

#### 2. Isolat vial 14

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,8 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 4,18\% \end{aligned}$$

#### 9. Isolat vial 21

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,3 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 3,43\% \end{aligned}$$

#### 3. Isolat vial 15

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,0 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 4,48\% \end{aligned}$$

#### 10. Isolat vial 22

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{1,6 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 2,39\% \end{aligned}$$

#### 4. Isolat vial 16

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,7 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 5,52\% \end{aligned}$$

#### 11. Isolat vial 23

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{1,3 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 1,94\% \end{aligned}$$

**5. Isolat vial 17**

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,6 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 5,37\% \end{aligned}$$

**12. Isolat vial 24**

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,6 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 3,88\% \end{aligned}$$

**6. Isolat vial 18**

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,2 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 4,78\% \end{aligned}$$

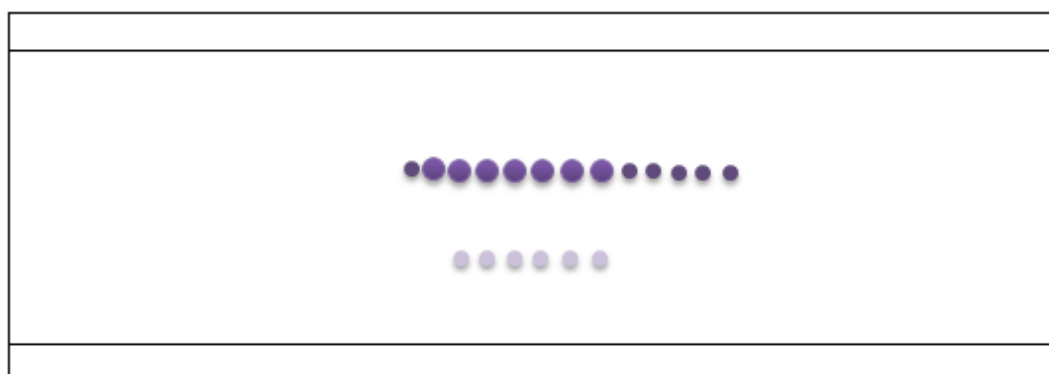
**13. Isolat vial 25**

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,2 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 3,28\% \end{aligned}$$

**7. Isolat vial 19**

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,5 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 5,22\% \end{aligned}$$

#### L.4.6 Data Monitoring KLTA Isolat Hasil Kromatografi Kolom Non Gradien Eluen



Gambar L.4.2 Ilustrasi monitoring KLTA isolat hasil kromatografi kolom non gradien eluen di bawah UV 366 nm

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}}$$

Tabel L.4.7 Rendemen dan nilai  $Rf$  isolat hasil kromatografi kolom non gradien

Vial	Rendemen	Jarak (cm)		$Rf$	Warna Noda pada Lampu UV $\lambda$ 366 nm	Dugaan Senyawa
		Noda	Eluen			
13	4,03%	5,3	8	0,663	Ungu	
14	4,18%	5,3	8	0,663	Ungu	
15	4,48%	5,3	8	0,663	Ungu	
		2		0,250		
16	5,52%	5,3	8	0,663	Ungu	
		2		0,250		
17	5,37%	5,3	8	0,663	Ungu	
		2		0,250		
18	4,78%	5,3	8	0,663	Ungu	Flavonol/flavon
		2		0,250		
19	5,22%	5,3	8	0,663	Ungu	
		2		0,250		
20	4,78%	5,3	8	0,663	Ungu	
		2		0,250		
21	3,43%	5,3	8	0,663	Ungu	
22	2,39%	5,3	8	0,663	Ungu	
23	1,94%	5,3	8	0,663	Ungu	
24	3,88%	5,3	8	0,663	Ungu	
25	3,28%	5,3	8	0,663	Ungu	

**1. Isolat vial 13**

$$\begin{aligned}
 Rf &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,663
 \end{aligned}$$

**2. Isolat vial 14**

$$\begin{aligned}
 Rf &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,663
 \end{aligned}$$

**3. Isolat vial 15**

$$\begin{aligned}
 Rf_1 &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}}
 \end{aligned}$$

**7. Isolat vial 19**

$$\begin{aligned}
 Rf_1 &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,663
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Rf_2 &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,250
 \end{aligned}$$

**8. Isolat vial 20**

$$\begin{aligned}
 Rf_1 &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,663
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Rf_2 &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Rf_2 &= 0,663 & = \frac{2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} & = 0,250 \\
 &= \frac{2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}}
 \end{aligned}$$

#### 4. Isolat vial 16

$$\begin{aligned}
 Rf_1 &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,663
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Rf_2 &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,250
 \end{aligned}$$

#### 5. Isolat vial 17

$$\begin{aligned}
 Rf_1 &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,663
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Rf_2 &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,250
 \end{aligned}$$

#### 6. Isolat vial 18

$$\begin{aligned}
 Rf_1 &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,663
 \end{aligned}$$

#### 9. Isolat vial 21

$$\begin{aligned}
 Rf &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,663
 \end{aligned}$$

#### 10. Isolat vial 22

$$\begin{aligned}
 Rf &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,663
 \end{aligned}$$

#### 11. Isolat vial 23

$$\begin{aligned}
 Rf &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,663
 \end{aligned}$$

#### 12. Isolat vial 24

$$\begin{aligned}
 Rf &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\
 &= 0,663
 \end{aligned}$$

$$Rf_2 = \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}}$$

$$= \frac{2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}}$$

$$= 0,250$$

**13. Isolat vial 25**

$$Rf = \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}}$$

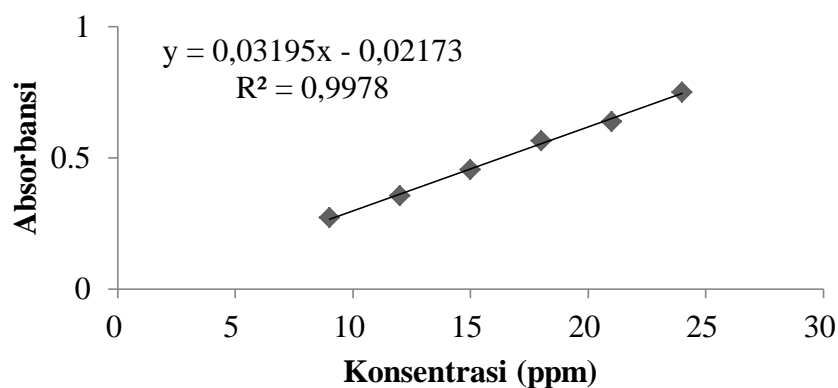
$$= \frac{5,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}}$$

$$= 0,663$$

**L.4.6 Kadar Flavonoid Pada Isolat Hasil Kromatografi Kolom**

Tabel L.4.8 Kadar flavonoid pada masing-masing isolat hasil kolom

No.	Sampel	Ulangan	Abs (y)	Kadar Kesetaraan Kuersetin (mg/L) (x)	Kadar Flavonoid (mg QE/g)	Rata-rata Kadar Flavonoid $\pm$ SD (mg QE/g)
1.	Isolat 13-14	1	0,1052	2,6125	4,7500	4,9037 $\pm$ 0,2661
		2	0,1052	2,6125	4,7500	
		3	0,1133	2,8660	5,2110	
2.	Isolat 15-16	1	0,1541	4,1430	6,1836	6,1883 $\pm$ 0,0260
		2	0,1537	4,1305	6,1649	
		3	0,1548	4,1649	6,2163	
3.	Isolat 17-18	1	0,1618	4,3840	6,4471	6,4379 $\pm$ 0,0122
		2	0,1613	4,3684	6,4241	
		3	0,1617	4,3809	6,4425	
4.	Isolat 19-20	1	0,1504	4,0272	6,0108	6,1572 $\pm$ 0,2258
		2	0,1511	4,0491	6,0435	
		3	0,1591	4,2995	6,4172	
5.	Isolat 21-23	1	0,1025	2,5280	4,8616	4,9298 $\pm$ 0,0603
		2	0,1040	2,5750	4,9518	
		3	0,1044	2,5875	4,9759	
6.	Isolat 24-25	1	0,0896	2,1243	4,4255	4,3299 $\pm$ 0,0868
		2	0,0878	2,0679	4,3082	
		3	0,0870	2,0429	4,2560	

**1. Kadar Kesetaraan Kuersetin (x)**



$$y = ax + b$$

$$y = 0,03195x + 0,02173$$

Dimana:

y = absorbansi sampel

x = kadar kesetaraan kuersetin

a. Isolat 13-14

$$1. \quad x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1052-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 2,6125 \text{ mg/L}$$

$$2. \quad x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1052-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 2,6125 \text{ mg/L}$$

$$3. \quad x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1133-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 2,8660 \text{ mg/L}$$

b. Isolat 15-16

$$1. \quad x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1541-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 4,1430 \text{ mg/L}$$

$$2. \quad x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1537-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 4,1305 \text{ mg/L}$$

$$3. \quad x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1548-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 4,1649 \text{ mg/L}$$

d. Isolat 19-20

$$1. \quad x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1504-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 4,0272 \text{ mg/L}$$

$$2. \quad x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1511-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 4,0491 \text{ mg/L}$$

$$3. \quad x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1591-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 4,2995 \text{ mg/L}$$

e. Isolat 21-23

$$1. \quad x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1025-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 2,5280 \text{ mg/L}$$

$$2. \quad x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1040-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 2,5750 \text{ mg/L}$$

$$3. \quad x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1044-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 2,5875 \text{ mg/L}$$

## c. Isolat 17-18

$$1. x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1618-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 4,3840 \text{ mg/L}$$

$$2. x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1613-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 4,3684 \text{ mg/L}$$

$$3. x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,1617-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 4,3809 \text{ mg/L}$$

## f. Isolat 24-25

$$1. x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,0896-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 2,1243 \text{ mg/L}$$

$$2. x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,0878-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 2,0679 \text{ mg/L}$$

$$3. x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,0870-0,02173}{0,03195}$$

$$x = 2,0429 \text{ mg/L}$$

**2. Kadar Flavonoid**

$$\text{Kadar flavonoid} = \frac{C \times V}{M}$$

Dimana:

C = kadar kesetaraan kuersetin (mg/L)

V = volume pengenceran sampel (L)

M = berat isolat (mg)

## a. Isolat 13-14

$$1. \text{KF} = \frac{C \times V}{M}$$

$$\text{KF} = \frac{2,6125 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0055 \text{ g}}$$

$$\text{KF} = 4,7500 \text{ mg QE/g}$$

$$2. \text{KF} = \frac{C \times V}{M}$$

$$\text{KF} = \frac{2,6125 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0055 \text{ g}}$$

$$\text{KF} = 4,7500 \text{ mg QE/g}$$

## d. Isolat 19-20

$$1. \text{KF} = \frac{C \times V}{M}$$

$$\text{KF} = \frac{4,0272 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0067 \text{ g}}$$

$$\text{KF} = 6,0108 \text{ mg QE/g}$$

$$2. \text{KF} = \frac{C \times V}{M}$$

$$\text{KF} = \frac{4,0491 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0067 \text{ g}}$$

$$\text{KF} = 6,0435 \text{ mg QE/g}$$

$$3. \text{ KF} = \frac{\text{CxV}}{\text{M}}$$

$$\text{KF} = \frac{2,8660 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0055 \text{ g}}$$

$$\text{KF} = 5,2110 \text{ mg QE/g}$$

$$4. \text{ KF rata-rata}$$

$$= \frac{\text{KF ulangan (1+2+3)}}{3}$$

$$= \frac{4,7500+4,7500+5,2110}{3} \left( \text{mg} \frac{\text{QE}}{\text{g}} \right)$$

$$= \frac{14,7110}{3} \left( \text{mg} \frac{\text{QE}}{\text{g}} \right)$$

$$= 4,9037 \text{ mg QE/g}$$

$$3. \text{ KF} = \frac{\text{CxV}}{\text{M}}$$

$$\text{KF} = \frac{4,2995 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0067 \text{ g}}$$

$$\text{KF} = 6,4172 \text{ mg QE/g}$$

$$4. \text{ KF rata-rata}$$

$$= \frac{\text{KF ulangan (1+2+3)}}{3}$$

$$= \frac{6,0108+6,0435+6,4172}{3} \left( \text{mg} \frac{\text{QE}}{\text{g}} \right)$$

$$= \frac{18,4715}{3} \left( \text{mg} \frac{\text{QE}}{\text{g}} \right)$$

$$= 6,1572 \text{ mg QE/g}$$

## b. Isolat 15-16

$$1. \text{ KF} = \frac{\text{CxV}}{\text{M}}$$

$$\text{KF} = \frac{4,1430 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0067 \text{ g}}$$

$$\text{KF} = 6,1836 \text{ mg QE/g}$$

$$2. \text{ KF} = \frac{\text{CxV}}{\text{M}}$$

$$\text{KF} = \frac{4,1305 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0067 \text{ g}}$$

$$\text{KF} = 6,1649 \text{ mg QE/g}$$

$$3. \text{ KF} = \frac{\text{CxV}}{\text{M}}$$

$$\text{KF} = \frac{4,1649 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0067 \text{ g}}$$

$$\text{KF} = 6,2163 \text{ mg QE/g}$$

$$4. \text{ KF rata-rata}$$

$$= \frac{\text{KF ulangan (1+2+3)}}{3}$$

## e. Isolat 21-23

$$1. \text{ KF} = \frac{\text{CxV}}{\text{M}}$$

$$\text{KF} = \frac{2,5280 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0052 \text{ g}}$$

$$\text{KF} = 4,8616 \text{ mg QE/g}$$

$$2. \text{ KF} = \frac{\text{CxV}}{\text{M}}$$

$$\text{KF} = \frac{2,5750 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0052 \text{ g}}$$

$$\text{KF} = 4,9518 \text{ mg QE/g}$$

$$3. \text{ KF} = \frac{\text{CxV}}{\text{M}}$$

$$\text{KF} = \frac{2,5875 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0052 \text{ g}}$$

$$\text{KF} = 4,9759 \text{ mg QE/g}$$

$$4. \text{ KF rata-rata}$$

$$= \frac{\text{KF ulangan (1+2+3)}}{3}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{6,1836+6,1649+6,2163}{3} \left( \text{mg} \frac{\text{QE}}{\text{g}} \right) \\
 &= \frac{18,5648}{3} \left( \text{mg} \frac{\text{QE}}{\text{g}} \right) \\
 &= 6,1883 \text{ mg QE/g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{4,8616+4,9518+4,9759}{3} \left( \text{mg} \frac{\text{QE}}{\text{g}} \right) \\
 &= \frac{14,7893}{3} \left( \text{mg} \frac{\text{QE}}{\text{g}} \right) \\
 &= 4,9298 \text{ mg QE/g}
 \end{aligned}$$

c. Isolat 17-18

$$\begin{aligned}
 1. \text{ KF} &= \frac{\text{CxV}}{\text{M}} \\
 \text{KF} &= \frac{4,3840 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0068 \text{ g}} \\
 \text{KF} &= 6,4471 \text{ mg QE/g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \text{ KF} &= \frac{\text{CxV}}{\text{M}} \\
 \text{KF} &= \frac{4,3684 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0068 \text{ g}} \\
 \text{KF} &= 6,4241 \text{ mg QE/g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 3. \text{ KF} &= \frac{\text{CxV}}{\text{M}} \\
 \text{KF} &= \frac{4,3809 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0068 \text{ g}} \\
 \text{KF} &= 6,4425 \text{ mg QE/g}
 \end{aligned}$$

4. KF rata-rata

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{KF ulangan (1+2+3)}}{3} \\
 &= \frac{6,4471+6,4241+6,4425}{3} \left( \text{mg} \frac{\text{QE}}{\text{g}} \right) \\
 &= \frac{19,3137}{3} \left( \text{mg} \frac{\text{QE}}{\text{g}} \right) \\
 &= 6,4379 \text{ mg QE/g}
 \end{aligned}$$

f. Isolat 24-25

$$\begin{aligned}
 1. \text{ KF} &= \frac{\text{CxV}}{\text{M}} \\
 \text{KF} &= \frac{2,1243 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0048 \text{ g}} \\
 \text{KF} &= 4,4255 \text{ mg QE/g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \text{ KF} &= \frac{\text{CxV}}{\text{M}} \\
 \text{KF} &= \frac{2,0679 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0048 \text{ g}} \\
 \text{KF} &= 4,3082 \text{ mg QE/g}
 \end{aligned}$$

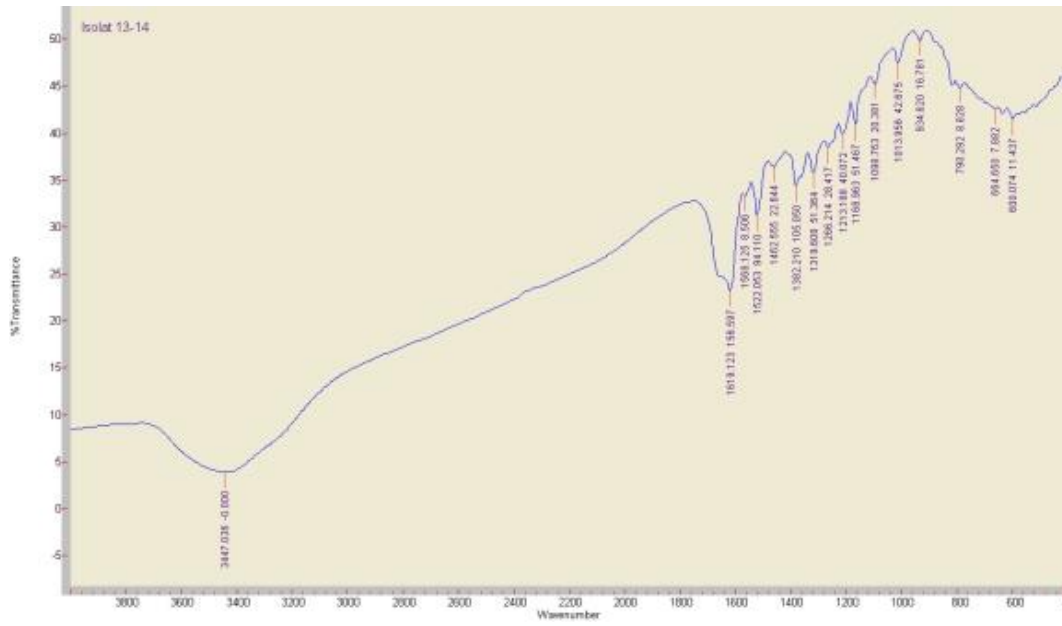
$$\begin{aligned}
 3. \text{ KF} &= \frac{\text{CxV}}{\text{M}} \\
 \text{KF} &= \frac{2,0429 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,01\text{L}}{0,0048 \text{ g}} \\
 \text{KF} &= 4,2560 \text{ mg QE/g}
 \end{aligned}$$

4. KF rata-rata

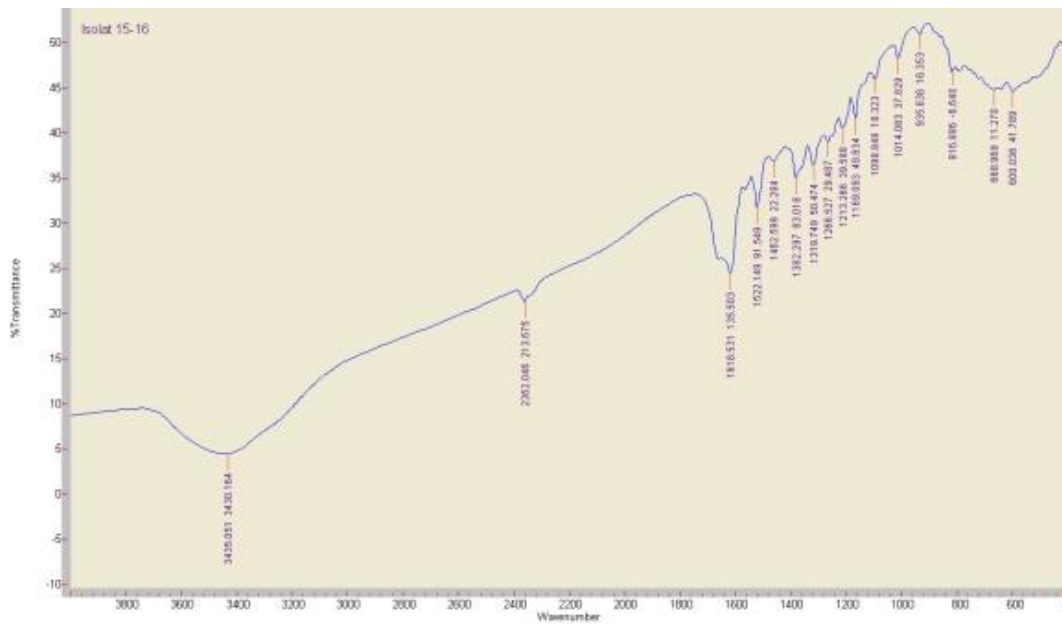
$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{KF ulangan (1+2+3)}}{3} \\
 &= \frac{4,4255+4,3082+4,2560}{3} \left( \text{mg} \frac{\text{QE}}{\text{g}} \right) \\
 &= \frac{12,9897}{3} \left( \text{mg} \frac{\text{QE}}{\text{g}} \right) \\
 &= 4,3299 \text{ mg QE/g}
 \end{aligned}$$

Lampiran 5. Data Instrumentasi FTIR

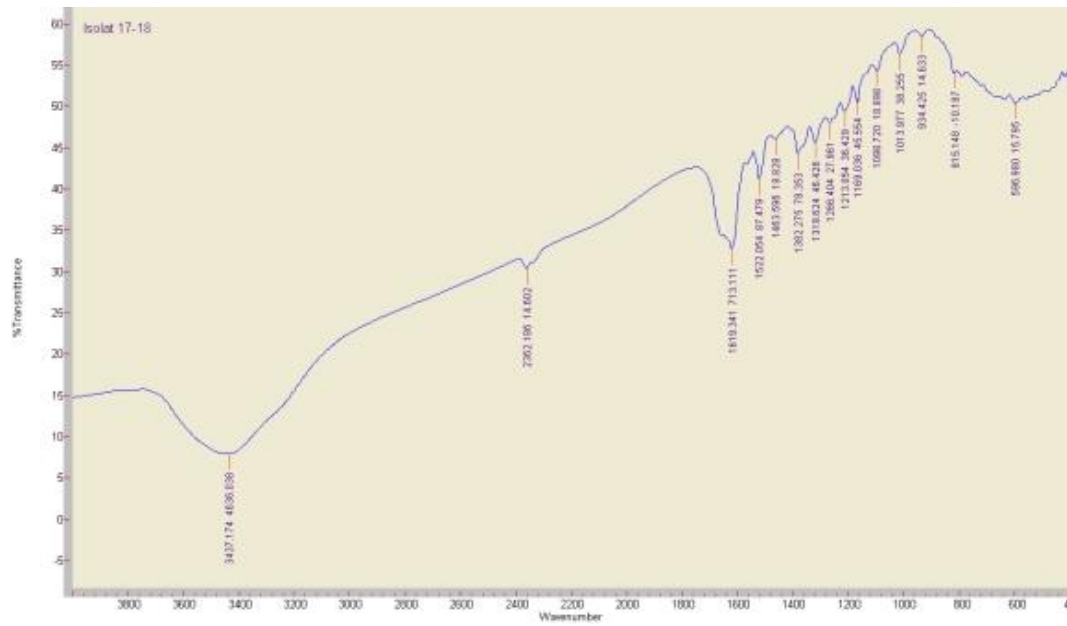
L.5.1 Hasil Spektrofotometer FTIR Isolat 13-14



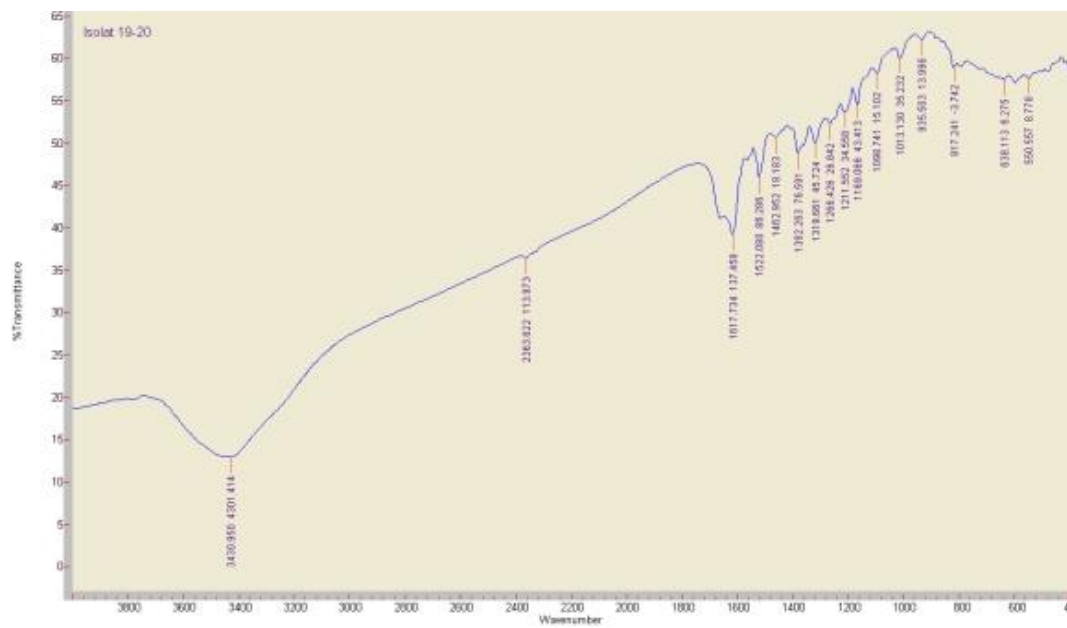
L.5.2 Hasil Spektrofotometer FTIR Isolat 15-16



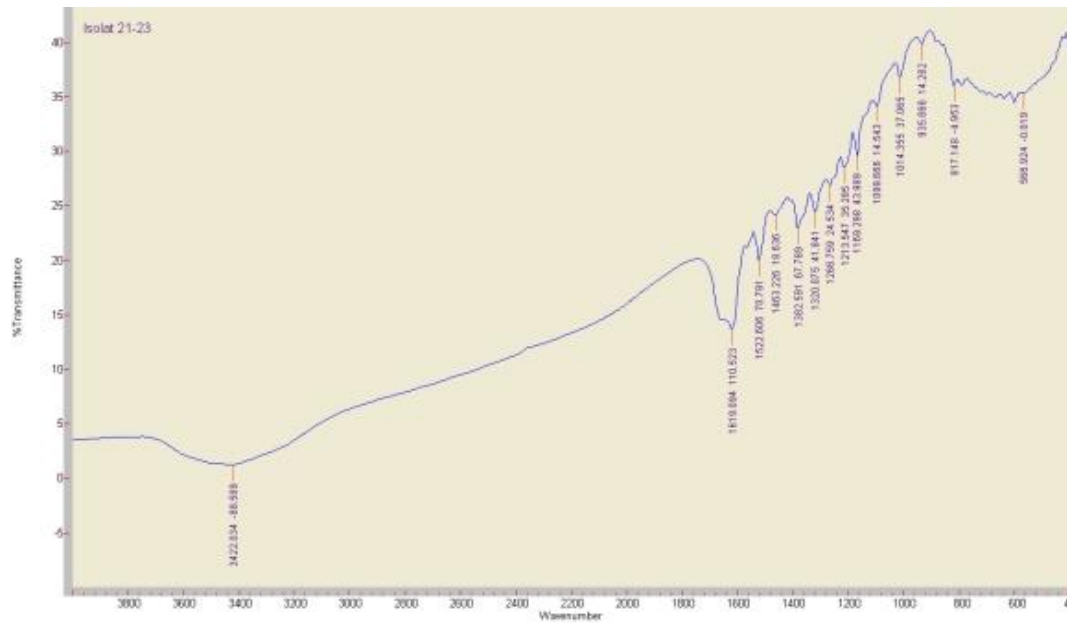
### L.5.3 Hasil Spektrofotometer FTIR Isolat 17-18



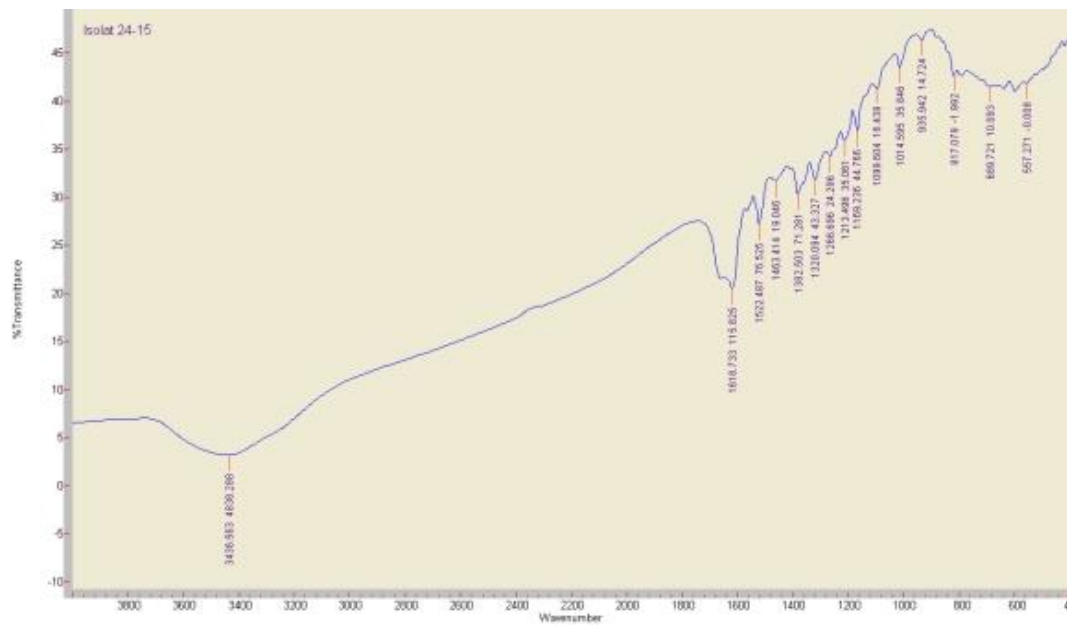
### L.5.4 Hasil Spektrofotometer FTIR Isolat 19-20



### L.5.5 Hasil Spektrofotometer FTIR Isolat 21-23



### L.5.6 Hasil Spektrofotometer FTIR Isolat 24-25



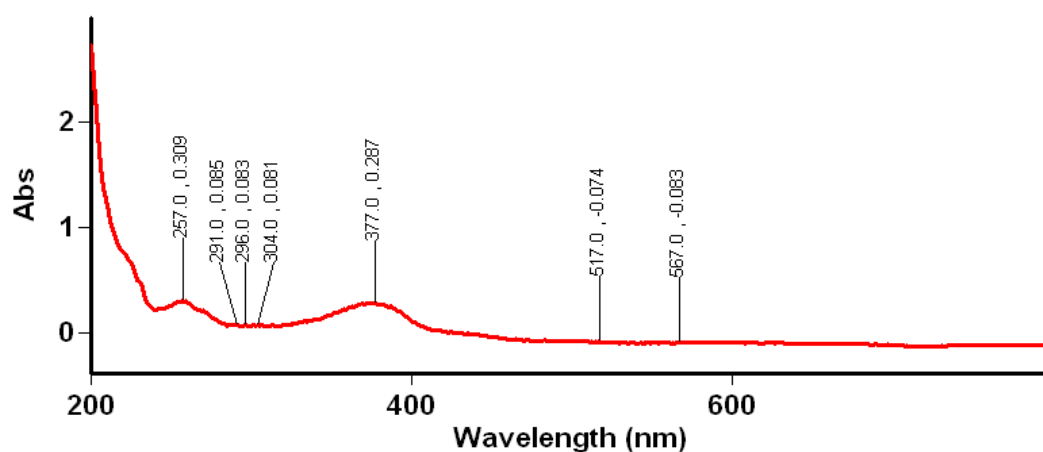
## Lampiran 6. Data Instrumentasi UV-Vis

### L.6.1 Hasil Spektrofotometer UV-Vis Isolat Hasil Kolom

#### L.6.1.1 Hasil Spektrofotometer UV-Vis Isolat 13-14

## Lamdha Maks Fraksi Isolat Kolom 13-14

Tanggal Analisa : 24 Mei 2022



## Scan Analysis Report

Report Time : Tue 24 May 11:28:33 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdha Maks Fraksi Isolat 13-14 (24-05-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

### Sample Name: Isolat 13-14

Collection Time

5/24/2022 11:28:37 AM

Peak Table

Peak Style

Peak Threshold

Range

Peaks

0.0100

800.0nm to 199.9nm

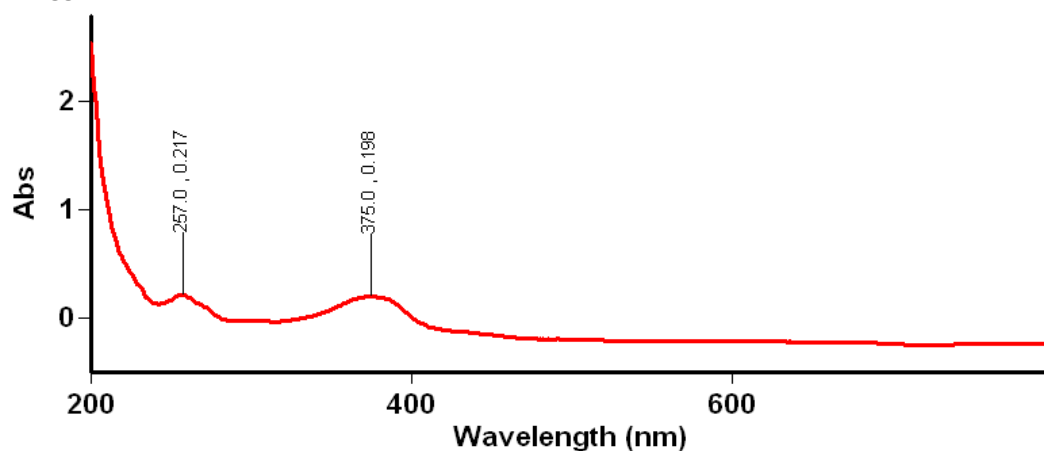
Wavelength (nm)	Abs
567.0	-0.083
517.0	-0.074
377.0	0.287
304.0	0.081
296.0	0.083
291.0	0.085
257.0	0.309



### L.6.1.2 Hasil Spektrofotometer UV-Vis Isolat 15-16

## Lamdha Maks Fraksi Isolat Kolom 15-16

Tanggal Analisa : 24 Mei 2022



### Scan Analysis Report

Report Time : Tue 24 May 11:32:49 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdha Maks Fraksi Isolat 15-16 (24-05-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

#### Sample Name: Isolat 15-16

Collection Time

5/24/2022 11:32:51 AM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

0.0100

Range

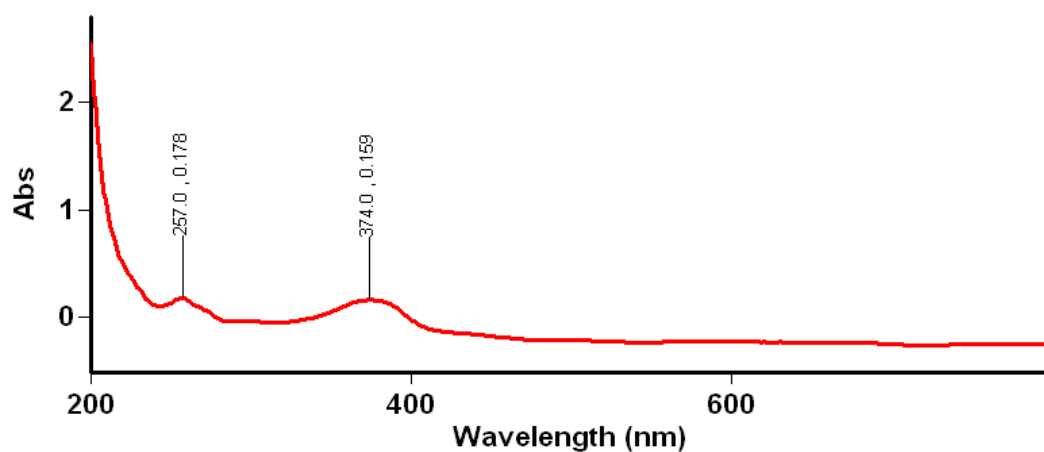
800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
375.0	0.198
257.0	0.217

### L.6.1.3 Hasil Spektrofotometer UV-Vis Isolat 17-18

## Lamdha Maks Fraksi Isolat Kolom 17-18

Tanggal Analisa : 24 Mei 2022



## Scan Analysis Report

Report Time : Tue 24 May 11:34:53 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdha Maks Fraksi Isolat 17-18 (24-05-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

### Sample Name: Isolat 17-18

Collection Time 5/24/2022 11:35:00 AM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

0.0100

Range

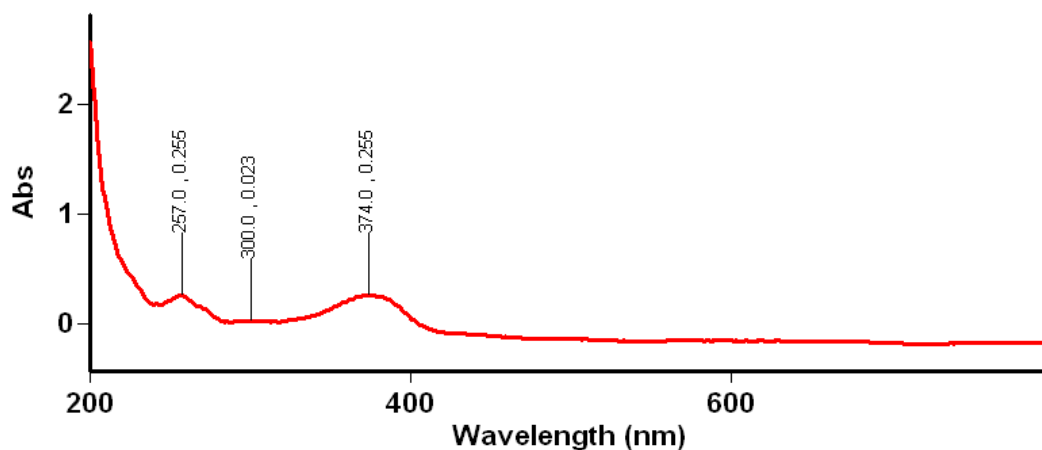
800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
374.0	0.159
257.0	0.178

### L.6.1.4 Hasil Spektrofotometer Isolat 19-20

## Lamdha Maks Fraksi Isolat Kolom 19-20

Tanggal Analisa : 24 Mei 2022



## Scan Analysis Report

Report Time : Tue 24 May 11:37:17 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdha Maks Fraksi Isolat 19-20 (24-05-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

### Sample Name: Isolat 19-20

Collection Time 5/24/2022 11:37:20 AM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

0.0100

Range

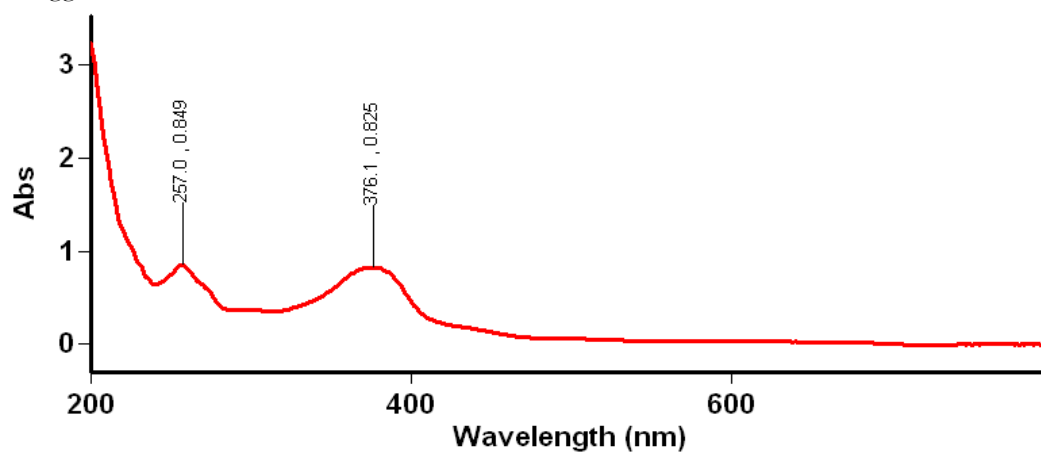
800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
374.0	0.255
300.0	0.023
257.0	0.255

### L.6.1.5 Hasil Spektrofotometer Isolat 21-23

## Lamdha Maks Fraksi Isolat 21-23

Tanggal Analisa : 24 Mei 2022



## Scan Analysis Report

Report Time : Tue 24 May 03:45:37 PM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdha Maks Fraksi Isolat 21-23 2 (24-05-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

### Sample Name: Isolat 21-23

Collection Time

5/24/2022 3:45:41 PM

Peak Table

Peak Style

Peak Threshold

Range

Peaks

0.0100

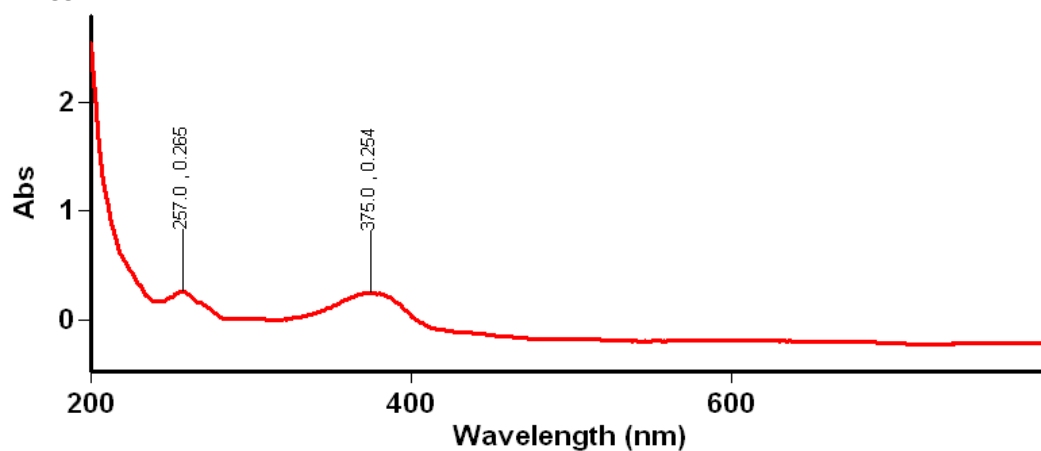
800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
376.1	0.825
257.0	0.849

### L.6.1.6 Hasil Spektrofotometer Isolat 24-25

## Lamdba Maks Fraksi Isolat Kolom 24-25

Tanggal Analisa : 24 Mei 2022



### Scan Analysis Report

Report Time : Tue 24 May 11:41:03 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdba Maks Fraksi Isolat 24-25 (24-05-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

#### Sample Name: Isolat 24-25

Collection Time 5/24/2022 11:41:06 AM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

0.0100

Range

800.0nm to 199.9nm

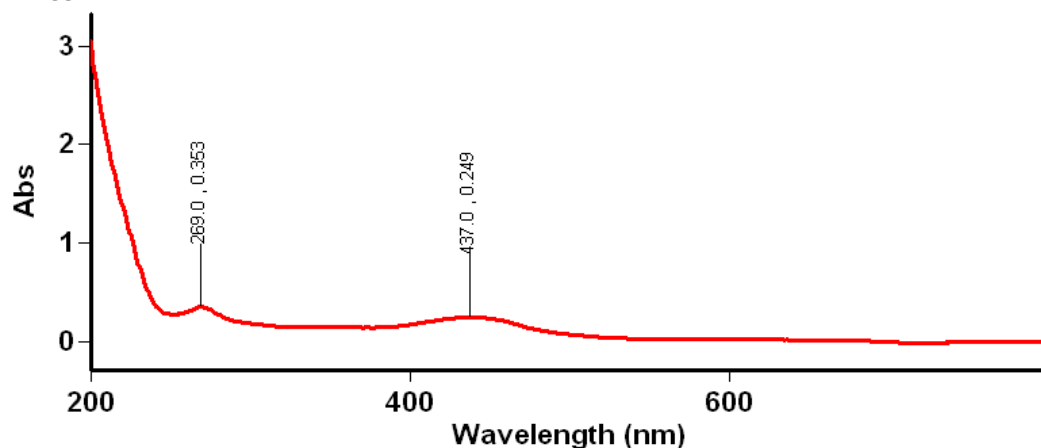
Wavelength (nm)	Abs
375.0	0.254
257.0	0.265

### L.6.2 Hasil Spektrofotometer UV-Vis Isolat Hasil Kolom + Pereaksi Geser

#### L.6.2.1 Hasil Spektrofotometer Isolat 13-14 + Pereaksi Geser

## Lamdba Maks Fraksi Isolat 13-14 + $AlCl_3$

Tanggal Analisa : 24 Mei 2022



## Scan Analysis Report

Report Time : Tue 24 May 11:53:08 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdha Maks Fraksi Isolat 13-14+AlCl<sub>3</sub>  
(24-05-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

**Sample Name: Isolat 13-14+AlCl<sub>3</sub>**

Collection Time 5/24/2022 11:53:20 AM

Peak Table

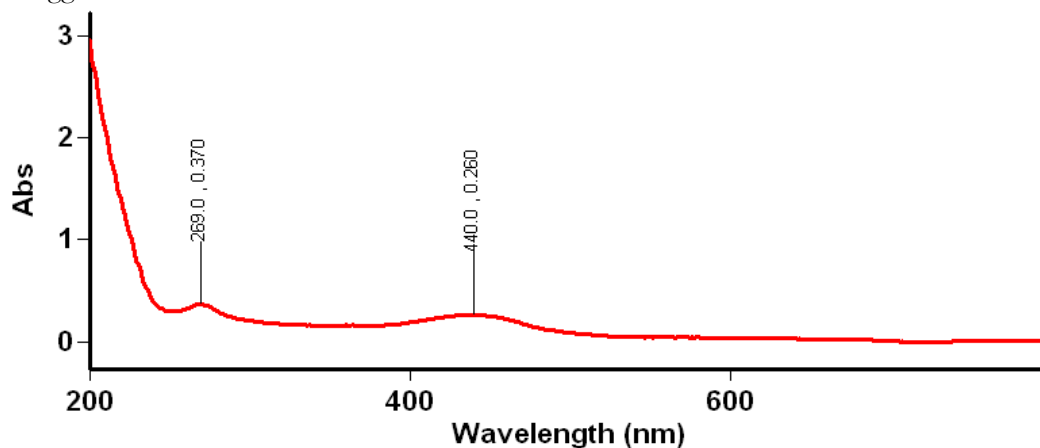
Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0.0100
Range	800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
437.0	0.249
269.0	0.353

### L.6.2.2 Hasil Spektrofotometer Isolat 15-16 + Pereaksi Geser

## Lamdha Maks Fraksi Isolat 15-16 + AlCl<sub>3</sub>

Tanggal Analisa : 24 Mei 2022



## Scan Analysis Report

Report Time : Tue 24 May 11:46:03 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdha Maks Fraksi Isolat 15-16+AlCl<sub>3</sub>  
(24-05-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

**Sample Name: Isolat 15-16+AlCl<sub>3</sub>**

Collection Time 5/24/2022 11:46:12 AM

Peak Table

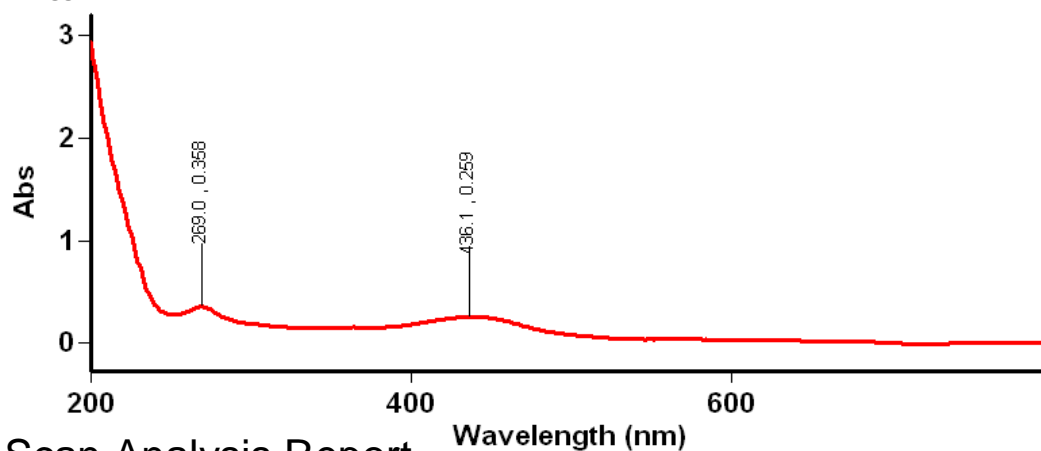
Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0.0100
Range	800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
440.0	0.260
269.0	0.370

### L.6.2.3 Hasil Spektrofotometer Isolat 17-18 + Perekasi Geser

## Lamdha Maks Fraksi Isolat 17-18 + $AlCl_3$

Tanggal Analisa : 24 Mei 2022



### Scan Analysis Report

Report Time : Tue 24 May 11:47:30 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdha Maks Fraksi Isolat 17-18+ $AlCl_3$  (24-05-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

#### Sample Name: Isolat 17-18+ $AlCl_3$

Collection Time 5/24/2022 11:47:36 AM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

0.0100

Range

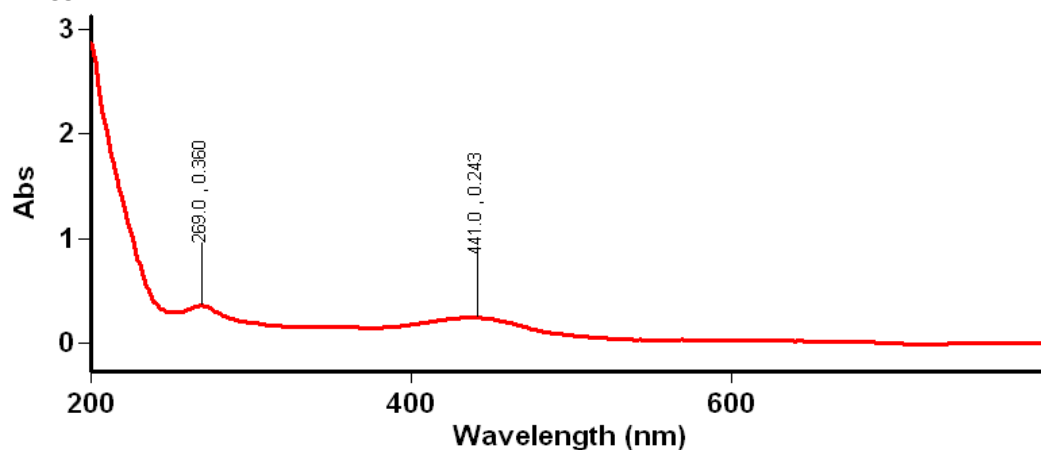
800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
436.1	0.259
269.0	0.358

### L.6.2.4 Hasil Spektrofotometer Isolat 19-20 + Perekasi Geser

## Lamdha Maks Fraksi Isolat 19-20 + $AlCl_3$

Tanggal Analisa : 24 Mei 2022



## Scan Analysis Report

Report Time : Tue 24 May 11:48:49 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdha Maks Fraksi Isolat 19-20+AlCl<sub>3</sub>  
(24-05-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

**Sample Name: Isolat 19-20+AlCl<sub>3</sub>**

Collection Time 5/24/2022 11:48:56 AM

Peak Table

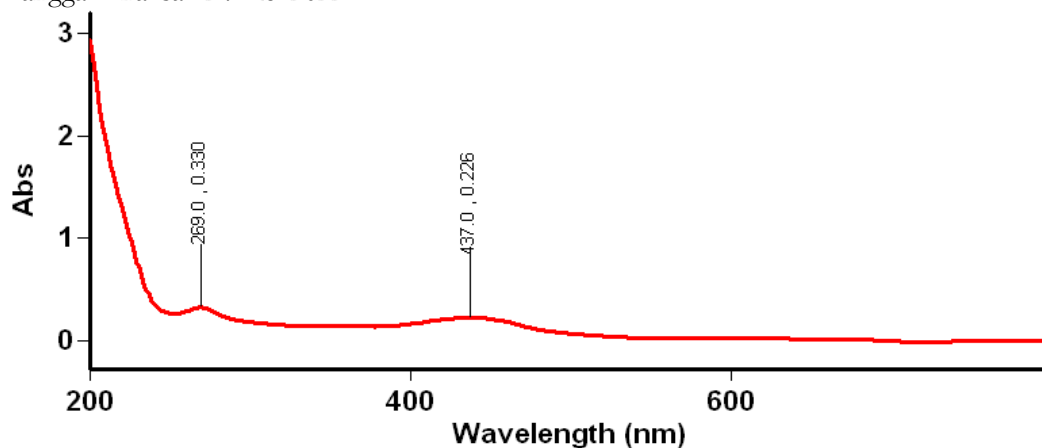
Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0.0100
Range	800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
441.0	0.243
269.0	0.360

### L.6.2.5 Hasil Spektrofotometer Isolat 21-23 + Pereaksi Geser

## Lamdha Maks Fraksi Isolat 21-23 + AlCl<sub>3</sub>

Tanggal Analisa : 24 Mei 2022



## Scan Analysis Report

Report Time : Tue 24 May 11:50:12 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdha Maks Fraksi Isolat 21-23+AlCl<sub>3</sub>  
(24-05-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

**Sample Name: Isolat 21-23+AlCl<sub>3</sub>**

Collection Time 5/24/2022 11:50:18 AM

Peak Table

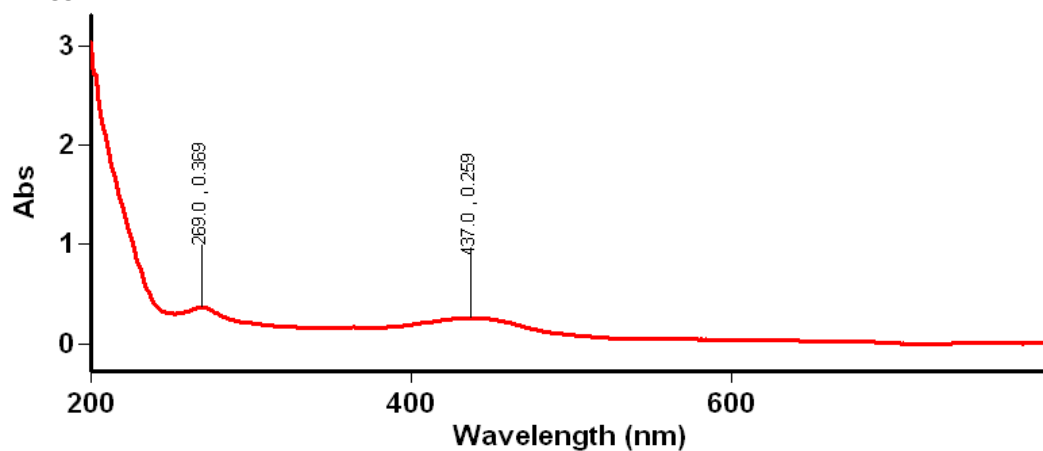
Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0.0100
Range	800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
437.0	0.226
269.0	0.330

### L.6.2.6 Hasil Spektrofotometer Isolat 24-25 + Pereaksi Geser

## Lamdba Maks Fraksi Isolat 24-25 + AlCl<sub>3</sub>

Tanggal Analisa : 24 Mei 2022



### Scan Analysis Report

Report Time : Tue 24 May 11:51:37 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdba Maks Fraksi Isolat 24-25+AlCl<sub>3</sub> (24-05-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

**Sample Name: Isolat 24-25+AlCl<sub>3</sub>**

Collection Time 5/24/2022 11:51:43 AM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

0.0100

Range

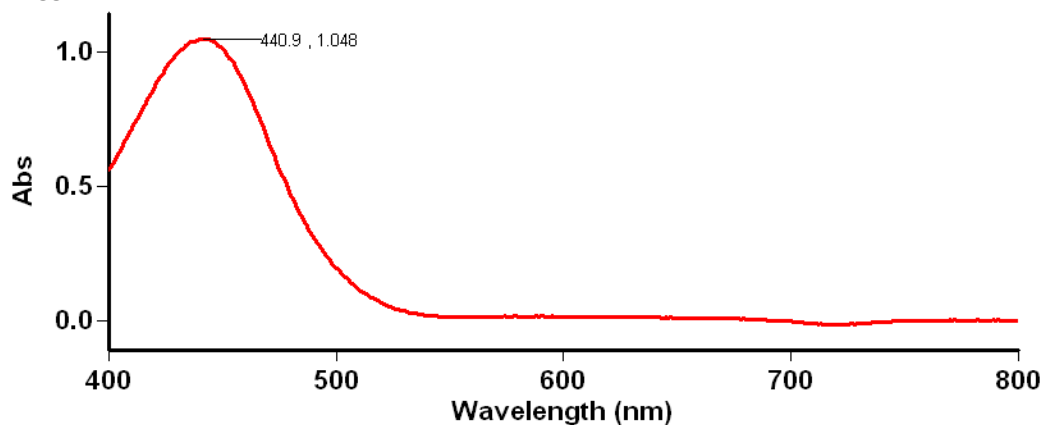
800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
437.0	0.259
269.0	0.369

### L.6.3 Hasil Spektrofotometer UV-Vis Kuersetin

## Lamdba Maks Quercetin

Tanggal Analisa : 27 Mei 2022





## Scan Analysis Report

Report Time : Fri 27 May 01:26:53 PM 2022  
 Method:  
 Batch: D:\Mahasiswa On Going\Faridatul Jannah\Lamdha Maks Quercetin (27-05-2022).DSW  
 Software version: 3.00(339)  
 Operator: Rika

### Sample Name: Quercetin

Collection Time 5/27/2022 1:27:10 PM

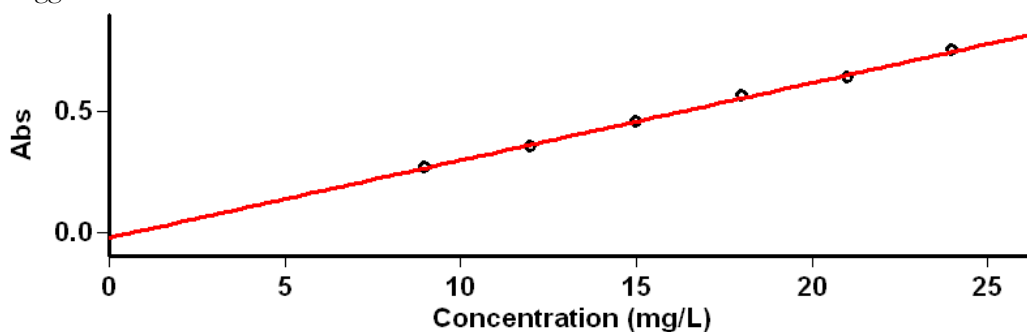
Peak Table  
 Peak Style Peaks  
 Peak Threshold 0.0100  
 Range 800.0nm to 400.0nm

Wavelength (nm)	Abs
440.9	1.048

### L.6.4 Kurva Standar Kuersetin

## Kurva Standar Quercetin

Tanggal Analisa : 30 Mei 2022



## Concentration Analysis Report

Report time 5/30/2022 10:44:43 AM  
 Method  
 Batch name D:\Mahasiswa On Going\Faridatul J\Kurva Standar Quercetin (30-05-2022).BCN  
 Application Concentration 3.00(339)  
 Operator Rika

### Instrument Settings

Instrument Cary 50  
 Instrument version no. 3.00  
 Wavelength (nm) 440.9  
 Ordinate Mode Abs  
 Ave Time (sec) 0.1000  
 Replicates 3  
 Standard/Sample averaging OFF  
 Weight and volume corrections OFF  
 Fit type Linear  
 Min R<sup>2</sup> 0.95000  
 Concentration units mg/L

Comments:

## Zero Report

Read	Abs	nm
Zero	(0.2219)	440.9

## Calibration

Collection time 5/30/2022 10:44:58 AM

Standard	Concentration mg/L	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Std 1	9.0		0.2709	0.0002	0.08	0.2710
						0.2710
						0.2707
Std 2	12.0		0.3549	0.0004	0.11	0.3548
						0.3545
						0.3553
Std 3	15.0		0.4545	0.0002	0.04	0.4548
						0.4544
						0.4545
Std 4	18.0		0.5642	0.0008	0.14	0.5651
						0.5635
						0.5640
Std 5	21.0		0.6380	0.0002	0.04	0.6377
						0.6381
						0.6382
Std 6	24.0		0.7500	0.0011	0.14	0.7511
						0.7498
						0.7491

Calibration eqn Abs = 0.03195\*Conc -0.02173  
 Correlation Coefficient 0.99784  
 Calibration time 5/30/2022 10:46:08 AM

## Results Flags Legend

U = Uncalibrated O = Overrange  
 N = Not used in calibration R = Repeat reading

## L.6.5 Data Absorbansi Isolat Hasil Kromatografi Kolom

# Absorbansi Sampel Hasil Kolom

Tanggal Analisa : 31 Mei 2022

## Advanced Reads Report

Report time 5/31/2022 2:24:19 PM  
 Method  
 Batch name D:\Mahasiswa On Going\Faridatul J\Absorbansi Sampel  
 Quercetin (31-05-2022).BAB  
 Application Advanced Reads 3.00(339)  
 Operator Rika

## Instrument Settings

Instrument Cary 50  
 Instrument version no. 3.00  
 Wavelength (nm) 440.9  
 Ordinate Mode Abs  
 Ave Time (sec) 0.1000  
 Replicates 3  
 Sample averaging OFF

Comments:

**Zero Report**

Read	Abs	nm
Zero	(0.2246)	440.9

**Analysis**

Collection time 5/31/2022 2:24:19 PM

Sample	F	Mean	SD	%RSD	Readings
13-14 1					0.1137 0.1133 0.1129
		0.1133	0.0004	0.17	
13-14 2					0.1052 0.1053 0.1051
		0.1052	0.0001	0.05	
13-14 3					0.1052 0.1051 0.1054
		0.1052	0.0002	0.08	
15-16 1					0.1535 0.1540 0.1535
		0.1537	0.0003	0.08	
15-16 2					0.1541 0.1544 0.1539
		0.1541	0.0003	0.07	
15-16 3					0.1549 0.1548 0.1547
		0.1548	0.0001	0.02	
17-18 1					0.1614 0.1616 0.1620
		0.1617	0.0003	0.08	
17-18 2					0.1615 0.1617 0.1623
		0.1618	0.0004	0.11	
17-18 3					0.1615 0.1612 0.1612
		0.1613	0.0002	0.05	
19-20 1					0.1591 0.1592 0.1592
		0.1591	0.0001	0.02	
19-20 2					0.1510 0.1511 0.1512
		0.1511	0.0001	0.03	
19-20 3					0.1506 0.1503 0.1504
		0.1504	0.0002	0.06	
21-23 1					0.1025 0.1025 0.1024
		0.1025	0.0001	0.04	
21-23 2					0.1039 0.1038 0.1044
		0.1040	0.0003	0.14	
21-23 3					0.1044 0.1045 0.1044
		0.1044	0.0001	0.03	
24-25 1					0.0898 0.0894

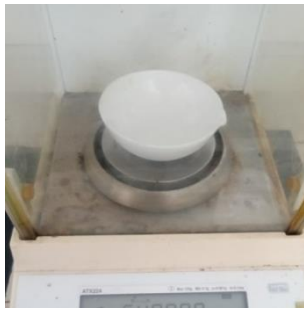
	0.0896	0.0002	0.11	0.0895
24-25 2				0.0879
				0.0878
	0.0878	0.0000	0.02	0.0878
24-25 3				0.0869
				0.0868
	0.0870	0.0002	0.10	0.0872

### Results Flags Legend

R = Repeat reading

## Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian

### 7.1 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri



Penimbangan cawan kosong



Pengovenan cawan kosong



Pendinginan (desikator) cawan kosong



Penimbangan cawan + sampel



Pengovenan cawan + sampel

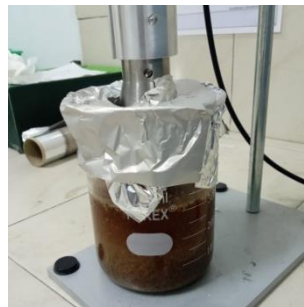


Pendinginan (desikator) cawan + sampel

### 7.2 Ekstraksi Sonikasi Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)



Penyiapan sampel sebanyak 30 g



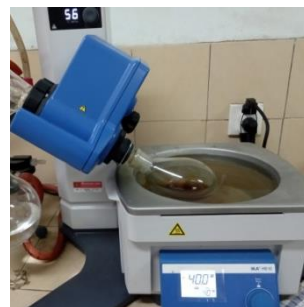
Proses ekstraksi ultrasonik



Hasil ekstraksi ultrasonik



Penyaringan dengan corong Buchner



Pemekatan dengan rotary evaporator vacuum



Hasil pemekatan ekstrak etanol



Hasil penguapan ekstrak etanol



Ekstrak pekat etanol

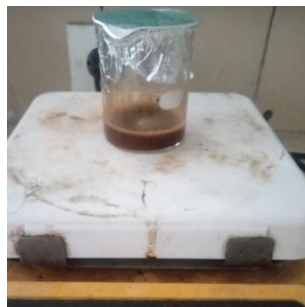


Penimbangan hasil ekstrak pekat etanol

### 7.3 Hidrolisis



Penimbangan ekstrak pekat etanol



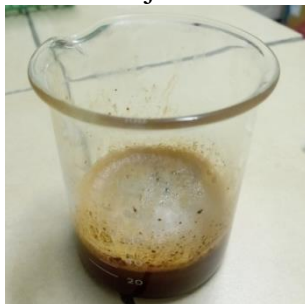
Proses *shaker* ekstrak pekat etanol 70% selama 1 jam



Hasil hidrolisis



Penambahan  $\text{NaHCO}_3$  hingga pH netral



Terbentuknya busa pada saat penambahan  $\text{NaHCO}_3$



Pengecekan pH setelah ditambahkan  $\text{NaHCO}_3$

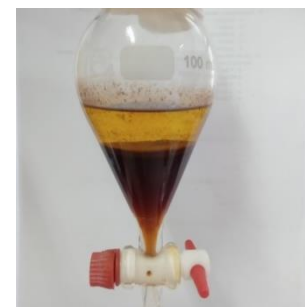
### 7.4 Partisi



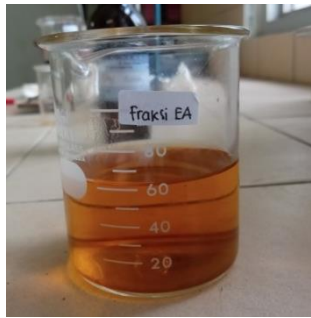
Hasil partisi 1



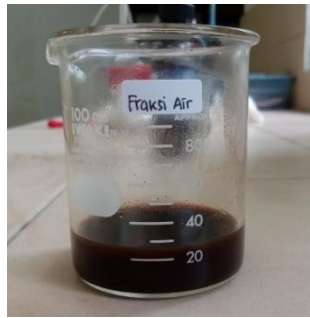
Hasil partisi 2



Hasil partisi 3



Fraksi etil asetat



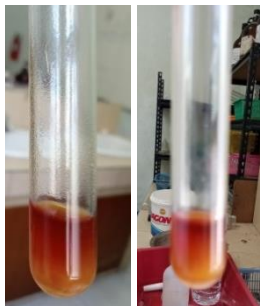
Fraksi air



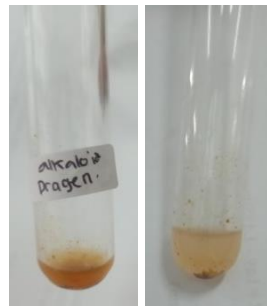
Pemekatan fraksi etil asetat dengan *rotary evaporator vacuum*

**7.5 Uji Fitokimia**

**7.5.1 Uji Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Rimpang Jeringau**



Uji flavonoid



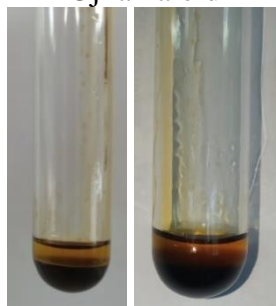
Uji alkaloid



Uji tanin

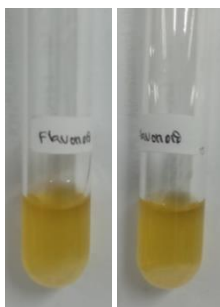


Uji saponin



Uji steroid dan triterpenoid

**7.5.2 Uji Fitokimia Fraksi Etil Asetat Rimpang Jeringau**



Uji flavonoid



Uji alkaloid



Uji tanin



Uji saponin



Uji steroid dan triterpenoid

**7.6 Isolasi Flavonoid dengan Kromatografi Kolom Gradien Eluen**



Proses aktivasi silika gel



Pembuatan bubuk silika



Penjenuhan kolom selama 24 jam



Proses elusi



Hasil kolom isolat etil asetat

**7.7 Monitoring Hasil Pemisahan dengan KLTA**



Penjenuhan eluen

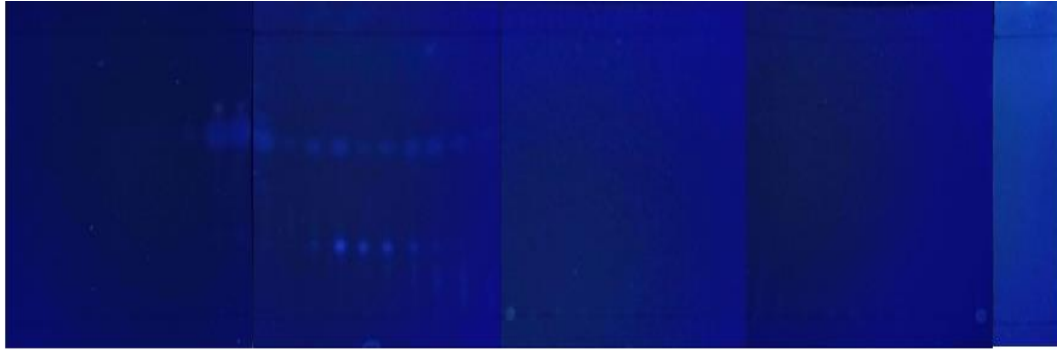


Aktivasi plat silika

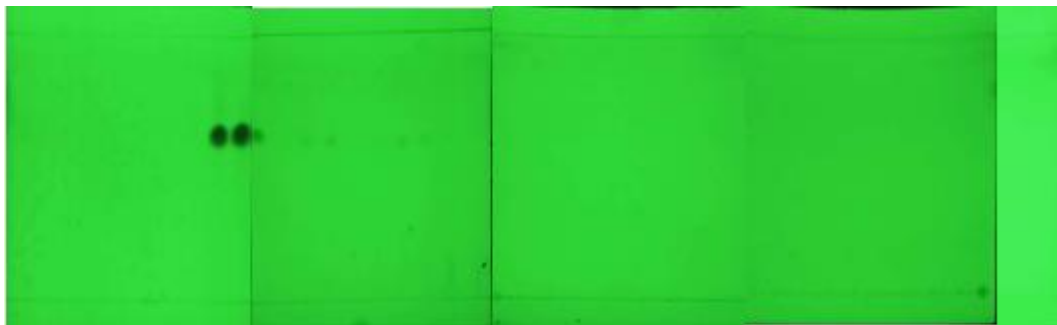


Proses elusi pada KLTA





Hasil KLTA di bawah lampu UV 366 nm



Hasil KLTA di bawah lampu UV 254 nm

### 7.8 Isolasi Flavonoid dengan KLTA



Penjenuhan eluen



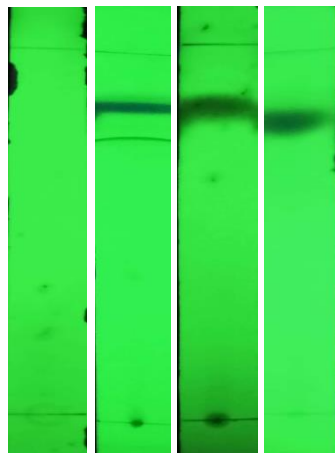
Aktivasi plat silika



Proses elusi pada KLTA



Hasil KLTA di bawah lampu UV 366 nm

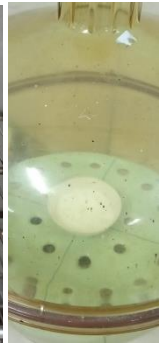


Hasil KLTA di bawah lampu UV 254 nm

### 7.9 Isolasi Flavonoid dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring Hasil Pemisahan dengan KLTA



Proses aktivasi silika gel



Pembuatan bubur silika



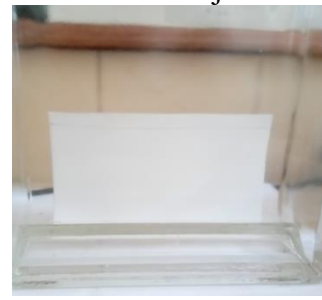
Penjenuhan kolom selama 24 jam



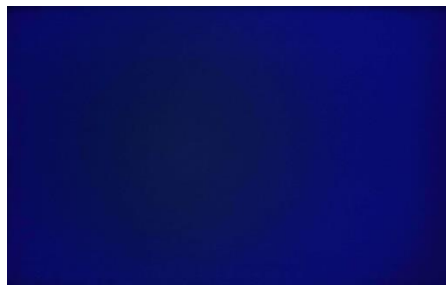
Proses elusi



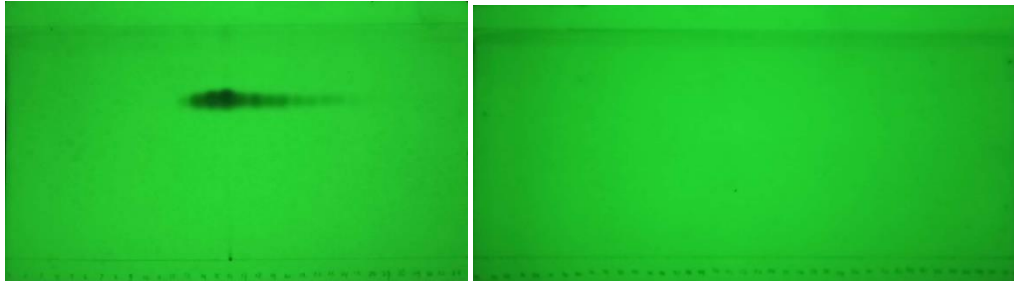
Hasil kolom isolat etil asetat



Proses elusi pada KLTA



Hasil KLTA di bawah lampu UV 366 nm

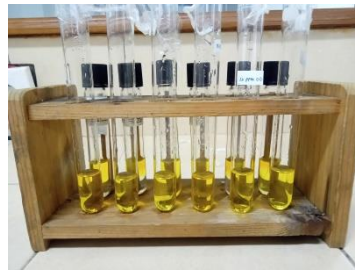


Hasil KLTA di bawah lampu UV 254 nm

### 7.10 Penetapan Kadar Flavonoid Pada Isolat Hasil Kromatografi Kolom



Preparasi larutan baku kuersetin dan larutan uji



Larutan baku kuersetin dan larutan uji setelah penambahan  $\text{AlCl}_3$ , asam asetat, dan aquabides



Proses pencampuran larutan



Inkubasi sampel