

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA
AKTIF EKSTRAK ETANOL 70%, FRAKSI ETIL ASETAT SERTA
ISOLAT HASIL KOLOM RIMPANG JERINGAU (*Acorus calamus* L.)**

SKRIPSI

**Oleh:
IDA IRMA AFRIANI
NIM. 18630064**



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

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA
AKTIF EKSTRAK ETANOL 70%, FRAKSI ETIL ASETAT SERTA
ISOLAT HASIL KOLOM RIMPANG JERINGAU (*Acorus calamus* L.)**

SKRIPSI

**Oleh:
IDA IRMA AFRIANI
NIM. 18630064**

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

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

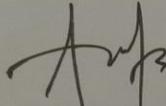
UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA
AKTIF EKSTRAK ETANOL 70%, FRAKSI ETIL ASETAT SERTA
ISOLAT HASIL KOLOM RIMPANG JERINGAU (*Acorus calamus* L.)

SKRIPSI

Oleh:
IDA IRMA AFRIANI
NIM. 18630064

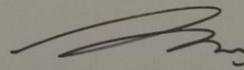
Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal : 01 Desember 2022

Pembimbing I



Dr. 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



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

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA
AKTIF EKSTRAK ETANOL 70%, FRAKSI ETIL ASETAT SERTA
ISOLAT HASIL KOLOM RIMPANG JERINGAU (*Acorus calamus* L.)

SKRIPSI

Oleh:
IDA IRMA AFRIANI
NIM. 18630064

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 20 Desember 2022

Penguji Utama	: Eny Yulianti M.Si NIP. 19760611 200501 2 006	(.....)
Ketua Penguji	: Nur Aini M.Si NIP. 19840608 201903 2 009	(.....)
Sekretaris Penguji	: Dr. Suci Amalia M.Sc NIP. 19821104 200901 2 007	(.....)
Anggota Penguji	: Dr. Akyunul Jannah S.Si, M.P. NIP. 19750410 200501 2 009	(.....)

Mengesahkan,
Ketua Program Studi



Rachmawati Nugsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

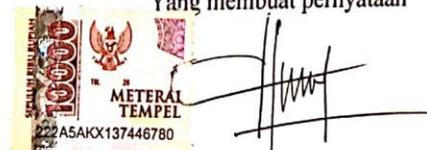
Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ida Irma Afriani
NIM : 18630064
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antibakteri dan Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Etanol 70%, Fraksi Etil Asetat Serta Isolat Hasil Kolom Rimpang Jeringau (*Acorus Calamus L.*)

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

Malang, 01 Desember 2022

Yang membuat pernyataan



Ida Irma Afriani
NIM. 18630064

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, dengan mengucapkan syukur kepada Allah SWT yang telah mengizinkan saya melewati satu tahapan yang sangat berharga bagi hidup saya. Sholawat terhaturkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah menunjukkan jalan kebenaran dan inspirasi bagi kita semua. Semoga kita semua mendapatkan syafaat di hari akhir. Saya persembahkan karya saya ini kepada :

Ibu saya Nuriah dan Bapak saya Abd Muhid yang setia mendoakan, memberikan semangat, memberikan kepercayaan, serta memberikan apapun yang terbaik buat saya. Terima kasih juga kepada saudara-saudara saya (Zaki, Zaka, Irul, Molida, Isfa dan Ayun) yang telah memberikan support dan nasihat kepada saya. Terima kasih telah mendukung saya sehingga saya dapat menyelesaikan studi S1 ini. Semoga kita semua selalu dalam lindungan dan keberkahan Allah SWT.

Ibu Dr. Suci Amalia M.Sc selaku pembimbing yang telah sabar memberikan nasehat dan arahan sehingga saya dapat menyelesaikan tugas akhir ini. Ibu Dr. Akyunul Jannah S.Si, M.P selaku pembimbing agama yang memberikan masukan dan arahan. Ibu Eny Yulianti M.Si dan Ibu Nur Aini M.Si selaku dosen penguji yang telah bersabar membimbing saya dalam proses revisi. Untuk bapak dan ibu laboran yang telah membantu saya menyelesaikan penelitian.

Selanjutnya, saya ucapkan terima kasih sahabat saya dari kecil (Hiba) yang sangat berjasa dalam hidup saya. Kepada eounni Farah yang sudah menjadi teman dan panutan dalam berfikir. Kepada eounni Aisyah dan eounni eounni saya lainnya yang sangat berjasa sebagai guru penelitian saya di Lab Biokimia. Kepada partner saya (Faridah) yang sudah banyak membantu dalam penelitian ini. Kepada sahabat saya Mpita (a.k.a Jaenab) dan Santi, terima kasih sudah melalui banyak hal bersama dari kita maba. Kepada sahabat saya Diajeng dan Venera yang selalu support saya dalam segala hal. Semoga kedepannya kita semua masih bersama meski agak sulit karna adanya jarak. Kepada anak kost pak Apik (Pupu, Ai, Umik) dan semua teman dekat saya yang paling mengerti, mau direpotin, memberikan bantuan dan banyak hal. Kalian sangat berjasa guys bagi hidup saya.

Saya ucapkan banyak terima kasih dan maaf jika saya sering merepotkan. Semoga kita semua selalu dalam lindungan Allah SWT dan diberikan kelancaran serta kemudahan untuk mencapai apa yang kita harapkan.

Terakhir, saya ucapkan terima kasih kepada diri saya sendiri yang sudah bisa melalui banyak hal, sehingga saya mendapatkan pelajaran berharga dalam hidup. Terima kasih sudah banyak melawan kemalasan dan kemageran sehingga dapat menyelesaikan tanggung jawab untuk menyelesaikan studi S1 kali ini. Terima kasih Irma!

MOTO

*“Setiap perjuangan pasti melelahkan, tapi ingatlah kesuksesan tidak datang sendirinya. Tidak perlu melihat pencapaian orang, cukup kerjakan dan berserah.
Ingatlah, masih ada esok. Tapi hari ini bukan milikmu lagi”*

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan segala rahmat dan nikmatnya berupa kesehatan, kesempatan, serta kesabaran, sehingga penyusun dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul “Identifikasi Perbandingan Senyawa Aktif Ekstrak, Fraksi Serta Isolat Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) Dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% Dan Fraksi Etil Asetat” dengan semaksimal mungkin. Sholawat dan salam tidak lupa selalu tucurah limpahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah menyampaikan petunjuk dan menunjukkam jalan yakni agama islam. Semoga kelak kita termasuk ummat yang mendapatkan syafaatnya, Aamiin. Penyusun juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. M. Zainuddin, MA selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia Fkultas Sains danTeknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Suci Amalia, M.Sc selaku Dosen pembimbing I yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, arahan serta nasihat.
5. Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P Dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, arahan serta nasihat.
6. Segenap Bapak/Ibu dosen serta pegawai di Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang

telah memberikan akses sarana guna keberlangsungan penyusunan laporan penelitian ini.

7. Orang tua tercinta serta keluarga yang telah memberikan perhatian, nasihat, do'a, dukungan baik moril maupun materil yang tak mungkin terbalaskan.
8. Teman-teman dekat saya yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu serta semua pihak yang telah membantu memberikan semangat.

Penyusun menyadari banyaknya kekurangan dalam penyusunan seminar hasil pada penelitian ini. Untuk itu, penyusun dengan lapang hati mengharapkan kritik dan saran untuk perbaikan dalam penyusunan selanjutnya. Terlepas dari segala kekurangan, semoga hasil penelitian ini dapat memberikan informasi dan kontribusi positif serta bermanfaat bagi kita semua, Aamiin.

Malang, 19 Oktober 2022

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTO	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xiv
المخلص	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Batasan Penelitian	7
1.5 Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Morfologi Tanaman Jeringau (<i>Acorus calamus</i> L.)	9
2.2 Senyawa Metabolit Sekunder Flavonoid	12
2.3 Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder Rimpang Jeringau Menggunakan Metode Ultrasonik	15
2.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Rimpang Jeringau	16
2.5 Senyawa Metabolit Sekunder Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus</i> L.)	18
2.5.1 Uji Fitokimia Senyawa Flavonoid	19
2.5.2 Uji Fitokimia Senyawa Tanin	20
2.5.3 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid	22
2.5.4 Uji Fitokimia Senyawa Saponin	23
2.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Terpenoid	24
2.6 Metode Pemisahan Kromatografi Kolom	25
2.7 Skrining Pemisahan Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik	27
2.8 Identifikasi Gugus Fungsi Senyawa Menggunakan Spektrofotometer FT-IR	28
2.9 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan UV-Vis	29
2.10 Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid Terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	29
2.10.1 Macam-Macam Metode Uji Aktivitas Antibakteri Difusi Agar	32

2.10.2	Mekanisme Kerja Flavonoid Sebagai Antibakteri	34
2.10.3	Klasifikasi Bakteri <i>Staphylococcus Aureus</i>	32
BAB III	METODOLOGI PENELITIAN	36
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian	36
3.2	Alat dan Bahan	36
3.2.1	Alat.....	36
3.2.2	Bahan	36
3.3	Rancangan Penelitian	37
3.4	Tahapan Penelitian	37
3.5	Metode Penelitian.....	38
3.5.1	Preparasi Rimpang Jeringau	38
3.5.2	Analisis Kadar Air Rimpang Jeringau	38
3.5.3	Ekstraksi Senyawa Aktif Rimpang Jeringau dengan Ultrasonik	39
3.5.4	Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Rimpang Jeringau	39
3.5.5	Skrining Fitokimia Kandungan Ekstrak Rimpang Jeringau	39
3.5.6	Pemisahan Menggunakan Kromatografi Kolom	41
3.5.7	Identifikasi Senyawa Flavonoid Menggunakan FTIR dan UV-Vis.....	42
3.5.8	Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Flavonoid Terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	43
BAB IV	PEMBAHASAN.....	46
4.1	Ekstraksi dan Partisi Senyawa Metabolit Sekunder Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus L.</i>)	46
4.2	Skrining Fitokimia Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus L.</i>).....	49
4.3	Isolasi Senyawa Flavonoid Menggunakan Kromatografi Kolom	54
4.4	Identifikasi Isolat Hasil Kolom Menggunakan Spektroskopi IR	58
4.5	Identifikasi Isolat Flavonoid Hasil Kolom Menggunakan Spektroskopi UV	62
4.6	Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% dan Fraksi Etil Asetat Terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	64
4.7	Prespektif Manfaat Tanaman Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus L.</i>) dalam Pandangan Islam.....	68
BAB V	PENUTUP.....	72
5.1	Kesimpulan.....	72
5.2	Saran.....	73
DAFTAR PUSTAKA	74
LAMPIRAN	84

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Morfologi tanaman <i>Acorus calamus</i> L.....	9
Gambar 2.2	Macam-macam struktur flavonoid	13
Gambar 2.3	Dugaan reaksi hidrolisis menggunakan katalis HCl	17
Gambar 2.4	Reaksi flavonoid dengan logam Mg dan HCl	20
Gambar 2.5	Dugaan reaksi tanin dan FeCl ₃	21
Gambar 2.6	Dugaan reaksi uji <i>dragendorff</i>	22
Gambar 2.7	Dugaan reaksi uji <i>Mayer</i>	23
Gambar 2.8	Dugaan reaksi uji saponin.....	24
Gambar 2.9	Dugaan reaksi uji terpenoid	25
Gambar 4.1	Hasil Ekstraksi etanol 70% yang telah dipekatkan	48
Gambar 4.2	Filtrat hasil partisi fraksi etil asetat	49
Gambar 4.3	Hasil uji fitokimia flavonoid sebelum dan sesudah diberikan pereaksi (a) ekstrak etanol 70% (b) fraksi etil asetat.....	51
Gambar 4.4	Hasil uji fitokimia tanin sebelum dan sesudah diberikan pereaksi (a) ekstrak etanol 70% (b) fraksi etil asetat.....	52
Gambar 4.5	Hasil uji fitokimia terpenoid sebelum dan sesudah diberikan pereaksi (a) ekstrak etanol 70% (b) fraksi etil asetat.....	53
Gambar 4.6	Monitoring KLTA isolat hasil kolom menggunakan eluen bergradien (a) pengamatan secara langsung, (b) di bawah UV 366 nm	55
Gambar 4.7	Hasil monitoring eluen terbaik pemisahan flavonoid (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)	56
Gambar 4.8	Hasil KLTA isolat hasil kolom eluen n-heksana: etil asetat (7:3) (a) pengamatan secara langsung, (b) di bawah UV 366 nm.....	58
Gambar 4.9	Serapan FTIR ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat kolom kromatografi.....	59
Gambar 4.10	Puncak hasil UV ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan isolat kolom kromatografi.....	62
Gambar 4.11	Zona hambat pertumbuhan bakteri pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat	68

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Penelitian terdahulu tentang rimpang Jeringau	11
Tabel 2.2	Penelitian terdahulu tentang kadar total flavonoid rimpang Jeringau.....	12
Tabel 2.3	Hasil penelitian terdahulu terkait kandungan senyawa metabolit sekunder pada rimpang Jeringau	19
Tabel 2.4	Penelitian terdahulu isolasi senyawa flavonoid menggunakan kolom.....	26
Tabel 4.1	Rendemen hasil ekstraksi dan partisi rimpang Jeringau.....	47
Tabel 4.2	Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol 70% dan Fraksi Etil Asetat	50
Tabel 4.3	Monitoring eluen pemisahan senyawa metabolit sekunder flavonoid n-heksana-etil asetat (7:3).	56
Tabel 4.4	Serapan panjang gelombang pada ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan isolat kolom	59
Tabel 4.5	Zona hambat pertumbuhan bakteri pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat.....	65

ABSTRAK

Afriani, Ida Irma. 2022. **Identifikasi Perbandingan Senyawa Aktif Ekstrak, Fraksi Serta Isolat Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) Dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% Dan Fraksi Etil Asetat.** Seminar Hasil. Jurusan 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: Flavonoid, Antibakteri, Rimpang Jeringau, Fraksi, Kolom.

Jeringau merupakan salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat-obatan herbal. Tanaman Jeringau banyak sekali dimanfaatkan terutama pada bagian rimpangnya. Rimpang Jeringau banyak mengandung senyawa metabolit sekunder, diantaranya flavonoid, alkaloid, terpenoid, steroid dan senyawa fenol lainnya. Pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antibakteri senyawa flavonoid pada rimpang Jeringau dan mengidentifikasi senyawa aktif flavonoid yang terkandung didalamnya.

Rimpang Jeringau akan dikeringkan dalam oven dan diekstraksi dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode ultrasonikasi. Ekstrak sampel yang telah diuapkan kemudian dihidrolisis dengan HCl dan dipartisi dengan etil asetat menggunakan corong pisah. Setelah itu dilakukan skrining fitokimia kandungan senyawa metabolit sekunder flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan terpenoid. Pemisahan senyawa aktif menggunakan kromatografi kolom. Selanjutnya dilakukan identifikasi pada sampel dengan menggunakan spektrofotometer FT-IR dan UV-Vis serta diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*.

Hasil ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat sebesar 18,73 dan 10,8%. Hasil ekstrak etanol menunjukkan positif senyawa flavonoid, tanin, dan triterpenoid. Sedangkan pada fraksi etil asetat menunjukkan positif senyawa flavonoid dan tanin. Hasil FTIR flavonoid ditunjukkan adanya gugus C=C aromatik, C-H aromatik, -OH, C-O alkohol sekunder, C=O dan C-H alifatik dengan ditunjang hasil UV pada sampel ekstrak etanol 70% menunjukkan adanya serapan pada panjang gelombang 253 dan 302 nm, fraksi etil asetat pada 254 dan 302 nm, serta isolat kolom pada 258 dan 383 nm. Pada senyawa tanin memiliki gugus khas CH sp^3 , C-O-C eter, C=O ester dan C-OH. Sedangkan pada senyawa terpenoid memiliki gugus khas C-H alifatik yang menunjukkan adanya gugus germinal yakni gugus metil (-CH₃) dan metilena (-CH₂). Hal ini juga ditunjang dengan hasil identifikasi UV flavonoid pada serapan 353-358 nm dan terpenoid pada daerah 201, 204, 205, 207, 208 dan 216 nm. Hasil uji aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas tertinggi pada konsentrasi 60% yakni sebesar 4,54 mm (kategori lemah) dan 5,29 mm (kategori sedang).

ABSTRACT

Afriani, Ida Irma. 2022. **Identification of Comparison of Active Compound Extracts, Fractions and Isolats of Jeringau Rhizome (*Acorus calamus* L.) and Antibacterial Activity Test of 70% Ethanol Extract and Ethyl Acetate Fraction.** Result Seminar. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang. Supervisor I: Dr. Suci Amalia M.Sc. Advisor II: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P

Keywords: Flavonoid, Antibacterial, Jeringau Rhizome, Fraction, Column.

Jeringau is a plant that is used as herbal medicine. The Jeringau plant is used a lot, especially in its rhizome. Jeringau rhizome contains many secondary metabolite compounds, including flavonoids, alkaloids, terpenoids, steroids and other phenolic compounds. In this research, we will test the antibacterial activity of flavonoid compounds in Jeringau rhizome and identify the active flavonoid compounds contained in them.

Jeringau rhizome will be dried in an oven and extracted with 70% ethanol using ultrasonication method. The sample extract that has been evaporated is then hydrolyzed with HCl and partitioned with ethyl acetate using a separatory funnel. After that, a phytochemical screening was carried out for the content of secondary metabolites of flavonoids, alkaloids, tannins, saponins, and terpenoids. Separation of active compounds using column chromatography. Then, the samples were identified using FT-IR and UV-Vis spectrophotometers and tested for their antibacterial activity against *S. aureus* bacteria.

The results of 70% ethanol extract and ethyl acetate fraction were 18.73 and 10.8%. The results of the ethanol extract showed positive for flavonoids, tannins and triterpenoids. While the ethyl acetate fraction showed positive flavonoids and tannins. FTIR results of flavonoids indicated the presence of aromatic C=C, aromatic C-H, -OH, C-O secondary alcohol, C=O and aliphatic C-H groups supported by UV results in 70% ethanol extract samples showing absorption at a wavelength of 253 and 302 nm, ethyl fraction acetate at 254 and 302 nm, and column isolates at 258 and 383 nm. In the tannin compound has a typical group CH sp³, C-O-C ether, C=O ester and C-OH. Whereas the terpenoid compounds have atypical C-H aliphatic groups which indicate the presence of germinal groups, namely methyl (-CH₃) and methylene (-CH₂) groups. This was also supported by the results of UV identification of flavonoids at absorption 353-358 nm and terpenoids at 201, 204, 205, 207, 208 and 216 nm. Antibacterial activity test results on the 70% ethanol extract and ethyl acetate fraction showed the highest activity at a concentration of 60%, namely 4.54 mm (weak category) and 5.29 mm (medium category).

الملخص

أفرياني، إيداه إرما. ٢٠٢٢. تحقيق مقارنة استخراج المركبات النشطة، جزء و عزل جذمور Jeringau (*Acorus calamus* L.) واختبار النشاط المضاد للبكتيريا على استخراج إيثانول ٧٠٪ و جزء الإيثيل أسيتات. نتائج الدورة. قسم تعليم الكيمياء، كلية العلوم و التكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرقة الأولى: سوجي، عملية الماجستير، المشرقة الثانية: الدكتورة أعين الجنة الماجستير.

الكلمات المفتاحية: فلافونويد، مضاد للبكتيريا، جذمور، Jeringau، جزء، جدول. جرينغاو (Jeringau) هو أحد النباتات التي استُخدمت كأدوية عشبية. نبات جرينغاو كثير جداً للاستفادة خاصة في جذموره. احتوى جذمور جرينغاو المستخلصات الثانوية، منها فلافونويد، و الفلويديات و التربينويدات و المشتطات و المركبات الفينولية الأخرى. في هذا البحث، سوف يختبر النشاط المضاد للبكتيريا لمركبات الفلافونويد في جذمور Jeringau و حددت مركبات الفلافونويد النشطة الموجودة فيها.

يجفف جذمور جرينغاو (Jeringau) في فرن و يستخلص بنسبة ٧٠٪ من الإيثانول باستخدام طريقة الموجات فوق الصوتية، ثم يحلل مستخلص العينة المتبخر بالماء مع حمض الهيدروكلوريك و يُقسم باستخدام أسيتات الإيثيل باستخدام قمع الجدول. بعد ذلك، تم إجراء فحص كيميائي نباتي لمحتوى المستخلصات الثانوية من مركبات الفلافونويد و الفلويديات و العفص و الصابونين و التربينويدات. فصل المركبات النشطة باستخدام العمود اللوني. تم تحديد العينات باستخدام مقياس الطيف الضوئي FT-IR و UV-Vis و اختبار النشاط المضاد للبكتيريا ضد *Staphylococcus aureus*.

كانت نتائج مستخلص الإيثانول ٧٠٪ و فئة أسيتات الإيثيل بعدد ١٨,٧٣٪ و ١٠,٨٪. أظهرت نتائج مستخلص الإيثانول وجود مركبات إيجابية لمركبات الفلافونويد و العفص و التربينويد. بينما أظهر جزء أسيتات الإيثيل مركبات الفلافونويد و العفص موجبة. أشارت نتائج FTIR للفلافونويدات إلى وجود C=C العطري، و C-H العطري، و OH-، و C=O كحول ثانوي، و C=O، و مجموعات C-H الأليفاتية بدعم من الأشعة فوق البنفسجية في ٧٠٪ من عينات مستخلص الإيثانول تظهر الامتصاص بطول موجي قدره ٢٥٣ و ٣٠٢ نانومتر، أسيتات جزء الإيثيل عند ٢٥٤ و ٣٠٢ نانومتر، و عزل العمود عند ٢٥٨ و ٣٨٣ نانومتر. يحتوي مركب التالين على مجموعة نموذجية CH sp³ و C-O-C eter و C=O ester و C-OH. و في الوقت نفسه، تحتوي مركبات terpenoid على مجموعات C-H الأليفاتية نموذجية تشير إلى وجود مجموعات جراثومية، وهي مجموعات الميثيل (-CH₃) و الميثيلين (-CH₂). تم دعم ذلك أيضاً من خلال نتائج التعرف على الأشعة فوق البنفسجية للفلافونويد عند الامتصاص ٣٥٣-٣٥٨ نانومتر و التربينويد عند ٢٠١ و ٢٠٤ و ٢٠٥ و ٢٠٧ و ٢٠٨ و ٢١٦ نانومتر. أظهرت نتائج اختبار الفعالية المضادة للبكتيريا على مستخلص الإيثانول ٧٠٪ و فئة أسيتات الإيثيل أعلى فعالية بتركيز ٦٠٪، وهو ٤,٥٤ ملم (فئة ضعيفة) و ٥,٢٩ ملم (فئة متوسطة).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia termasuk dalam salah satu negara yang memiliki keanekaragaman hayati tinggi. Di dalamnya terdapat potensi akan berbagai macam tanaman obat. Menurut Agusta (2015) Indonesia memiliki 30 hingga 50 ribu jenis tanaman. Namun hanya sekitar 7.500 yang memiliki manfaat sebagai obat. Pemanfaatan rimpang Jeringau sebagai obat herbal dapat digunakan untuk mengatasi bakteri yang dapat menyebabkan infeksi (Rita *et al.*, 2019). Masyarakat pedalaman suku dayak menggunakan rimpang Jeringau sebagai obat herbal untuk penyakit tifus dan demam berdarah (Sofyan *et al.*, 2017).

Dalam Al-Qur'an Allah SWT berfirman dalam surah Taa-haa ayat 53 :

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً
فَأَخْرَجْنَا بِهَئِذَا مِنْ نَبَاتٍ شَتَّىٰ

Artinya : “(Tuhan) yang telah menjadikan bumi sebagai hamparan bagimu, dan menjadikan jalan-jalan di atasnya bagimu, dan yang menurunkan air (hujan) dari langit. Kemudian Kami tumbuhkan dengannya (air hujan itu) berjenis-jenis aneka macam tumbuh-tumbuhan.”

Pada surah Taa-haa ayat 53, tafsir Quraish Shihab menyatakan “Dialah Tuhan yang menganugerahkan nikmat kehidupan dan pemeliharaan kepada hamba-hamba-Nya. Dengan kekuasaannya, Dia telah menjadikan bumi sebagai hamparan untukmu, membuka jalan-jalan yang kamu lalui dan menurunkan hujan di atas bumi sehingga terciptalah sungai-sungai. Dengan air itu Allah menumbuhkan

tumbuh-tumbuhan yang berbeda-beda warna, rasa, dan manfaatnya. Ada yang berwarna putih dan hitam, ada pula yang manis dan pahit”.

Berdasarkan surah Taa-haa ayat 53, telah disebutkan bahwasanya Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang memiliki banyak kegunaan (manfaatnya). Jeringau salah satu tumbuhan yang memiliki banyak manfaat khususnya pada rimpangnya. Adanya kandungan senyawa aktif pada rimpang Jeringau, menjadikan tanaman tersebut dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat seperti antiinflamasi (Mohammed & Hameed, 2018), antifungi (Ganjewala *et al.*, 2011), antikanker (Koca *et al.*, 2018), antioksidan (Saman *et al.*, 2013; Barua *et al.*, 2014; Zuhra *et al.*, 2006), antitumor (Prawiroharsono, 2011), serta sebagai antibakteri (Yende *et al.*, 2008; Asha & Ganjewala, 2009; Kumar, 2014; Sukanada, 2012; Li & Wah, 2017; Muchtaromah *et al.*, 2019; Rita *et al.*, 2019; Purwanti, 2020).

Senyawa aktif yang ditemukan dalam rimpang Jeringau menjadikan tanaman ini memiliki banyak manfaat. Beberapa kandungan senyawa metabolit sekunder yang bermacam-macam seperti alkaloid, flavonoid, tanin, fenol, minyak atsiri, saponin (Firnando *et al.*, 2019; Safrina *et al.*, 2018), glikosida, steroid, protein, dan karbohidrat (Srividya *et al.*, 2014). Penelitian lain juga membuktikan bahwasannya bagian rimpang Jeringau positif mengandung senyawa tanin dan flavonoid (Muthulakshmi *et al.*, 2015). Dalam penelitian Barua *et al.* (2014) kandungan senyawa aktif paling tinggi dalam tanaman *Acorus calamus* Linn yakni flavonoid dan senyawa fenolik. Kandungan senyawa aktif lainnya yakni alkaloid, terpenoid, dan tanin.

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder golongan fenol terbesar, yang dapat ditemukan hampir di seluruh bagian tumbuhan hijau seperti daun, batang, buah, dan biji (Prawiroharsono, 2011). Senyawa aktif flavonoid memiliki beberapa macam aktivitas seperti antibakteri (Yuan *et al.*, 2021; Farhadi *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2014), antivirus (Badshah *et al.*, 2021; Lalani & Poh, 2020; Tabari *et al.*, 2021), antioksidan (Zeng *et al.*, 2020; Agati *et al.*, 2020), antialergi (Shi *et al.*, 2018) dan antikanker (Selvakumar *et al.*, 2020; Kopustinskiene *et al.*, 2020). Flavonoid bersifat bakteriostatik dan disinfektan. Selain itu, flavonoid mampu membunuh bakteri secara langsung dengan mengaktifkan antibiotik yang sudah resisten dan melemahkan patogenisitas bakteri (Xie *et al.*, 2014).

Senyawa metabolit sekunder terdapat pada bagian vakuola tanaman (di dalam sel yang dilindungi dinding sel) (Hardiansi *et al.*, 2020). Pengambilan senyawa metabolit sekunder flavonoid pada rimpang, dilakukan ekstraksi untuk mengeluarkan senyawa metabolit sekunder dari dalam sel. Untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder yang diinginkan, pemilihan pelarut dan metode yang tepat untuk proses ekstraksi akan mempengaruhi hasil rendemen. Hasan (2015) melakukan ekstraksi rimpang Jeringau dengan pelarut yang berbeda yakni etanol p.a, kloroform, dan n-heksana. Pelarut etanol p.a menunjukkan hasil rendemen paling besar yakni 7,8%. Sedangkan pada ekstrak kloroform dan n-heksana didapatkan rendemen sebesar 3,3 dan 2.4%. Ketiga larutan tersebut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa pelarut etanol memiliki hasil rendemen tertinggi. Selain itu penelitian Masduqi & Rahardhian (2021) menunjukkan bahwa ekstraksi rimpang Jeringau menggunakan etanol 50, 70, dan 90% menghasilkan kadar flavonoid total sebesar 4,917; 7,20;

dan 6,42 mg RE/gram. Kandungan kadar flavonoid total tertinggi yakni pada pelarut etanol pada 70%. Selain flavonoid, ekstrak menunjukkan positif mengandung tanin, saponin, alkaloid, dan terpenoid.

Metode ekstraksi yang dipilih adalah metode ekstraksi dingin, yakni sonikasi. Ekstraksi ultrasonik memanfaatkan gelombang akustik pada frekuensi lebih dari 16 kHz (Sekarsari *et al.*, 2019). Ekstraksi ultrasonik dipilih karena senyawa bioaktif seperti flavonoid tidak tahan pada suhu di atas 50°C. Senyawa akan terdegradasi dan mengalami perubahan struktur sehingga rendemen yang dihasilkan akan lebih sedikit (Yuliantari *et al.*, 2017). Ekstraksi ultrasonik merupakan hasil pembaruan dari metode maserasi. Kelebihan dari ekstraksi ini yakni membutuhkan sedikit pelarut (Setyantoro *et al.*, 2019), tidak memerlukan suhu tinggi (Ranjha *et al.*, 2021) sehingga tidak merusak senyawa aktif, rendemen yang dihasilkan tinggi, serta mempersingkat waktu ekstraksi (Aihua *et al.*, 2019).

Ekstraksi ultrasonik meningkatkan rendemen yang dihasilkan. Pada penelitian sebelumnya, Fithrony (2021) melakukan ekstraksi rimpang Jeringau menggunakan metode ultrasonik mendapatkan rendemen sebesar 14,55%. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan Firnando *et al.* (2019) ekstraksi maserasi rimpang Jeringau didapatkan rendemen sebesar 11,29%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstraksi menggunakan ultrasonik dapat rendemen lebih banyak dari metode ekstraksi maserasi. Ekstrak kasar yang dihasilkan kemudian dihidrolisis dan dipartisi untuk mendapatkan senyawa target yang lebih murni. Hidrolisis dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan antara aglikon dan glikon dari senyawa yang ditarget agar dihasilkan senyawa yang lebih spesifik (Fasya *et*

al., 2016). Selanjutnya dilakukan partisi untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya.

Antibakteri merupakan zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. *Staphylococcus aureus* termasuk dalam salah satu jenis bakteri yang merugikan manusia. Ketika bakteri *Staphylococcus aureus* mencemari makanan, maka dapat menyebabkan keracunan akibat adanya enterotoksin dari bakteri tersebut (Fatimah *et al.*, 2016). Selain itu, bakteri tersebut dapat menyebabkan infeksi pada kulit dan jaringan (Tong *et al.*, 2015), infeksi aliran darah (Kwiecinski & Horswill, 2020), hingga pneumonia (Zhen *et al.*, 2020), serta dapat juga mengakibatkan infeksi organ dalam seperti jantung, limfa, dan paru-paru (Pollitt *et al.*, 2018).

Senyawa metabolit sekunder golongan fenol, yakni flavonoid memiliki aktivitas antibakteri (Ferawaty *et al.*, 2012). Mekanisme kerja flavonoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri yakni dengan membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga akan menyebabkan kerusakan pada membran sel bakteri dan senyawa intraseluler akan keluar (Purwanti, 2007). Flavonoid juga mampu menghambat sintesis asam nukleat, fungsi membran sitoplasma, metabolisme energi (Cushnie & Lamb, 2005), sel envelope, rantai transpor elektron, dan sintesis *Adenosin Triphosphate* (ATP) (Górniak *et al.*, 2019). Selain itu flavonoid juga merusak protein sel bakteri dan merusak membran sel hingga tidak dapat diperbaiki lagi (Pelczar dan Chan, 1988). Anisa *et al.* (2014) melakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol rimpang Jeringau terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan variasi konsentrasi 25; 50; 75; dan 100%. Hasil menunjukkan ekstrak etanol rimpang Jeringau mampu menghasilkan

zona hambat sebesar 2,2; 2,39; 2,48; dan 2,75 cm yang mana termasuk dalam kategori sangat kuat.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya, maka penulis tertarik untuk meneliti perbandingan senyawa aktif yang terkandung pada ekstrak, fraksi, dan isolat serta melakukan uji aktivitas antibakteri pada ekstrak dan fraksi rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) dengan metode difusi cakram (*paper disk*). Ekstraksi menggunakan ultrasonik dengan pelarut etanol 70% dan dipartisi menggunakan pelarut etil asetat. Fraksi etil asetat selanjutnya dilakukan pemurnian menggunakan kromatografi kolom dan dimonitoring menggunakan kromatografi lapis tipis analitik untuk mengetahui tingkat kemurnian hasil isolat. Identifikasi senyawa aktif pada ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat hasil kolom menggunakan spektrofotometer FT-IR dan UV-Vis. Pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah yang dikaji dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Golongan senyawa aktif apa sajakah yang terkandung pada ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat hasil kolom rimpang Jeringau?
2. Bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi cakram?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui senyawa aktif yang terkandung pada ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat hasil kolom rimpang Jeringau.
2. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat rimpang Jeringau terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi cakram.

1.4 Batasan Penelitian

1. Sampel Jeringau yang digunakan hanya bagian rimpangnya.
2. Ekstraksi menggunakan metode sonikasi dengan pelarut etanol 70%.
3. Partisi menggunakan pelarut etil asetat
4. Uji fitokimia dilakukan pada senyawa flavonoid, tanin, saponin, terpenoid, dan alkaloid.
5. Isolasi flavonoid menggunakan kromatografi kolom dengan eluen n-heksana-etil asetat (7:3).
6. Uji aktivitas antibakteri dilakukan pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat menggunakan metode difusi cakram.
7. Identifikasi senyawa aktif menggunakan instrument FT-IR dan UV-Vis.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan harapan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai manfaat dari rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) sebagai alternatif obat khususnya pada antibakteri *Staphylococcus aureus*.

Penelitian ini juga diharapkan dapat mempermudah pengkajian lebih lanjut tentang aktivitas serta pemanfaatan senyawa flavonoid tanaman dalam berbagai bidang, terutama bidang kesehatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Morfologi Tanaman Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Jeringau (*Acorus calamus* L.) termasuk dalam salah satu tumbuhan herbal yang memiliki bentuk seperti rumput. Tanaman Jeringau biasanya hidup didaerah yang lembab seperti rawa dan air. Tanaman Jeringau memiliki ciri tinggi sekitar 75 cm. Selain itu, Jeringau juga berdaun tunggal berwarna hijau , lebar sekitar 5 cm, bentuk lanset, ujungnya runcing, memiliki tepi rata dan batangnya pendek, basah, membentuk rimpang, berwarna putih dan sedikit kotor karena berada dalam tanah. Bunga dari Jeringau membentuk bonggol dan majemuk, ujungnya meruncing sekitar 20 sampai 25 cm yang terletak di lipatan daun dan berwarna putih. Pembudidayaan Jeringau bisa dengan cara stek batang, menanam rimpangnya atau menggunakan tunas-tunas yang muncul dari buku-buku rimpang. Akar dari tumbuhan Jeringau memiliki bentuk serabut (Irwan, 2017). Morfologi tanaman *Acorus calamus* L. ditampilkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Morfologi tanaman *Acorus calamus* L.(Sukmawati, 2015)

Menurut Sukmawati (2015) tanaman Jeringau memiliki rimpang yang berbau wangi. Daunnya apabila dikoyak juga akan menghasilkan bau yang wangi.

Jeringau jarang mengeluarkan benih sehingga cara pembiakkan utamanya dengan melalui pecahan rimpang. Tanaman Jeringau diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliphyta
Kelas	: Liliopsida
Bangsa	: Arales
Suku	: Araceae
Marga	: Acorus
Spesies	: <i>Acorus calamus</i> L.

Tanaman jeringau memiliki banyak nama di masing-masing daerah Indonesia. Di Aceh, tanaman jeringau disebut jeuruger, di Sunda disebut dringo dan di Jawa Tengah disebut dengan dlingo. Adapun nama-nama jeringau di beberapa tempat yakni jerango (Gayo), jarango (Batak), jeriangu (Minangkabau), ai wahu (Ambon), sarangu (Nias), jharango (Madura), jangu atau kaliraga (Flores), jaringo (Sasak), kariango (Makasar), kalamunga (Minahasa), areango (Bugis) (Sukmawati, 2015).

Dalam kehidupan sehari-hari, jeringau dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Rita *et al.* (2019) melaporkan bahwasannya rimpang jeringau dapat dimanfaatkan sebagai obat sakit perut, gangguan pencernaan, penenang, meningkatkan nafsu makan, melegakan hidung tersumbat dan antiseptic bahan. Selain itu Jeringau dapat digunakan untuk pengobatan disentri, diare kronis, demam intermiten, tumor, penyakit mental dan pengobatan epilepsi (Paithankar *et al.*, 2011). Jeringau dapat digunakan sebagai obat rematik, penyakit kulit, sakit pinggang, memperlancar peredaran darah, batuk asma, pembasmi serangga, dan mengurangi kontaminasi jamur atau bakteri (Sukmawati, 2015).

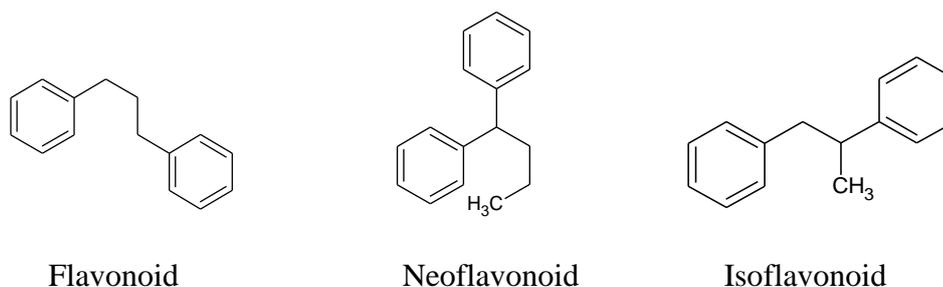
Table 2.1 Penelitian terdahulu tentang rimpang jeringau

No	Nama Penulis	Judul Jurnal	Hasil Penelitian
1	Wahyuni <i>et al.</i> , 2012	Isolasi dan Identifikasi Komponen Kimia Fraksi n-Heksana Daun Tumbuhan Jeringau (<i>Acorus calamus Linn.</i>)	Isolasi komponen kimia fraksi n-heksana menghasilkan 24 fraksi yang kemudian digabungkan menjadi 4 fraksi. Berdasarkan identifikasi FT-IR diperoleh bahwa isolat mengandung beta asaron.
2	Saman <i>et al.</i> , 2013	Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Rimpang Jeringau	Isolat murni (fraksi 38-40) yang diduga senyawa flavonoid. Hal ini didukung hasil karakterisasi FT-IR yang menunjukkan adanya gugus senyawa flavonoid. Hasil antioksidan fraksi air memiliki nilai IC ₅₀ yakni 942,52 fraksi n-heksana 261,48 dan fraksi etil asetat 225,50 ppm dan 230,20 ppm.
3	Wulandari <i>et al.</i> , 2015	Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak metanol Rimpang Jeringau Merah (<i>Acorus calamus Linn.</i>) terhadap Pertumbuhan <i>Shigella flexneri</i> Secara In Vitro	Ekstrak metanol rimpang jeringau merah memiliki aktivitas antibakteri <i>Shigella flexneri</i> . Semakin besar konsentrasi zat antibakteri, semakin besar zona hambat yang terbentuk.
5	Fauziyah <i>at al.</i> , 2017	Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Terhadap Mortalitas Kutu Beras dari Ekstrak Etil asetat Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus L.</i>)	Isolat murni dari ekstrak etil asetat rimpang jeringau positif mengandung senyawa terpenoid, didukung dengan hasil spektrum IR nya. Pada mortalitas kutu beras, didapat semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin meningkat mortalitasnya.
6	Ayu <i>et al.</i> , 2018	Karakteristik dan Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus L.</i>) Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i> pada Sabun Transparan	Hasil pengujian aktivitas antibakteri senyawa minyak atsiri terhadap bakteri <i>S. aureus</i> sebesar 9,54-15,46 mm dan pada bakteri <i>E. coli</i> sebesar 8,61-11,64 mm

Pemanfaatan Jeringau sebagai obat tradisional didukung adanya senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan adanya beberapa senyawa metabolit sekunder pada Jeringau. Penelitian Fatima et al. (2014) menunjukkan Jeringau mengandung flavonoid, tanin, saponin, glikosida, steroid, terpenoid, antrakuinon, gula pereduksi dan phlobatanin. Khwairakpam et al. (2018) melaporkan bahwasannya pada *Acorus calamus* L. mengandung metabolit sekunder flavonoid, fenil propanoid, lignin, steroid, minyak atsiri, saponin, asarone, dan monoterpen. Mamta & Jyoti, (2012) mengidentifikasi adanya senyawa metabolit sekunder flavonoid, tanin, saponin, steroid, triterpenoid, karbohidrat, glikosida dan senyawa fenolik pada Jeringau. Banyaknya senyawa aktif metabolit sekunder menjadikan jeringau banyak dilakukan penelitian sebagai antibakteri, antiinflamasi, antioksidan, antialergi dan sebagainya.

2.2 Senyawa Metabolit Sekunder Flavonoid

Flavonoid merupakan jenis senyawa metabolit sekunder golongan fenolik yang paling besar. Flavonoid terdiri dari 15 atom C dengan struktur $C_6-C_3-C_6$. Setiap bagian C_6 memiliki bentuk cincin benzena yang dihubungkan dengan atom C_3 yang merupakan rantai alifatik. Resonansi rantai alifatik menyebabkan flavonoid terbagi menjadi 3 macam yakni flavonoid (1,3-diarilpropana), isoflavonoid (1,2-diarilpropana) dan neoflavonoid (1,1-diarilpropana) (Achmad, 2006). Macam-macam struktur flavonoid ditampilkan pada Gambar 2.2



Gambar 2.2 Macam-macam struktur flavonoid

Senyawa metabolit sekunder flavonoid bersifat polar karena memiliki gugus hidroksil (gula) sehingga akan larut pada senyawa polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, etil asetat, dimetilsulfoksida, dimetilformadida dan air. Gugus gula yang terikat pada beberapa jenis struktur flavonoid (glikosida) membuat senyawa flavonoid cenderung mudah larut dalam campuran pelarut polar dan air. Sementara aglikon-aglikon flavonoid bersifat semi polar seperti isoflavon, flavanon, flavon, dan flavonol cenderung larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform. Flavonoid sebagai pereduksi yang baik akan menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzimatik maupun non enzimatik. Senyawa flavonoid diklasifikasikan dalam beberapa jenis yakni flavon, flavanon, flavanonol, flavonol, flavan, flavanol, auron, chalkon, dihidrochalkon, garam falvilium dan antosianidin. Flavon, flavonol dan antosianidin merupakan jenis flavonoid yang sering ditemukan dalam tumbuhan. Sedangkan chalkon, auron, flavanon, isoflavonoid dan neoflavonoid jarang ditemukan di alam (Ilyas, 2013).

Flavonoid memiliki struktur berbentuk aglikon flavonoid, flavonoid C-glikosida, flavonoid O-glikosida, flavonoid sulfat dan biflavonoid. Aglikon pada flavonoid merupakan alkohol yang dihasilkan ketika suatu glikosida terhidrolisis oleh asam sehingga menghasilkan gula dan alkohol. Flavonoid O-glikosida memiliki struktur satu atau lebih gugus hidroksil yang terikat pada gula

membentuk ikatan hemiasetal yang tidak tahan asam. Flavonoid C-glikosida merupakan flavonoid yang atom karbonnya langsung mengikat gula sehingga tahan terhadap asam. Flavonoid sulfat memiliki satu ion pusat atau lebih yang terikat pada hidroksi fenol atau gula (Achmad, 2006). Penelitian terdahulu mengenai kadar total flavonoid tanaman Jeringau disajikan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Penelitian terdahulu tentang kadar total flavonoid rimpang Jeringau

No	Nama Penulis	Judul Jurnal	Hasil Penelitian
1	Masduqi & Rahardhian, 2021	Determinasi Flavonoid dan Total Fenolik Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus</i> L.) dengan Perbedaan Konsentrasi Pelarut	Metode kadar total flavonoid yang digunakan yakni mengikuti metode Chang, dihasilkan kadar total flavonoid pada ekstrak etanol 50% sebesar 4,917 mg RE/gram, pada ekstrak etanol 70% sebesar 7,20 mg RE/gram dan pada ekstrak etanol 70% sebesar 6,42 mg RE/gram
2	Khoirunnisa <i>et al.</i> , 2019	Penetapan Kadar Total Flavonoid dan Fenol Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Etanol Rimpang Jeringau	Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 70% rimpang Jeringau merah memiliki kadar total fenol sebesar 432,5710 GAE/gram sampel. Sedang pada uji total flavonoid sebesar 14,8836 mg GE/gram.
3	Firnando <i>et al.</i> , 2019	Penetapan Kadar Total Fenolik dan Flavonoid Fraksi Butanol dan Fraksi Air dari Ekstrak Etanol Rimpang <i>Acorus SP.</i>	Kadar total flavonoid pada fraksi air sebesar 6,016±0,190 mg GE/gram dan pada fraksi butanol sebesar 6,880±0,129 mg GE/gram. Kadar total fenolik pada fraksi air sebesar 137,368±2,321 mg GE/gram dan pada fraksi butanol sebesar 103,146±2,219 mg GE/gram.

2.3 Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder Rimpang Jeringau

Menggunakan Metode Ultrasonik

Ekstraksi merupakan metode pemisahan zat berdasarkan sifat kelarutannya. Tujuan dilakukannya ekstraksi untuk mengambil senyawa kimia yang terkandung dalam sampel (Marjoni, 2016). Ekstraksi menggunakan prinsip like dissolve like dimana kelarutan berdasarkan perbedaan kepolaran yakni senyawa yang bersifat polar akan tertarik dalam pelarut polar dan senyawa non-polar akan tertarik dalam pelarut non-polar (Harbone, 1987).

Metode ekstraksi sonikasi merupakan pengembangan dari metode maserasi yang memanfaatkan gelombang ultrasonik. Ekstraksi ultrasonik yang memanfaatkan energi akustik dimana energi mekanik akan ditransmisikan ke seluruh media dan tidak diserap oleh molekul. Gelombang ultrasonik akan ditransmisikan pada media melalui gelombang tekanan dengan menginduksi gerakan molekul secara bergantian meregangkan dan menekan struktur molekul (Mandal *et al.*, 2015). Teknik ekstraksi ultrasonik hanya membutuhkan waktu singkat, biaya yang lebih murah karena tidak membutuhkan banyak pelarut, ramah lingkungan dan lebih efisien (Tiwari dan Cullen, 2013). Media yang digunakan pada ekstraksi ultrasonik berupa media cairan yang akan digunakan sebagai rambatan untuk meningkatkan intensitas perpindahan energi sehingga ekstraksi berjalan maksimal (Torres *et al.*, 2017).

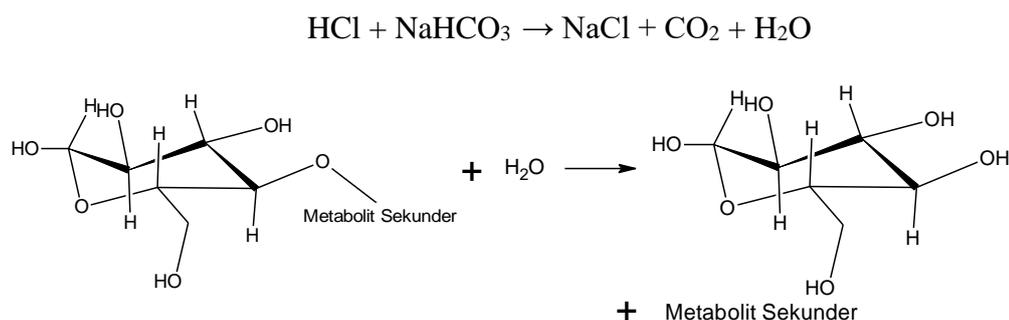
Pada penelitian kali ini digunakan metode *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE) yakni metode ekstraksi berbantu ultrasonik. Ekstraksi dilakukan dengan mengalirkan gelombang suara yang memiliki frekuensi >20 kHz yang mengalirkan gelombang secara langsung ke sampel melalui probe. Dinding sel

kemudian akan pecah akibat gerakan ultrasonik dan kandungan yang ada dalam sampel akan keluar (Sholihah et al., 2017). Gelombang ultrasonik akan meningkatkan penetrasi pelarut pada dinding sel sampel sehingga meningkatkan transfer massa. Hal ini membuat ekstraksi berjalan lebih cepat. Ekstraksi ultrasonik merupakan metode ekstraksi efisien dan efektif karena tidak menggunakan bantuan pemanasan sehingga cocok digunakan untuk ekstraksi senyawa aktif yang rata-rata tidak tahan dengan panas. Selain itu penggunaan ekstraksi ultrasonic dapat meningkatkan jumlah rendemen kasar, tidak membutuhkan banyak pelarut dan ekstraksi berjalan lebih cepat dibandingkan dengan metode konvensional atau termal (Handayani et al., 2016). Berikut perbandingan hasil ekstraksi rimpang Jeringau dengan beberapa variasi metode ditunjukkan pada Tabel 2.3.

2.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Rimpang Jeringau

Senyawa metabolit sekunder pada sampel umumnya memiliki ikatan glikosida (gugus gula). Sehingga perlu dilakukan hidrolisis untuk memecahkan senyawa aktif dengan gugus glikosidanya (Amalia et al., 2018). Hidrolisis merupakan tahap pemutusan ikatan glikosida dari senyawa organik yang tersusun dari glikon berupa ikatan glikosida (gula) dan aglikon yang merupakan senyawa yang dituju (bukan gula) (Gunawan, 2008). Pada reaksi hidrolisis diperlukan adanya katalisator (agen penghidrolisis). HCl merupakan asam kuat yang paling umum digunakan sebagai katalisator akan memberikan suasana asam pada larutan sehingga ion H^+ mudah larut di dalam air. Banyaknya ion H^+ yang terionisasi dalam air mengindikasikan bahwa semakin kuat pemutusan ikatan glikosidanya

(Handoko, 2006). Hidrolisis dilakukan menggunakan asam HCl 2N sebagai katalis. Asam klorida merupakan asam kuat sehingga lebih mudah melepas ion H^+ dalam air. Karena itu akan mempercepat reaksi pemutusan ikatan glikosida menjadi glikon (polar) dan aglikonnya (non polar) (Anggraeni et al., 2014). Pada reaksi pemutusan ikatan glikosida menggunakan HCl bersifat *reversible* sehingga perlu dihentikan agar tidak kembali membentuk ikatan glikosidanya. Untuk menghentikan reaksi maka ditambahkan natrium bikarbonat ($NaHCO_3$) sampai pH netral. Penetralan HCl dengan natrium bikarbonat akan menghasilkan garam NaCl dan gas karbondioksida (CO_2) yang ditandai dengan adanya busa pada saat ditetesi $NaHCO_3$. Dilakukan penetralan menggunakan $NaHCO_3$ karena hasil produk samping reaksi yang tidak berbahaya yakni NaCl (Fasya et al., 2016). Adapun dugaan terjadinya reaksi hidrolisis dengan menggunakan katalis HCl disajikan pada Gambar 2.3



Gambar 2.3 Dugaan reaksi hidrolisis menggunakan katalis HCl

Penggunaan HCl sebagai katalisator dan $NaHCO_3$ sebagai penetralan dikarenakan reaksi tersebut akan menghasilkan garam NaCl dan tidak berbahaya (Nihati et al., 2008). Hidrolisat selanjutnya dipartisi. Partisi menggunakan corong pisah dengan teknik ekstraksi cair-cair. Sampel dipartisi menggunakan pelarut yang memiliki fasa berbeda sehingga tidak saling campur. Fasa yang digunakan

biasanya fase air dan fase pelarut organik seperti dietil eter atau kloroform. Kedua fasa tersebut tidak saling campur sehingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan bawah memiliki massa jenis lebih besar dari lapisan atas (Harvey, 2000). Partisi menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda agar senyawa target dapat terekstrak sempurna pada pelarut yang sesuai. Fasa organik akan mengekstrak senyawa metabolit sekunder berupa aglikonnya sedangkan fasa air akan mengekstrak senyawa komponen gula atau glikonnya (Fasya *et al.*, 2016).

2.5 Senyawa Metabolit Sekunder Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa hasil metabolisme tumbuhan yang tidak penting peranannya bagi tumbuhan tersebut namun memiliki banyak manfaat bagi makhluk hidup. Sebelum dilakukannya uji lanjut, perlu dilakukan skrining kandungan senyawa metabolit sekunder pada sampel dengan untuk mengetahui adanya senyawa aktif yang terkandung. Uji fitokimia menggunakan pereaksi-pereaksi yang sesuai untuk membentuk kompleks dengan senyawa metabolit sekunder yang terkandung. Positif adanya senyawa aktif ditandai dengan adanya perubahan warna pada saat direaksikan. Kandungan senyawa metabolit tersebut yang akan digunakan untuk uji karena memiliki banyak manfaat. Rimpang Jeringau memiliki banyak aktivitas karena mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder. Beberapa penelitian terdahulu melaporkan adanya jenis senyawa metabolit sekunder pada sampel Jeringau yang ditunjukkan pada Tabel 2.3.

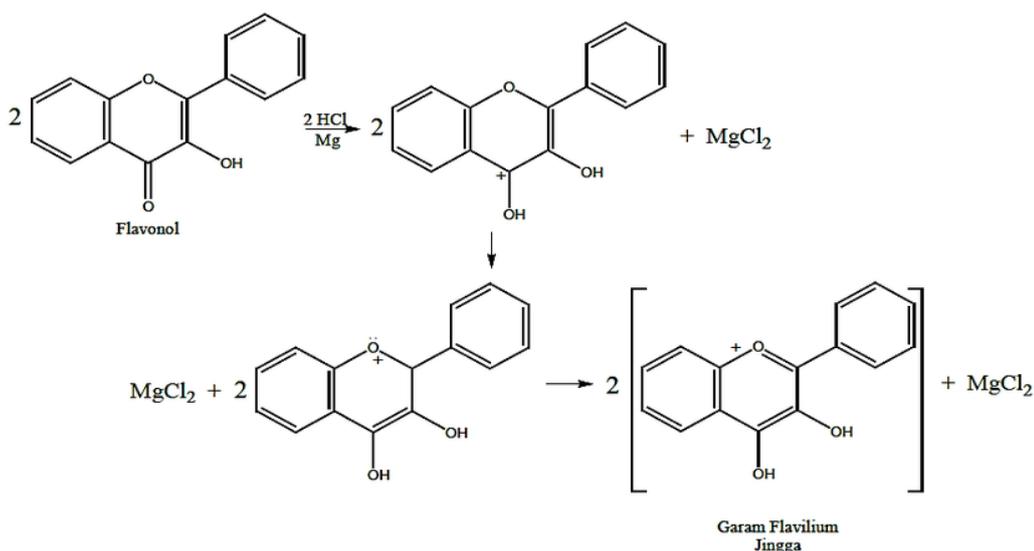
Tabel 2.3 Hasil penelitian terdahulu terkait kandungan senyawa metabolit sekunder pada rimpang Jeringau

No	Nama Penulis	Judul Jurnal	Pelarut Ekstraksi	Hasil Penelitian
1	Mamta Saxena dan Saxena Jyoti, 2012	Phytochemical Screening of <i>Acorus calamus</i> and <i>Lantana Camara</i>	Metanol	Alkaloid, flavonoid, komponen fenolik, tanin, glikosida, asam amino, protein, steroid, karbohidrat dan saponin
2	Febrianti <i>et al.</i> , 2021	Uji Aktivitas Anti Mikroorganisme Ekstrak Rimpang (<i>Acorus calamus</i> L) Terhadap Jamur <i>Candida albicans</i> dan Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	Etanol	Flavonoid, polifenol, alkaloid, saponin dan triterponoid
3	Wulandari <i>et al.</i> , 2015	Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Rimpang Jeringau merah (<i>Acorus calamus</i> Linn.) Terhadap Pertumbuhan <i>Shigella flexneri</i> Secara In Vitro	Metanol	Alkaloid, terpenoid, saponin dan tanin.
4	Masduqi & Rahardhian, 2021	Determinasi Total Flavonoid Dan Total Fenolik Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus</i> L.) Dengan Perbedaan Konsentrasi Pelarut	Etanol	Flavonoid, tanin, saponin dan triterpenoid

2.5.1 Uji Fitokimia Senyawa Flavonoid

Uji fitokimia flavonoid digunakan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa flavonoid pada sampel dengan menambahkan HCl pekat dan serbuk Mg. Penambahan HCl dilakukan agar sampel terhidrolisis sehingga akan memutuskan aglikon dari glikosidanya. Flavonoid merupakan senyawa yang memiliki 2 cincin

aromatik dengan gugus hidroksil yang lebih dari satu. Selain itu, HCl dapat mengakibatkan terjadinya reaksi redoks (reduksi oksidasi) antara logam Mg yang bertindak sebagai pereduksi dengan senyawa flavonoid. HCl dan serbuk Mg mereduksi inti benzopiron sehingga menyebabkan terjadinya pembentukan garam flavilium yang berwarna jingga atau merah (Suharyanto dan Prima, 2020). Apabila terjadi perubahan warna menjadi merah sampai jingga maka sampel/fraksi tersebut positif mengandung senyawa flavon, sedang apabila sampel berubah menjadi merah bata maka positif mengandung flavonol dan flavanon. Dugaan terjadinya reaksi flavonoid dengan logam Mg dan HCl disajikan pada Gambar 2.4

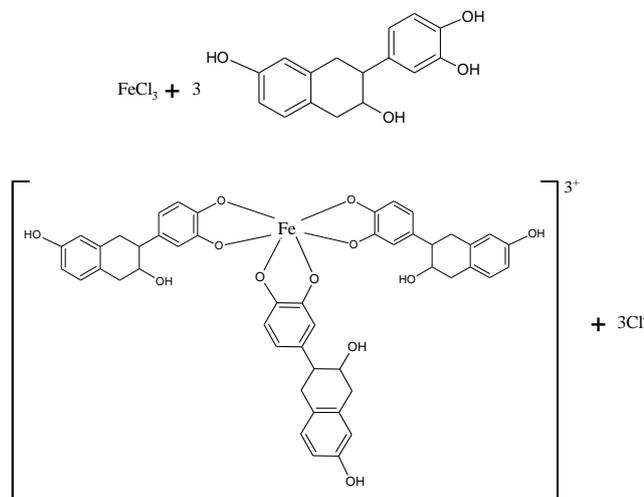


Gambar 2.4 Reaksi flavonoid dengan logam Mg dan HCl (Septyangsih, 2010)

2.5.2 Uji Fitokimia Senyawa Tanin

Uji tanin dilakukan dengan menambahkan FeCl₃ pada sampel. Tanin merupakan senyawa yang bersifat polar karena memiliki gugus OH. Penambahan FeCl₃ menyebabkan terjadinya pembentukan senyawa kompleks tanin dan Fe³⁺.

Tanin ketika ditambahkan FeCl_3 akan membentuk kompleks logam Fe^{3+} . Hal ini terjadi karena adanya ikatan kovalen koordinasi antara ion logam dengan atom nonlogam (Effendy, 2007).

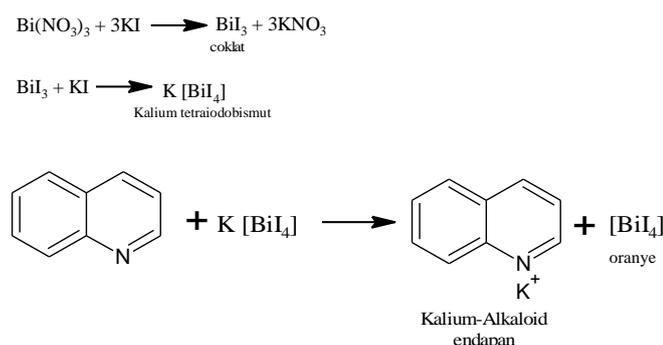


Gambar 2.5 Dugaan reaksi tanin dan FeCl_3 (Manongko *et al.*, 2020)

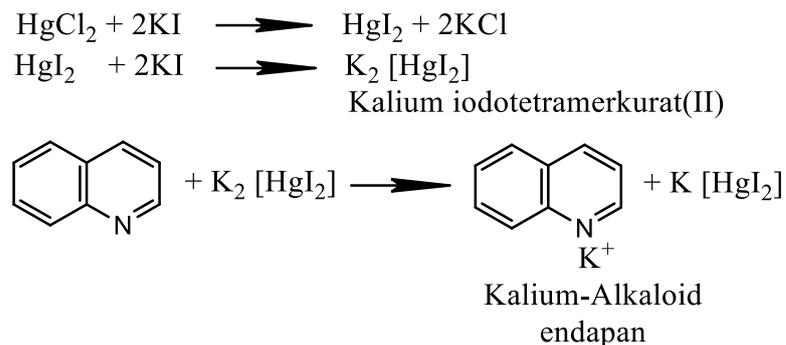
Tanin memiliki atom O yang mempunyai pasangan elektron bebas (PEB) dan dapat mengkoordinasikan ke atom pusat dan FeCl_3 memiliki atom pusat Fe^{3+} . Atom pusat Fe^{3+} akan mengikat 3 tanin yang mempunyai 2 atom donor yakni atom O pada posisi 4' dan 5' dihidroksi, sehingga terdapat 6 pasang elektron bebas yang akan berkoordinasi dengan atom pusat. Posisi 4' dan 5' pada atom O dihidroksi mempunyai energi yang rendah pada pembentukan senyawa kompleks yang memungkinkan menjadi ligan (Sa'adah, 2010). Tanin dibagi menjadi 2 yakni tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Penambahan FeCl_3 akan menyebabkan perubahan warna pada larutan uji. Perubahan warna menjadi biru kehitaman menunjukkan adanya tanin terhidrolisis sedangkan perubahan menjadi hijau kehitaman mengindikasikan adanya tanin terkondensasi (Sangi *et al.*, 2008). Dugaan terjadinya reaksi tanin disajikan pada Gambar 2.5.

2.5.3 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid

Pada uji alkaloid menggunakan prinsip reaksi pengendapan akibat pergantian ligan. Atom nitrogen pada alkaloid memiliki pasangan elektron bebas (PEB) dapat mengganti ion iodo pada pereaksi-pereaksi. Pereaksi *dragendorff* mengandung kalium iodida dan bismut nitrat (kalium tetraiodobismutat(III)) dalam larutan asam asetat glasial dan pereaksi *mayer* mengandung kalium iodida dan merkuri klorida (kalium tetra iodomerkurat(III)). Senyawa alkaloid akan bereaksi dengan reagen *dragendorff* akan menghasilkan warna jingga hingga merah kecoklatan. Hal ini dikarenakan terjadinya pergantian ligan pada nitrogen yang memiliki pasangan elektron bebas akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ dari kalium tetraiodobismutat menghasilkan kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Haryati *et al.*, 2015). Sedang pada reagen *mayer* akan terbentuk endapan putih kompleks kalium-alkaloid. Pada uji *mayer* diperkirakan nitrogen dalam alkaloid yang mempunyai PEB bereaksi dengan ion logam K^+ dari kompleks tetraiodomercurat(III) sehingga terjadinya reaksi kompleks kalium-alkaloid (Ergina *et al.*, 2014). Dugaan terjadinya reaksi uji *dragendorff* dan uji *mayer* pada Gambar 2.6 dan 2.7.



Gambar 2.6 Dugaan reaksi uji *dragendorff* (Ergina *et al.*, 2014)

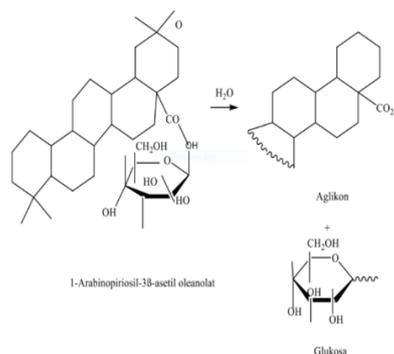


Gambar 2.7 Dugaan reaksi uji Mayer (Marliana *et al.*, 2005)

2.5.4 Uji Fitokimia Senyawa Saponin

Saponin memiliki gugus polar dan non polar. Gugus polar saponin merupakan gugus glikosil sedangkan non polar berupa terpenoid. Saponin bersifat aktif permukaan sehingga membentuk misel saat dikocok dengan air. Struktur misel dari gugus polar saponin menghadap keluar, sedang pada gugus non-polar menghadap ke dalam yang tampak seperti busa (Sangi *et al.*, 2008). Pada uji fitokimia senyawa saponin, dilakukan pengocokan sampel dengan air. Senyawa saponin akan membentuk busa jika dilakukan pengocokan dengan air dan memiliki sifat aktif pada permukaan (Kristanti *et al.*, 2008). Busa yang timbul akibat pengocokan dengan air dikarenakan adanya glikosida pada sampel sehingga terbentuk busa akibat dari hidrolisis yang akan membentuk glukosa dan senyawa lainnya (Marliana *et al.*, 2005). Busa yang timbul juga akibat dari senyawa saponin yang memiliki sifat polar larut dalam air (bersifat hidrofobik) dan sifat non-polar (hidrofobik) yang berperan sebagai surfaktan sehingga dapat menurunkan tegangan pada permukaan. Pada uji fitokimia saponin

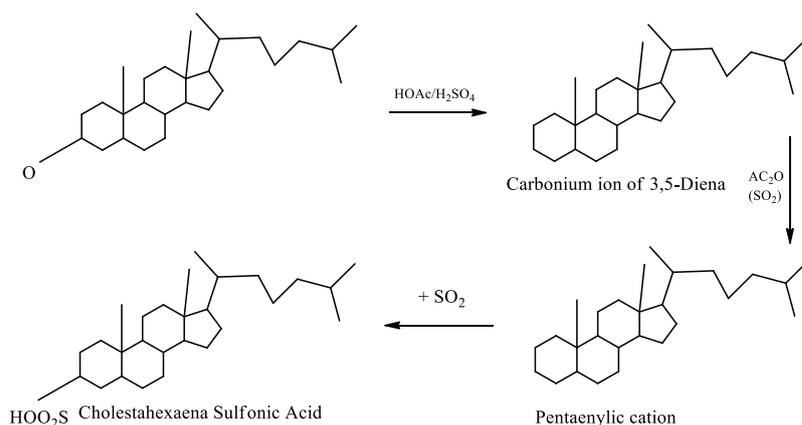
ditambahkan HCl (Harborne, 1987). Dugaan reaksi hidrolisis senyawa saponin dalam air pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Dugaan reaksi uji saponin (Darmawan, 2012)

2.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Terpenoid

Uji terpenoid dilakukan untuk mengetahui jenis steroid atau triterpenoid dalam sampel. Uji terpenoid dilakukan dengan metode *Liebermann-Bouchard*. Sampel dilarutkan dalam kloroform dengan ditambahkan pereaksi *Liebermann-Bouchard* (asam asetat anhidrat- H_2SO_4). Apabila terjadi perubahan warna menjadi merah-ungu maka sampel positif mengandung triterpenoid, sedang pada steroid ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau-biru. Hal ini didasari karena kemampuan senyawa steroid membentuk warna dengan H_2SO_4 dalam pelarut asam asetat anhidrat. Perubahan warna terjadi karena adanya perbedaan gugus pada atom C-4 (Marliana dan Saleh, 2011). Perubahan warna pada uji fitokimia terpenoid ini terjadi karena adanya reaksi oksidasi pada golongan senyawa terpenoid pada pembentukan senyawa pentaenilik (ikatan rangkap)(Sriwahyuni, 2010). Dugaan terjadinya reaksi uji fitokimia terpenoid pada Gambar 2.9



Gambar 2.9 Dugaan reaksi uji terpenoid (Habibi *et al.*, 2018)

2.6 Metode Pemisahan Kromatografi Kolom

Teknik pemisahan kromatografi kolom merupakan teknik pemisahan senyawa campuran berdasarkan perbedaan distribusi komponennya. Kromatografi kolom memiliki metode pemisahan yang sama seperti KLT namun pada kolom dapat memisahkan senyawa dalam jumlah besar. Prinsip kerja kromatografi kolom berdasarkan alokasi kelarutan serta daya absorpsi dari fase diam yakni adsorben dan fase gerak yakni eluen. Pada kromatografi terdiri dari 2 fase, yakni fase gerak dan fase diam. Fase diam bertindak sebagai adsorben yang akan melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak. Fase gerak yakni larutan yang bertindak sebagai pembawa pelarut yang memiliki kepolaran yang sama. Penelitian terdahulu mengenai isolasi rimpang jeringau ditunjukkan pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Penelitian terdahulu isolasi senyawa flavonoid menggunakan kolom

No	Nama Penulis	Judul Jurnal	Hasil Penelitian
1	Saman <i>et al.</i> , 2013	Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Rimpang Jeringau	Hasil kromatografi kolom dengan eluen etil asetat:metanol (8,5:1,5). Didapat 59 fraksi dimana diambil fraksi ke 38-40 yang diduga senyawa flavonoid.
2	Muhridja <i>et al.</i> , 2016	Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Repellent Nyamuk dari Ekstrak Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus</i>)	Hasil KLT menunjukkan eluen tepat pada pemisahan kolom yakni n-heksana:etil asetat (7:3). Didapatkan 49 fraksi dari pemisahan kolom. Pelarut yang digunakan menggunakan elusi bergradien n-heksana 100%, n-heksana:etil asetat (7:3), n-heksana:etil asetat (6:4), etil asetat:metanol (7:3), etil 100%, etil asetat:metanol (6:4), metanol:etil asetat (6:4), dan metanol 100%. Hasil identifikasi FT-IR isolat murni menunjukkan positif senyawa flavonoid.
3	Fauziyah <i>et al.</i> , 2017	Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Terhadap Mortalitas Kutu Beras dari Ekstrak Etil asetat Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus L.</i>)	Pemisahan menggunakan fase diam silika gel GF60. hasil KLT menunjukkan eluen terbaik menggunakan n-heksana:etil asetat (8:2).

Awalnya kromatografi kolom dimanfaatkan untuk memisahkan campuran dan mengambil zat murni secara preparatif. Namun semakin berkembangnya, kromatografi kolom mulai dimanfaatkan untuk memisahkan zat dengan penentuan kuantitatif, memisahkan pelarut organik dari senyawa yang mengadsorpsi lemak bahkan digunakan untuk pemisahan diastereomer dan rasemant (Zenta, 1999). Pada pelarut yang digunakan, semakin polar maka akan semakin cepat komponen terelusi meninggalkan kolom. Pelarut polar dapat digunakan pada pemisahan

senyawa-senyawa dengan polaritas rendah secara optimum. Maka komponen non polar dalam campuran tidak akan terelusi. Pemisahan akan berjalan secara optimum menggunakan pelarut yang mulai dari yang memiliki polaritas rendah ke tinggi sehingga komponen polar dalam campuran tidak terelusi. Pemisahan optimum dapat dilakukan juga dengan teknik pemisahan bergradien dimana ada dua atau lebih campuran pelarut elusi dilakukan dari pelarut yang memiliki kepolaran rendah ke pelarut yang memiliki kepolaran tinggi (Sastrohamidjojo, 1985). Penelitian terdahulu isolasi senyawa flavonoid menggunakan kolom dirangkum pada tabel 2.4.

2.7 Skrining Pemisahan Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik

Salah satu metode pemisahan yang dapat digunakan pada pelarut organik yakni kromatografi lapis. Teknik pemisahan kromatografi lapis tipis paling umum dan sering digunakan pada pemisahan senyawa karena dapat melakukan pemisahan analisis secara kualitatif, kuantitatif dan preparatif. Kromatografi lapis tipis (KLT) biasanya dimanfaatkan untuk memisahkan senyawa berdasarkan kecepatan perambatan komponen pada media tertentu. KLT dapat juga digunakan untuk mengidentifikasi ketidakmurnian senyawa hasil pemisahan. Teknik pemisahan menggunakan fase gerak (eluen) dan fase diam (adsorben). Fase gerak dipilih berdasarkan tingkat kepolaran senyawa (polaritas terhadap senyawa), sehingga jarak yang ditempuh akan menghasilkan perbandingan faktor retensi (R_f) sebanding.

Fase diam yang digunakan dalam KLT untuk menahan senyawa dapat berupa silika gel, aluminium oksida, poliamida dan selulosa beserta turunannya.

Silika gel paling sering dimanfaatkan sebagai fase diam (Stahl, 1985). Senyawa polar biasanya digunakan sebagai fase gerak. Fase gerak terdiri dari campuran senyawa yang memiliki perbedaan kepolaran. Eluen bergradien akan lebih maksimal dalam memisahkan senyawa. Pemilihan pelarut menggunakan pendekatan polaritas, dimana senyawa yang bersifat polar akan terelusi pada fase gerak polar dan senyawa bersifat non polar akan lebih mudah terelusi pada fase gerak non polar.

2.8 Identifikasi Gugus Fungsi Senyawa Menggunakan Spektrofotometer

FT-IR

Spektrofotometer Fourier Transform Infrared (FTIR) termasuk salah satu teknik analisis yang digunakan untuk mengidentifikasi struktur molekul suatu senyawa pada sampel. Komponen utama dari spektrofotometer ini adalah inframerah Michelson yang berfungsi sebagai pendispersi radiasi inframerah menjadi komponen-komponen frekuensi (Sankari 2010). Spektrofotometer mengidentifikasi gugus fungsi dari senyawa menggunakan perbedaan momen dipol yang menghasilkan vibrasi molekul (Rohman, 2007). Spektrofotometer FTIR mengidentifikasi senyawa pada rentang $0.75 - 1.000 \mu\text{m}$ atau pada bilangan gelombang $13.000 - 10 \text{ cm}^{-1}$. Komponen listrik banyak berperan pada spektroskopi, umumnya seperti terjadinya fenomena transmisi, pemantulan, pembiasan, dan penyerapan. Adanya gelombang elektromagnetik menyebabkan terjadinya eksitasi pada molekul berupa eksitasi elektronik, rotasi, dan vibrasi (Yudhapratama, 2010).

Prinsip kerja spektrofotometer FTIR yakni sinar datang (inframerah) mengenai sampel. Sinar kemudian ditransmisikan dari sampel dan akan diperoleh gelombang interferens yang ditampilkan pada detector. Gelombang yang tertangkap detektor akan diubah menjadi sinyal, diperkuat oleh penguat dan diubah menjadi sinyal digital (Khopkar, 2008). Kelebihan dari FTIR yakni sensitivitas dan resolusinya tinggi, membutuhkan waktu yang cepat (Williams dan Fleming, 2008), dapat mengidentifikasi sampel pada berbagai fasa (Gas, padat atau cair) dan dapat memberikan informasi mengenai struktur senyawa yang diinginkan. Sedangkan kelemahan dari FTIR yakni pada saat identifikasi harus ada penunjang dari instrumen lain (Sankari, 2010).

2.9 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan UV-Vis

Spektroskopi UV-Vis merupakan salah satu jenis spektroskopi yang digunakan untuk pengukuran serapan cahaya pada daerah ultraviolet (200-350 nm) serta sinar tampak pada daerah (350-800 nm). Identifikasi senyawa menggunakan spektroskopi UV-Vis pada hasil fraksi ekstrak etanol rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) digunakan untuk mengetahui panjang gelombang maksimalnya. Nilai panjang gelombang maksimal yang terdapat pada sampel ekstrak akan diidentifikasi transisi elektron yang terjadi di dalam sampel akibat cahaya yang ditembakkan pada sampel. Spektroskopi UV-Vis bekerja menggunakan prinsip berdasarkan transisi tingkat energi dari rendah ke tinggi atau dinamakan eksitasi akibat penyerapan sinar UV-Vis oleh molekul. Transisi tersebut dapat dibedakan menjadi 2 yaitu transisi antar orbital anti ikatan (anti bonding) dan ikatan (bonding). Berdasarkan transisi tersebut kita dapat

mengetahui perbedaan energi antara orbital yang sama dengan panjang gelombang yang diserap detektor (Panji, 2012). Penyerapan tersebut akan diubah menjadi sebuah data spektra yang akan digunakan identifikasi gugus kromofor yang terdapat pada sampel (Hendayana, 2006).

2.10 Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid Terhadap Bakteri

Staphylococcus aureus.

Antibakteri merupakan senyawa atau obat yang dapat digunakan untuk menghambat atau membunuh bakteri yang merugikan. Pertumbuhan bakteri harus dikendalikan untuk mencegah terjadinya penyakit dan infeksi. Antibakteri termasuk dalam golongan antimikroba yang digolongkan berdasarkan cara kerja, spektrum kerja, dan daya bunuh terhadap bakteri (Annisa, 2017). Senyawa dapat dikategorikan sebagai antibakteri apabila memiliki toksisitas selektif, yakni yang berbahaya bagi bakteri parasit namun tidak berbahaya pada inangnya (Xia *et al.*, 2010).

Berdasarkan cara kerjanya (Dzen dan Sjoekoer, 2003), terdapat 2 jenis bakteri yakni:

1. **Bakterisidal** (membunuh bakteri tetapi tidak menyebabkan sel lisis atau pecah. Hal ini dibuktikan dengan masih adanya jumlah sel total tetap, namun jumlah sel hidup berkurang).
2. **Bakteriostatik** (Menghambat pertumbuhan bakteri dengan menghambat sintesis protein atau mengikat ribosom. Dimana jumlah sel hidup dan mati tetap).

Pada spektrum kerja, antibakteri dibagi menjadi 3 (Agustrina, 2011), yakni: spektrum luas (apabila aktif melawan zat prokariotik), spektrum sempit (aktif melawan bakteri gram positif dan negatif), dan spektrum terbatas (hanya dapat melawan bakteri tertentu). Aktivitas antibakteri dikategorikan berdasarkan zona hambat yang terbentuk menurut Davis dan Stout (2009) dimana apabila zona hambat yang terbentuk < 5 mm maka tergolong lemah. 5-10 mm tergolong sedang, 10-20 mm tergolong kuat dan > 20 mm tergolong sangat kuat.

Dalam al-Qur'an surah Al-Baqarah ayat 26, Allah SWT berfirman:

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۗ فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ ۗ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا ۗ يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا ۗ وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ

Artinya : *“Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, mereka tahu bahwa itu kebenaran dari Tuhan. Tetapi mereka yang kafir berkata, “Apa maksud Allah dengan perumpamaan ini?” Dengan (perumpamaan) itu banyak orang yang dibiarkan-Nya sesat, dan dengan itu banyak (pula) orang yang diberi-Nya petunjuk. Tetapi tidak ada yang Dia sesatkan dengan (perumpamaan) itu selain orang-orang fasik.”*

Dalam tafsir Al-Mishbah jilid 1 karya Quraish Shihab (1999) Allah tidak meninggalkan memberi perumpamaan walau perumpamaan itu berupa ba'udhah. Ba 'dbab dalam Tafsir al-Jaldlain diartikan sebagai bentuk tunggal dari kata ba'udh, yakni kutuyang kecil. Kutu dimaksud, dijelaskan dalam Hasyiat al-Jamal 'ala al-Jalalain sebagai “binatang yang sangat kecil, menggigit dengan menyakitkan, dan berbau sangat busuk (semacam kutu busuk). Memang (tulisnya lebih jauh) kata yang digunakan al-Qur'an itu dapat juga berarti nyamuk, tetapi bukan itu yang dimaksud di sini. Lebih jauh al-jamal mengutip dari Tafsir al-

Khazin bahwa kutu itu sangat kecil, berkaki enam dan bersayap empat, berekor dan berbelalai. Kendati kecil, belalainya dapat menembus kulit gajah, kerbau dan unta, serta menggigitnya sampai-sampai unta dapat mati akibat gigitannya itu. Begitupula dengan bakteri, dimana bakteri merupakan mikroorganisme yang tidak dapat dilihat mata manusia secara langsung. Allah SWT menciptakan bakteri yang tidak dapat dilihat oleh manusia secara langsung namun dapat memberikan dampak negatif bagi manusia yang telah terpapar.

2.10.1 Klasifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus termasuk dalam bakteri gram positif yang berbentuk bulat dan merupakan patogen utama pada manusia. Invasi lokal bakteri *S. aureus* berada pada kulit dan membran mukosa menjadi barrier yang baik. *S. aureus* merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan infeksi pada kulit, hidung, saluran pernafasan, dan saluran pencernaan (Chen, 2019). Bakteri *S. aureus* termasuk golongan bakteri gram positif yang sangat peka terhadap senyawa antibakteri dibandingkan bakteri gram negatif (Nugroho *et al.*, 2016).

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* menurut Garrity (2004) sebagai berikut :

Domain	: Bacteria
Divisi	: Firmicutes
Kelas	: Bacili
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus termasuk dalam golongan bakteri yang bersifat racun pada makanan. Strain tertentu pada bakteri *S. aureus* dapat menyebabkan penyakit yakni menghasilkan enterotoksin. Penularan oleh bakteri ini langsung nampak

dari luar tubuh, biasanya di dalam hidung atau berupa bisul-bisul (Ali, 2005). Infeksi dari bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki ciri kerusakan jaringan yang menimbulkan abses seperti nanah, luka mengalami nekrosis, kemudian pada sekitar pembuluh darah terdapat getah bening akibat terjadinya koagulasi fibrin, sehingga proses nekrosis dibatasi dinding (Paju *et al.*, 2013).

2.10.2 Macam-Macam Metode Uji Aktivitas Antibakteri Difusi Agar

Metode penentuan aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan dilusi. Metode yang paling sering dan umum digunakan adalah metode difusi. Faktor-faktor yang mempengaruhi metode difusi yakni (Wattimena *et al.*, 1981) pradifusi, komposisi media agar, ketebalan medium agar, kerapatan inokulum, suhu dan waktu inkubasi, dan pengaruh PH.

1. Metode Difusi Cakram (*paper disk*)

Metode ini dilakukan dengan meletakkan piringan yang berisi antibakteri agar berdifusi ke media agar (Pratiwi, 2008). Kertas cakram yang berfungsi sebagai penampung zat antibakteri diletakkan diatas permukaan media agar yang telah diinokulasikan bakteri uji. Hasil pengamatan berupa zona bening yang akan terbentuk di sekeliling kertas cakram. Hal itu menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Pelczar dan Chan, 1988).

2. Metode Parit (*Ditch-plate technique*)

Metode ini dilakukan dengan membuat media agar yang kemudian diinokulasikan bakteri uji. Dibuat goresan pada bagian tengah dengan bentuk membujur yang kemudian diisi zat antibakteri. Setelah itu dilakukan inkubasi

pada suhu optimum. Hasil pengamatan akan berupa terbentuknya zona bening disekitar parit (Bonang, 1992).

3. Metode Sumuran (*Hole*)

Metode sumuran ini hampir serupa dengan parit. Dimana media agar pada cawan petri yang telah diinokulasi bakteri uji diberi sumuran yang akan diisi dengan zat antibakteri kemudian diinkubasi pada suhu optimumnya (Pratiwi, 2008). Hasil dari penelitian berupa pengamatan ada tidaknya zona bening (zona hambatan) disekeliling sumuran (Bonang, 1992). Metode ini memiliki kelebihan dalam kemudahan dalam pengukuran zona bening yang terbentuk karena isolat tidak hanya beraktivitas di luar saja (Listari, 2009).

4. Metode *E-test* (epsilometer)

Metode ini merupakan gabungan dari metode difusi dan metode dilusi. Pada metode ini menggunakan strip plastic yang telah berisi agen antibakteri dengan konsentrasi dari terendah sampai tertinggi yang diletakkan pada media agar yang sudah diinokulasi bakteri uji. Hambatan bakteri dapat diamati dengan ada tidaknya zona bening yang terbentuk di sekitar area strip (Pratiwi, 2008).

2.10.3 Mekanisme Kerja Flavonoid Sebagai Antibakteri

Mekanisme antibakteri dibagi menjadi lima menurut Pratiwi (2008), yakni:

1. Merusak Sintesa Dinding Sel

Senyawa antibakteri akan merusak dinding sel dan mencegah terjadinya sintesis dinding sel. Hal ini menyebabkan tekanan osmotik dalam sel lebih tinggi daripada diluar sel. Sehingga menyebabkan terjadinya lisis

2. Merusak Membran Sel

Antibakteri akan merusak permeabilitas membran sitoplasma dan fungsi membran akan melemah. Sehingga komponen yang ada dalam sel bakteri akan keluar seperti protein, asam nukleat dan nukleotidanya.

3. Menghambat Sintesa Protein

Antibakteri ada yang termasuk dalam golongan spektrum luas, dimana bakteri dapat melawan zat prokariotik dan pada golongan bakterisidal sehingga akan menghambat proses sintesis protein.

4. Menghambat Sintesis Metabolit Sekunder

Antara lain karena adanya kompetitor seperti antimetabolite berupa substansi yang secara kompetitif akan menghambat metabolisme organisme karena memiliki struktur yang mirip dengan substrat normal enzim metabolisme.

5. Menghambat Sintesa Asam Nukleat

Berupa penghambatan pada transkripsi dan replikasi mikroorganisme. Bakteri akan mendenaturasi protein dan asam-asam nukleat yang menyebabkan kerusakan sel yang tidak dapat diperbaiki.

Senyawa flavonoid memiliki mekanisme kerja penghambat bakteri dengan merusak permeabilitas dinding sel bakteri yang menyebabkan bakteri akan mengeluarkan zat yang ada di dalamnya dan dapat menghambat motilitas bakteri (Darsana *et al.*, 2012). Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dan DNA bakteri (Haryati *et al.*, 2015).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada April-Agustus 2022 di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Biokimia, serta Laboratorium Layanan dan Instrumen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain baskom cuci, blender, ayakan 90 *mesh*, oven, loyang, alat ekstraksi ultrasonik, beker gelas, corong *buchner*, pompa vakum, *rotary evaporator*, cawan, desikator, seperangkat alat gelas, seperangkat kromatografi kolom, plat silika gel G 60 F₂₅₄, *chamber*, mikropipet, jarum ose, pipa kapiler, cawan petri, instrumen UV-Vis, dan FT-IR.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain rimpang Jeringau, etanol p.a (Merck), metanol, HCl, natrium bikarbonat, etil asetat (Merck), kuersetin, AlCl₃, natrium asetat, silika gel G60, n-heksana, *glasswool*, serbuk Mg, reagen dragedorff, reagen mayer, besi (III) klorida (FeCl₃), kloroform, H₂SO₄ pekat, KBr, agar NA, agar NB, kapas, aluminium foil, plastik wrap, NaCl 0,9%, DMSO, kertas *whatman* no 42, kloramfenikol, alkohol dan aquades.

3.3 Rancangan Penelitian

Sampel yang akan dianalisis pada penelitian ini yakni rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.). Rimpang Jeringau dibersihkan menggunakan air dan disortasi. Selanjutnya rimpang Jeringau dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 24 jam. Setelah itu sampel dihaluskan dan diayak dengan ukuran 90 *mesh*. Sampel diukur kadar airnya dan di ekstraksi dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode ultrasonik selama 30 menit. Ekstrak kasar yang diperoleh kemudian disaring dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat etanol 70% kemudian dihidrolisis dengan HCl 2N dan dipartisi dengan pelarut etil asetat. Setelah itu dilakukan skrining fitokimia kandungan senyawa metabolit sekunder flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan terpenoid pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat kemudian dimurnikan menggunakan kromatografi kolom dengan eluen n-heksana:etil asetat (7:3). Kemudian pada ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat diidentifikasi senyawa aktifnya menggunakan spektrofotometer FT-IR dan UV-Vis. Pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahap-tahap dalam penelitian yang dilakukan sebagai berikut :

1. Preparasi rimpang Jeringau
2. Penentuan kadar air pada simplisia rimpang Jeringau
3. Ekstraksi senyawa aktif dengan metode ultrasonik
4. Hidrolisis dan partisi ekstrak etanol 70%
5. Uji fitokimia ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat

6. Pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi kolom eluen n-heksana:etil asetat (7:3)
7. Identifikasi ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat menggunakan spektrofotometer FT-IR dan UV-Vis
8. Uji aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat

3.5 Metode Penelitian

3.5.1 Preparasi Rimpang Jeringau

Sampel tanaman Jeringau (*Acorus calamus* L.) dicuci bersih menggunakan air. Setelah itu, sampel dikeringkan dan disortasi. Dibuat potongan kecil-kecil agar memperluas permukaannya. Rimpang Jeringau dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Dilakukan sortasi kembali untuk menghilangkan kotoran yang masih tersisa. Simplisia kemudian disimpan pada wadah yang tertutup dan diletakkan ditempat sejuk yang terhindar dari cahaya matahari secara langsung (Wulandari *et al.*, 2015). Simplisia diblender (dihaluskan) kemudian diayak menggunakan ayakan 90 *mesh* hingga didapat bubuk rimpang Jeringau.

3.5.2 Analisis Kadar Air Rimpang Jeringau

Pada analisis kadar air digunakan metode oven kering. Cawan kosong dikeringkan pada suhu 105°C selama 1 jam. Setelah itu cawan didinginkan dalam desikator 20-30 menit sampai berat cawan konstan. 100 gram sampel dimasukkan dalam cawan dan ditimbang, sampel dikeringkan dalam oven selama 3 jam dengan suhu 50°C. Kemudian sampel didinginkan dalam desikator selama 20-30 menit dan ditimbang kembali. Cawan dimasukkan kembali dalam oven kembali

dan ditimbang setiap 15 menit sampai diperoleh berat yang konstan untuk memperoleh kadar air <10%. Kadar air dihitung dengan rumus (Amanto *et al.*, 2015)

$$\text{kadar air} = \frac{\text{berat awal sampel} - \text{berat sampel konstan}}{\text{berat awal sampel}} \times 100\%$$

3.5.3 Ekstraksi Senyawa Aktif Rimpang Jeringau dengan Ultrasonik

Ekstraksi rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) menggunakan pelarut etanol 70%. Sampel diekstraksi dilakukan menggunakan metode sonikasi. Simplisia rimpang Jeringau di ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan (1:10 b/v) selama 30 menit. Setelah itu, dipisahkan antara filtrat dan residunya. Hasil ekstraksi kemudian disaring menggunakan corong buchner yang dilengkapi pompa vakum (McGaw *et al.*, 2002). Filtrat kemudian diambil dan diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C dan kecepatan 60 rpm. Ekstrak pekat etanol 70% yang didapat kemudian disimpan di dalam kulkas.

3.5.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Rimpang Jeringau

Ekstrak kental etanol yang didapat kemudian dilakukan hidrolisis menggunakan HCl 2N dengan perbandingan (1:2 b/v). Setelah itu larutan di *stirrer* selama 1 jam menggunakan *hot plate stirrer*. Ekstrak ditambahkan natrium bikarbonat hingga didapat PH netral. Selanjutnya dilakukan partisi pada ekstrak menggunakan etil asetat dan air dengan perbandingan (1:1) akan terbentuk 2 lapisan larutan, fraksi air dan etil asetat. Partisi dilakukan berulang. Fraksi dipisahkan dan fraksi etil asetat dievaporasi pada suhu 40°C (Fauziah *et al.*, 2017).

3.5.5 Skrining Fitokimia Kandungan Ekstrak Rimpang Jeringau

3.5.5.1 Uji Fitokimia Senyawa Flavonoid

Ditambahkan 0,5 mL HCl 2 M pekat dan sedikit serbuk Mg. Apabila terjadi perubahan warna menjadi merah sampai jingga maka sampel/fraksi tersebut positif mengandung senyawa flavon, sedang apabila sampel berubah menjadi merah bata maka positif mengandung flavonol dan flavanon (Robinson, 1995).

3.5.5.2 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid

Pada uji alkaloid, dibagi menjadi 2 bagian. Sampel ditetesi HCL 2N kemudian dipanaskan dan dibiarkan dingin. Pada sampel pertama, akan diuji dengan ditetesi reagen dragendorf. Apabila terdapat endapan pada sampel yang berwarna jingga, maka positif mengandung alkaloid. Pada sampel kedua ditambahkan reagen mayer. Apabila terbentuk endapan putih maka positif mengandung alkaloid (Joshi *et al.*, 2013).

3.5.5.3 Uji Fitokimia Senyawa Saponin

Ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan air panas. Dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Apabila terbentuk busa, sekitar 1-10 cm tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang pada saat ditetesi 1 tetes HCl 2N maka positif mengandung saponin (Joshi *et al.*, 2013).

3.5.5.4 Uji Fitokimia Senyawa Tanin

Sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 3 tetes besi (III) klorida 5%. Apabila terjadi perubahan warna menjadi biru tua, maka menandakan sampel mengandung senyawa tanin (Wulandari *et al.*, 2015).

3.5.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Terpenoid

Diambil sampel sebanyak 1 mg kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform. Setelah itu ditambahkan reagen *Liebermann-Bouchard* dimasukkan dalam tabung reaksi. Sampel dikocok kemudian dilakukan pengamatan. Apabila sampel terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan 2 pelarut maka mengindikasikan sampel positif mengandung triterpenoid. Apabila cincin yang terbentuk berwarna hijau kebiruan maka sampel positif mengandung steroid (Halimah, 2010).

3.5.6 Pemisahan Menggunakan Kromatografi Kolom

Pemisahan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam berupa silika gel G60 (230-400 mesh) dan fase gerak. Pemilihan eluen dilakukan dengan monitoring pada pelarut 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) menggunakan KLTA. Plat silika gel F₂₅₄ diaktifkan dengan pemanasan dalam oven selama 10 menit pada suhu 100°C. Plat diberi batas tepi masing-masing satu meter dan bawah dan samping. Sebelumnya, masing-masing eluen dijenuhkan 20-30 menit di dalam *chamber* yang tertutup. Sampel fraksi etil asetat kemudian ditotolkan pada plat

dengan jarak 1 cm menggunakan pipa kapiler kemudian dikeringkan. Setelah itu dilakukan elusi dalam *chamber* dengan meletakkan plat silika setinggi 0,5 cm dari dasar plat. Elusi dilakukan sampai gerakan larutan mencapai tanda batas dan dihentikan. Noda yang terbentuk kemudian diperiksa dengan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Hayati *et al.*, 2020). Dihitung nilai faktor retensinya (R_f) dengan persamaan berikut (Kusmiyati *et al.*, 2011):

$$R_f = \frac{\text{Jarak senyawa yang terelusi}}{\text{jarak tempu pelarut}}$$

Selanjutnya hasil eluen terbaik digunakan sebagai eluen. Kolom diisi dengan glasswool pada bagian bawa. Sebanyak 10 gr silika gel diaktifkan menggunakan oven dengan suhu 110°C selama 2 jam. Dimasukkan silika gel ke dalam gelas beker dengan ditambahkan eluen kemudian diaduk sampai terbentuk seperti bubur (*slurry*). Pengadukkan dilakukan sampai homogen dan tidak terbentuk gelembung dan diisikan ke dalam kolom yang telah disiapkan. Selanjutnya sampel fraksi kental etil asetat dimasukkan ke dalam kolom dan dielusi dengan eluen terbaik hasil monitoring. Kran dibuka sedikit dan eluen ditampung (Kusmiyati *et al.*, 2016). Setelah itu dilakukan uji KLTA untuk mengetahui nilai R_f dan bentuk noda yang terbentuk.

3.5.7 Identifikasi Senyawa Flavonoid Menggunakan FTIR dan UV-Vis

Isolat flavonoid hasil pemisahan kolom selanjutnya akan diidentifikasi menggunakan FT-IR untuk mengetahui gugus fungsinya. Isolat digerus dengan KBr menggunakan *mortar agate* dan di press dengan tekanan 80 tor sampai terbentuk pelet. Pelet dimasukkan ke dalam spektrofotometer FT-IR kemudian

dianalisis gugus fungsinya pada spektra yang dihasilkan (Fasya *et al.*, 2016). Analisis sampel menggunakan spektrofotometer FTIR pada panjang gelombang 400-5.000 cm^{-1} .

Hasil yang diperoleh dari fraksi ekstrak rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) akan diidentifikasi menggunakan spektroskopi UV-Vis dengan ditambahkan 5 mL sampel dengan pelarut masing-masing. Kemudian dilakukan pengocokan menggunakan vortex hingga larut. Dimasukkan dalam kuvet dan diukur atau dianalisis menggunakan spektroskopi UV-Vis menggunakan panjang gelombang 200-800 nm (Pramitania, 2019).

3.5.8 Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Flavonoid Terhadap Bakteri

Staphylococcus aureus.

3.5.8.1 Sterilisasi Alat dan Bahan Menggunakan Autoklaf

Autoklaf merupakan alat pemanas tertutup yang digunakan untuk mensterilisasi bahan atau alat dengan metode uap suhu yang bertekanan. Sterilisasi bertujuan agar mikroorganisme yang ada pada benda tersebut mati (Safitri dan Sinta, 2010). Cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, dan alat serta bahan yang digunakan untuk uji aktivitas bakteri (kecuali alkohol) disterilisasi dalam autoklaf setelah sebelumnya dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus kertas selama 15 menit pada suhu 120°C dengan tekanan 1 atm (Pelczar, 2005).

3.5.8.2 Pembuatan Media NA dan NB

Pada pembuatan media NA sebanyak 2 gram agar NA dimasukkan erlenmeyer. Agar NA dilarutkan dengan menambahkan sebanyak 100 mL

aquades. Larutan dipanaskan hingga mendidih dengan diaduk hingga homogen. Selanjutnya tuang larutan agar NA ke dalam cawan petri dan ditutup. Media disterilisasikan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Larutan agar dibiarkan sampai memadat (Gazali *et al.*, 2016).

Pada pembuatan media cair (NB) dilakukan dengan melarutkan 0,8 g NB pada 100 mL aquades dalam gelas beker dan dipanaskan hingga mendidih. Gelas beker ditutup menggunakan kapas, dirapatkan dengan plastik wrap kemudian dibungkus dengan aluminium foil. Media kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

3.5.8.3 Peremajaan Bakteri Uji *Staphylococcus aureus*

Peremajaan bakteri uji menggunakan metode gores yang ditempatkan pada cawan petri. Diambil 1 ose bakteri biakan murni menggunakan jarum ose yang sebelumnya disterilkan. Bakteri diinokulasikan dalam media NA dengan cara digoreskan secara aseptik. Setelah itu cawan petri ditutup kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator (Yanti dan Mitika, 2017). Bakteri selanjutnya disimpan dalam kulkas untuk regenerasi dan akan dipanen setelah 24 jam. Diambil 1 ose bakteri biakan murni menggunakan jarum ose yang sebelumnya disterilkan. Bakteri diinokulasikan dalam 10 ml media cair NB pada tabung reaksi. Setelah itu ditutup kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam dalam inkubator.

3.5.8.4 Pengujian Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram

Metode selanjutnya yakni pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram (*paper disk*). Isolat flavonoid dibuat pada berbagai macam konsentrasi 20; 30; 40; 50; dan 60% dengan melarutkan pada pelarut DMSO (b/v). Dipanaskan media NA kemudian didinginkan hingga suhu 40°C. tuangkan media NA secukupnya ke dalam cawan petri yang telah disterilisasi. Ditambahkan 0,1 ml bakteri uji dari media NB kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Kertas cakram yang berdiameter 6 mm direndam dalam ekstrak isolat flavonoid dengan berbagai konsentrasi kemudian diletakkan di atas media inokulum selama 24 jam pada suhu 37°C. Diamati zona bening yang terbentuk di sekitar cakram dan diukur zona hambatnya. Diamati juga pada kontrol negatif menggunakan DMSO dan kontrol positif antibiotik kloramfenikol (Oktaviani *et al.*, 2019).

$$LZ = Lav - Ld \text{ (Simarmata, 2007)}$$

Dimana :

LZ = Diameter zona hambat (mm)

Lav = Diameter zona hambat dengan kertas saring (mm)

Ld = Diameter kertas saring (mm)

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi dan Partisi Senyawa Metabolit Sekunder Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Rimpang Jeringau 2,61 Kg dipreparasi dengan dicuci terlebih dahulu hingga bersih. Sampel yang dihaluskan akan memiliki permukaan yang luas sehingga interaksi pelarut dengan sampel semakin besar dan senyawa metabolit sekunder yang ada dalam sampel akan terekstrak secara optimal (Wendersteyt *et al.*, 2021). Selanjutnya sampel rimpang Jeringau dikeringkan sebelum diekstraksi. Pada proses ekstraksi, sampel kering akan lebih optimal mengekstrak senyawa aktif dibandingkan sampel yang masih segar. Hal ini disebabkan karena sampel basah masih memiliki banyak kandungan air yang menutup permukaan sampel (Megawati & Ulinuha, 2015). Pada proses preparasi didapatkan nilai rendemen sebesar 14,55%.

Setelah didapatkan serbuk halus rimpang Jeringau (simplisia), selanjutnya dilakukan analisis kadar air. Kadar air dalam sampel akan mempengaruhi proses pengambilan senyawa metabolit sekunder. Pada penentuan kadar air, digunakan suhu oven sebesar 105°C. Hal ini dikarenakan pada suhu 100°C merupakan titik didih air, sehingga diindikasikan bahwa semua air dalam sampel telah menguap (Wijaya & Noviana, 2022). Pada analisis kadar air rimpang Jeringau, didapatkan hasil sebesar 7,8%. Besarnya kadar air juga dapat mempengaruhi kualitas simplisia. Dimana kadar air yang tinggi akan memicu kontaminan seperti mikroba sehingga simplisia akan rusak. Kadar air yang ditetapkan untuk menjaga simplisia

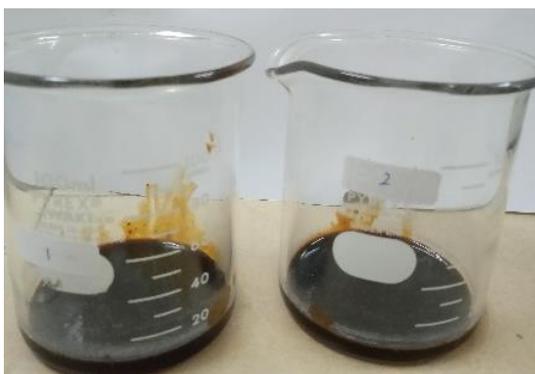
agar tetap baik yakni <10% (Wahyuni *et al.*, 2014). Selanjutnya simplisia diekstraksi dan dipartisi. Hasil rendemen ditunjukkan pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Rendemen hasil ekstraksi dan partisi rimpang Jeringau

No	Sampel	Berat (g)	Warna	Rendemen (%)
1	Ekstrak etanol 70%	30	Coklat kehitaman	18,73
2	Fraksi etil asetat	5	Coklat	10,80

Ekstraksi dilakukan dengan tujuan mengambil senyawa metabolit sekunder pada sampel untuk analisis selanjutnya. Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi menggunakan probe ultrasonik dengan getaran 25 kHz. Transduser (alat yang akan mengubah energi listrik menjadi gelombang) diikat ke probe yang kemudian ditenamkan dalam wadah yang berisi sampel sehingga akan mengirim gelombang secara langsung ke media yang akan diekstraksi (Aihua *et al.*, 2019). Pada penelitian kali ini, pelarut yang digunakan yakni etanol 70%. Etanol termasuk dalam pelarut polar universal yang umumnya memang digunakan untuk melarutkan senyawa metabolit sekunder dalam sampel dengan nilai konstanta dielektrik sebesar 25,16 (Nia *et al.*, 2010). Etanol memiliki 2 gugus fungsi yakni gugus alkil yang mengikat senyawa non polar dan gugus hidroksil yang mengikat senyawa polar (Poeloengan *et al.*, 2007). Senyawa metabolit sekunder biasanya masih memiliki gugus glikosida sehingga akan mudah tertarik dalam pelarut yang bersifat polar. Hasil rendemen pada ekstraksi sonikasi jarum sampel Jeringau pelarut etanol 70% sebesar 18,73%. Berdasarkan penelitian Fithrony (2021) yang melakukan ekstraksi Jeringau dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode sonikasi diperoleh rendemen sebesar 16,67% sedangkan pada penelitian Hasan

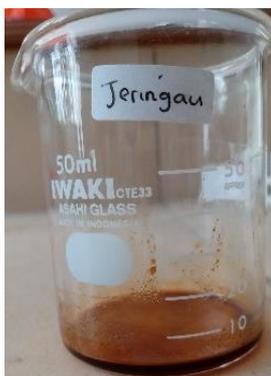
(2015) ekstrak Jeringau dengan pelarut etanol mengekstraksi menggunakan metode maserasi menghasilkan rendemen sebesar 7,8%. Hal itu menunjukkan bahwasannya ekstraksi sonikasi lebih efektif dalam mengekstrak senyawa aktif dalam rimpang Jeringau. Hasil ekstrak berupa larutan berwarna coklat kemudian diuapkan dan diperoleh filtrat berwarna coklat kehitaman. Adapun gambar ekstrak etanol 70% ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil Ekstraksi etanol 70% yang telah dipekatkan

Ekstrak pekat etanol 70% dihidrolisis dan dipartisi untuk senyawa metabolit dan memisahkan komponen gula (aglikon). Proses hidrolisis dilakukan untuk melepaskan ikatan glikosida dari senyawa metabolit sekundernya. Umumnya aglikon bersifat polar sehingga akan tertarik pada fasa airnya. Proses partisi dilakukan menggunakan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar dengan konstanta dielektrik sebesar 6,0 (Atisanto *et al.*, 2017). Setelah etil asetat ditambahkan, larutan kemudian dikocok dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan, yakni lapisan organik (atas) dan lapisan fasa air (bawah). Terbentuknya 2 lapisan tersebut disebabkan adanya perbedaan massa jenis keduanya, etil asetat memiliki massa jenis 0,66 g/mL sedangkan massa jenis air adalah 1 g/mL

(Suhaenah *et al.*, 2021). Tujuan dilakukannya partisi yakni untuk menggolongkan senyawa metabolit sekunder sesuai dengan kepolarannya (Anggraeni *et al.*, 2014). Selain itu, senyawa akan lebih murni dan aktivitasnya akan tinggi. Partisi menggunakan pelarut semi-polar seperti etil asetat, mampu mengekstrak flavonoid dengan kepolaran yang rendah seperti flavanon, flavonol, isoflavon, dan flavon metil. Proses partisi menghasilkan rendemen sebesar 10,80% seperti berwarna coklat yang ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Filtrat hasil partisi fraksi etil asetat

4.2 Skrining Fitokimia Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Rimpang

Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Uji fitokimia pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat dilakukan sebagai skrining awal kandungan senyawa metabolit sekunder yang ada pada sampel sebelum dilakukan analisis lebih lanjut. Proses skrining fitokimia dilakukan secara kualitatif dengan menambahkan pereaksi yang sesuai sehingga akan terjadi perubahan warna yang menunjukkan positif mengandung senyawa metabolit sekunder. Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya golongan

senyawa aktif meliputi flavonoid, tanin, alkaloid, terpenoid dan saponin. Hasil skrining fitokimia pada rimpang Jeringau dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol 70% dan Fraksi Etil Asetat

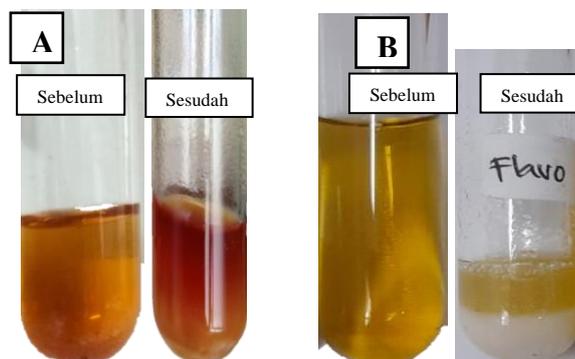
Senyawa Metabolit Sekunder	Hasil	
	Ekstrak Etanol 70%	Fraksi Etil Asetat
- Flavonoid	+	+
- Alkaloid		
a. Meyer	-	-
b. Dragendorff	-	-
- Tanin	+	+
- Saponin	-	-
- Steroid	-	-
- Terpenoid	+	-

Keterangan : (+) Terdapat senyawa, (-) Tidak terdapat senyawa

Pengujian kandungan flavonoid dalam rimpang Jeringau dilakukan pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat. Penambahan HCl dilakukan untuk menghidrolisis O-glikosil dari flavonoid sehingga terpisah dari glikonnya. Glikosil akan tergantikan oleh ion H^+ dari HCl karena sifatnya yang elektrofilik (Ikalinus *et al.*, 2015). Perubahan warna merah bata, kuning atau jingga, menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Inti benzopiron akan tereduksi akibat reaksi Mg dan HCl akan membentuk kompleks garam flavilium seperti reaksi yang ditunjukkan pada Gambar 2.4. Pada saat penambahan serbuk Mg setelah sebelumnya ditambahkan HCl, akan terbentuk gelembung gas H_2 (Illing *et al.*, 2017) dan terbentuk garam flavilium.

Berdasarkan hasil uji fitokimia yang dapat dilihat pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat positif mengandung flavonoid. Dimana warna ekstrak etanol berubah dari coklat menjadi jingga sedangkan pada fraksi etil asetat terjadi perubahan warna dari coklat pudar menjadi kuning. Menurut Setyawaty *et al.* (2020) adanya flavonoid pada sampel

ditandai dengan perubahan warna menjadi merah, jingga atau kuning. Hasil uji flavonoid ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat ditunjukkan pada Gambar 4.3.

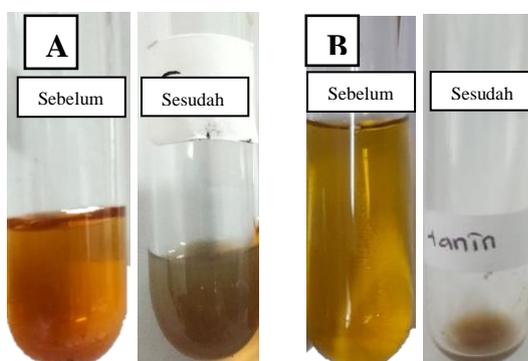


Gambar 4.3 Hasil uji fitokimia flavonoid sebelum dan sesudah diberikan pereaksi (a) ekstrak etanol 70% (b) fraksi etil asetat

Hasil positif flavonoid pada ekstrak etanol 70% disebabkan karena flavonoid yang merupakan senyawa golongan fenol memiliki gugus OH dengan perbedaan keelektronegatifan tinggi sehingga bersifat polar. Dalam hal ini pelarut etanol yang juga bersifat polar cocok digunakan untuk ekstraksi flavonoid. Senyawa polar akan mudah mengekstrak senyawa polar dalam sampel karena memiliki gugus hidroksil yang akan membentuk ikatan hidrogen (Sriwahyuni, 2010). Ekstraksi rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) menunjukkan positif mengandung flavonoid (Febrianti *et al.*, 2021; Muhridja *et al.*, 2016; Masduqi dan Rahadhian, 2021). Pada fraksi etil asetat menunjukkan positif flavonoid. Karena ikatan glikosida pada flavonoid telah lepas sehingga aglikon flavonoid umumnya lebih terekstrak dalam pelarut etil asetat (Muhridja *et al.*, 2016).

Pada uji fitokimia tanin ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat ditambahkan FeCl_3 terjadi perubahan warna dari coklat menjadi hijau kehitaman. Menurut Santi *et al.*, (2008) adanya senyawa tanin ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kehitaman maka sampel positif mengandung tanin

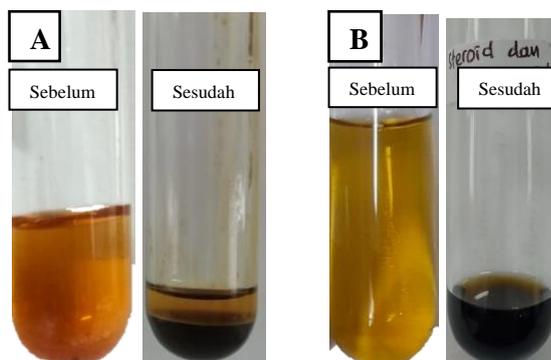
terkondensasi. Tanin terkondensasi merupakan tanin golongan fenol yang terdiri dari jenis flavonoid (flavan-3-ol) yang dihubungkan oleh ikatan-ikatan hidrogen. Tanin terkondensasi dapat menghasilkan asam klorida namun tidak dapat dihidrolisis. Nama lain dari tanin terkondensasi adalah Proanthocyanidin yang merupakan polimer flavonoid yang dihubungkan antara C₄ dan C₈. Tanin termasuk dalam senyawa golongan polar yang memiliki gugus OH, sehingga ketika ditambahkan FeCl₃ akan terjadi perubahan warna menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman (Robinson, 1991) sesuai dengan reaksi yang ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 4.4 Hasil uji fitokimia tanin sebelum dan sesudah diberikan pereaksi (a) ekstrak etanol 70% (b) fraksi etil asetat

Pada penelitian kali ini, ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat menunjukkan positif mengandung tanin. Hal ini menunjukkan bahwa adanya gugus OH pada ekstrak etanol 70% maupun fraksi etil asetat. Hasil uji tanin ditunjukkan pada Gambar 4.4. Beberapa penelitian lain juga menunjukkan bahwa ekstraksi rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) menunjukkan positif mengandung tanin (Febrianti *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2014; Masduqi dan Rahadhian, 2021).

Uji fitokimia senyawa terpenoid pada ekstrak etanol 70% menunjukkan hasil positif jenis triterpenoid yang ditandai dengan terbentuknya cincin coklat, sedangkan pada fraksi etil asetat menunjukkan negatif terpenoid dengan tidak terbentuknya cincin. Uji terpenoid dilakukan dengan menambahkan reagen Lieberman-Burchard (asam asetat anhidrat dan H_2SO_4). Tujuan ditambahkan asam asetat anhidrat agar terbentuk turunan asetil, sedangkan penambahan H_2SO_4 bertujuan untuk menghidrolisis air yang bereaksi dengan turunan asetil membentuk larutan warna. Reaksi uji terpenoid ditunjukkan pada Gambar 2.9. Terjadinya perubahan warna akibat dari oksidasi senyawa terpenoid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (Sulistyarini *et al.*, 2019). Senyawa yang semula berwarna coklat muda berubah menjadi lebih pekat dan berbentuk seperti cincin. Perbedaan warna yang dihasilkan oleh terpenoid disebabkan perbedaan gugus pada atom C-4 (Habibi *et al.*, 2018).



Gambar 4.5 Hasil uji fitokimia terpenoid sebelum dan sesudah diberikan pereaksi (a) ekstrak etanol 70% (b) fraksi etil asetat

Pada ekstrak etanol 70% menunjukkan positif mengandung triterpenoid. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan gugus pada atom C-4 pada sampel yang bereaksi dengan H_2SO_4 dalam asetat anhidrat. Sedangkan pada fraksi etil asetat

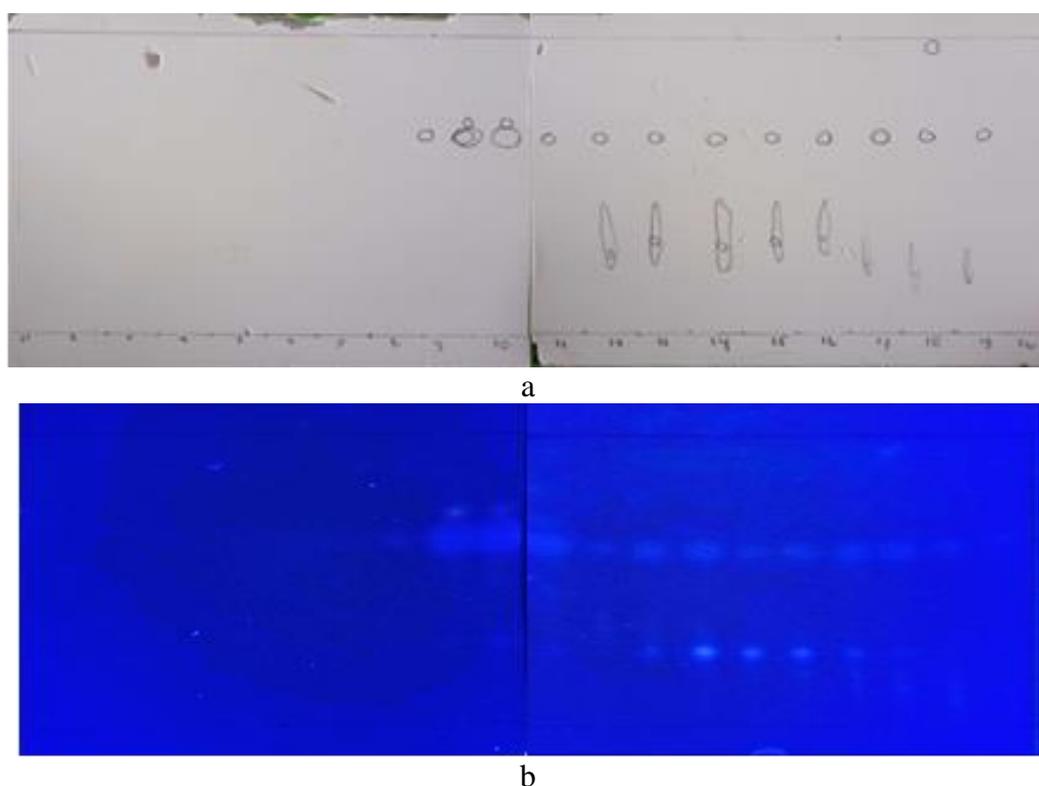
menunjukkan hasil negatif. Hal ini dikarenakan pelarut etil asetat bersifat semi polar sehingga tidak dapat menarik terpenoid. Menurut Hanifa *et al.*, (2021) senyawa terpenoid bersifat lebih terekstrak pada larutan kloroform yang bersifat non-polar. Hasil uji terpenoid ditunjukkan pada Gambar 4.5. Pada penelitian (Febrianti *et al.*, 2021; Masduqi & Rahardhian, 2021) ekstrak rimpang Jeringau mengandung senyawa terpenoid.

4.3 Isolasi Senyawa Flavonoid Menggunakan Kromatografi Kolom

Pengambilan senyawa flavonoid dari rimpang jeringau, dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom metode SGP (*Step Gradient Polarity*). SGP merupakan metode elusi dengan peningkatan kepolaran eluen. Hal ini mengikuti penelitian yang dilakukan Muhridja *et al.*, (2016). Variasi eluen yang digunakan yaitu n-heksana 100%, n-heksana:etil asetat (7:3), n-heksana:etil asetat (6:4), n-heksana:etil asetat (3:7), etil asetat 100%, etil asetat:metanol (6:4), etil asetat:metanol (4:6), dan metanol 100%. Penampungan eluen dilakukan setiap 5 mL/menit dalam satu botol vial. Penampungan eluen sedikit demi sedikit dilakukan untuk menghindari tercampurnya senyawa yang akan dipisahkan. Sebelum dilakukan pemisahan, terlebih dahulu dibuat kolom kromatografi dengan menggunakan silika gel dan pelarut n-heksana:etil asetat (7:3). Hasil kolom dilihat dengan menggunakan senter untuk mengetahui tidak ada celah atau gelembung sehingga kolom dapat digunakan.

Pada pemisahan kromatografi dengan gradien eluen dihasilkan sebanyak 43 vial eluat dari 240 mL eluen dan 67 mg sampel. Masing-masing vial dimonitoring dengan ditotolkan pada KLTA dengan fase gerak n-heksana:etil asetat (7:3) untuk

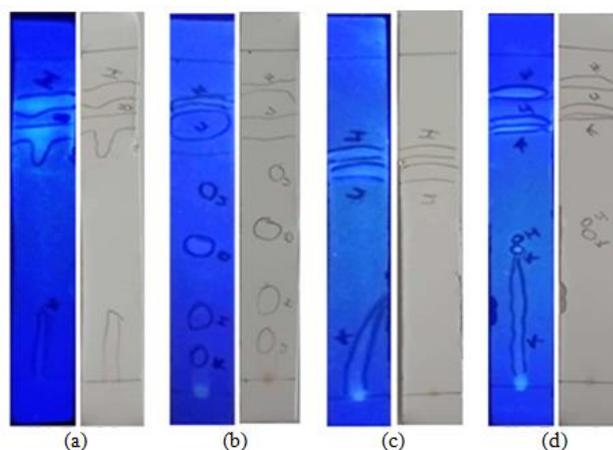
mengetahui adanya sampel pada eluat. Selanjutnya plat KLT dilihat di bawah lampu UV 366 nm. Pada hasil KLTA menunjukkan pola noda berwarna kuning dan ungu yang berekor dan saling tumpang tindih pada vial ke 8-20. Pada pemisahan kolom eluen bergradien menghasilkan noda yang saling tumpang tindih (belum sempurna). Dimungkinkan karena jumlah penampungan eluat yang terlalu banyak dan pemilihan pelarut yang digunakan belum tepat sehingga pemisahan berjalan kurang maksimal.



Gambar 4.6 Monitoring KLTA isolat hasil kolom menggunakan eluen bergradien (a) pengamatan secara langsung, (b) di bawah UV 366 nm

Monitoring dilakukan pada pelarut 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). Eluen n-heksana-etil asetat (7:3) menunjukkan hasil pemisahan yang bagus. Hasil

monitoring ditunjukkan pada Gambar 4.7. Noda yang dihasilkan memiliki pola pemisahan terbentuknya noda-noda yang terpisah dengan baik, tidak berekor dan berwarna hijau, kuning atau ungu yang diduga merupakan senyawa flavonoid. Sedangkan pada n-heksana-etil asetat (8:2), n-heksana-etil asetat (6:4), dan n-heksana-etil asetat (4:6) menghasilkan pola noda yang kurang bagus dengan bentuk tidak teratur dan berekor sehingga mengindikasikan bahwa pada pelarut tersebut kurang bagus digunakan untuk pemisahan. Dengan demikian, eluen untuk pemisahan yakni n-heksana-etil asetat (7:3). Hasil identifikasi monitoring menggunakan eluen n-heksana-etil asetat (7:3) ditunjukkan pada Tabel 4.3.



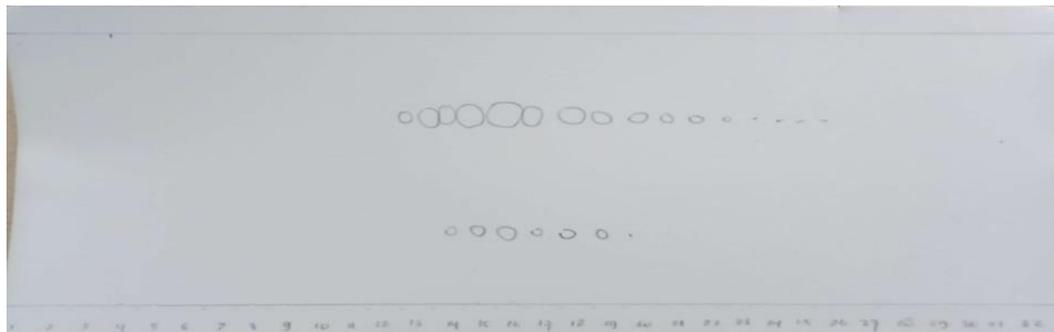
Gambar 4.7 Hasil monitoring eluen terbaik pemisahan flavonoid (a) n-heksana:etil asetat (8:2), (b) n-heksana:etil asetat (7:3), (c) n-heksana:etil asetat (6:4), dan (d) n-heksana:etil asetat (4:6)

Tabel 4.3 Monitoring eluen pemisahan senyawa metabolit sekunder flavonoid n-heksana-etil asetat (7:3).

No	Jarak (cm)		Rf	Warna Noda	Dugaan Senyawa (Hanani, 2014)
	Noda	Eluen			
1	0,65	8	0,08	Kuning	Flavonol
2	1,6	8	,2	Hijau	Flavonol
3	3,4	8	0,43	Fluoresensi	Isoflavon
4	4,75	8	0,59	Ungu	Flavon/flavonol
5	6,2	8	0,78	Ungu gelap	Flavon, flavonol, isoflavon, kalkon
6	7	8	0,875	Fluoresensi	Flavanon

Pemisahan senyawa flavonoid dengan kromatografi kolom dilakukan menggunakan eluen hasil terbaik pada monitoring menggunakan KLTA. Sebanyak 67 mg fraksi etil asetat rimpang Jeringau dielusi menggunakan pelarut n-heksana:etil asetat (7:3) yang berifat semi polar dengan daya tampung 2 mL/menit pada masing-masing vial menghasilkan 107 vial. Pada pemisahan kolom kali ini, senyawa yang memiliki sifat kepolaran yang sama dengan eluen akan terelusi lebih cepat sedangkan senyawa yang bersifat polar akan tertahan pada silika gel. Selanjutnya masing-masing vial dilakukan monitoring menggunakan KLTA dan dilihat noda yang terbentuk.

Hasil monitoring KLTA menunjukkan noda awal terbentuk pada vial 13. Hasil noda yang terbentuk memiliki bentuk tunggal yang mengindikasikan pemisahan berjalan dengan baik dan pola sama menunjukkan bahwa senyawa memiliki karakteristik yang sama. Noda-noda yang terbentuk berwarna ungu dengan nilai R_f sebesar 0,663 dan 0,25 yang diduga senyawa flavonoid. Menurut Hanani (2014) warna ungu menunjukkan senyawa flavonoid jenis flavon, flavonol, isoflavon dan kalkon. Setelah itu plat KLTA kemudian disemprot menggunakan $AlCl_3$ dan dilakukan pengamatan di bawah lampu UV 366. Hasil pengamatan menunjukkan warna noda tidak berubah menunjukkan flavonoid jenis flavonol dan flavon ketika disemprot menggunakan $AlCl_3$ tidak terjadi perubahan warna. Hasil noda kemudian diamati di bawah lampu UV pada 366 nm ditunjukkan pada Gambar 4.8.



a

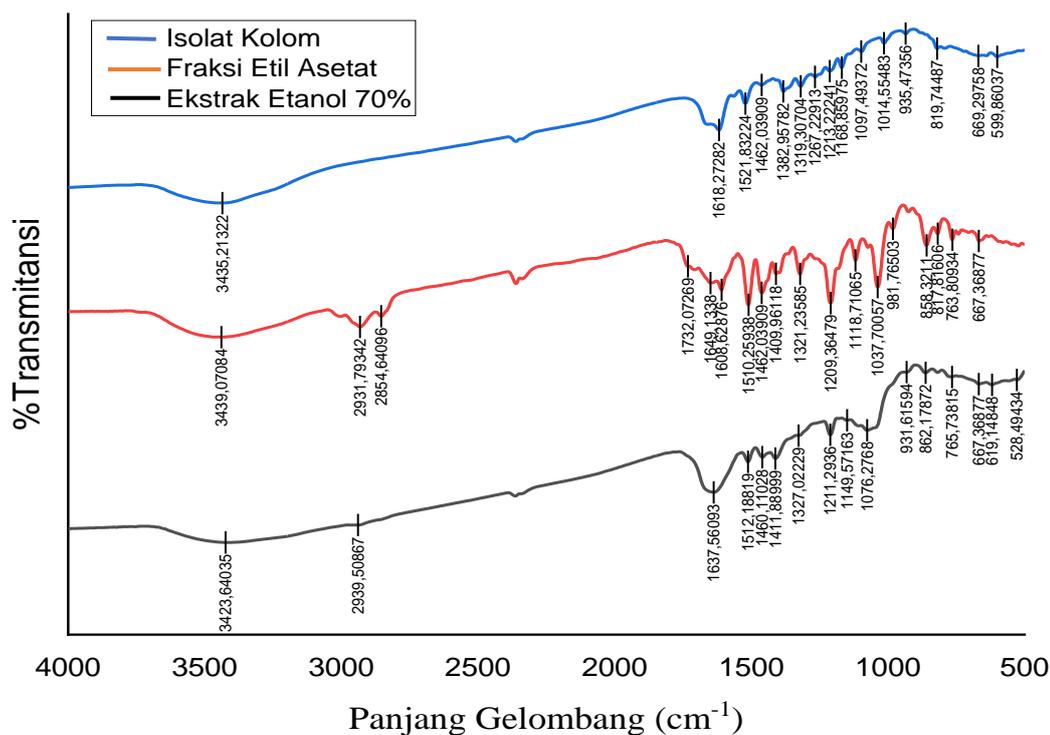


b

Gambar 4.8 Hasil KLTA isolat hasil kolom eluen n-heksana: etil asetat (7:3) (a) pengamatan secara langsung, (b) di bawah UV 366 nm

4.4 Identifikasi Isolat Hasil Kolom Menggunakan Spektroskopi IR

Identifikasi gugus fungsi pada sampel ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat rimpang Jeringau dilakukan menggunakan FTIR. Spektroskopi IR dapat mendeteksi adanya gugus fungsi penyusun senyawa sehingga mampu diketahui jenis senyawa yang terkandung dalam sampel. FTIR akan menunjukkan spektrum hasil dari persentase transmitansi pada panjang gelombang tertentu. Analisis FTIR dilakukan pada panjang gelombang $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$. Hasil FTIR ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat hasil kolom dapat dilihat pada Gambar 4.9. Masing-masing serapan yang menunjukkan gugus fungsi ditampilkan pada Tabel 4.4.



Gambar 4.9. Serapan FTIR ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat kolom kromatografi

Tabel 4.4 Serapan panjang gelombang pada ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan isolat kolom

Bilangan Gelombang (cm-1)			Range (cm ⁻¹) Pustaka (Socrates, 1994)	Gugus Fungsi
Ekstrak Etanol 70%	Fraksi Etil Asetat	Isolat Kolom		
3423	3439	3447	3580 – 3200	O-H stretching
2939	2931		2975-2840	Csp ³ -H stretching asym
1637	1609	1619	1640-1600	C=O stretching keton (α,β-unsaturated)
1511	1511	1522	1525-1470	C=C aromatik
-	-	1382	1390-1370	C-CH ₃ tekuk, simetris
1459	1461	1462	1480-1440	C-H pada CH ₃ bending
1411	1409	-	1420-1400	C-H pada CH ₂ bending
-	1321	1319	1360-1300	C-O stretching fenol
1149	1209	1168	1310-1020	C-O-C stretching
1109	1118	1098	1125-1085	C-O stretching alcohol secondary
1109	1034	1098	1300-1000	C-O stretching eter
862	859	934	1000-800	=C-H bending alkena
768	764	790	900-650	C-H aromatic
530	-	600	600-420	C-H bending (out of plane)

Merujuk dari hasil fitokimia ekstrak etanol 70% mengandung senyawa flavonoid, tanin dan triterpenoid, sedangkan pada fraksi hanya mengandung tanin dan flavonoid. Pada penelitian yang dilakukan Dewi *et al.* (2017) adanya senyawa flavonoid pada sampel akan menunjukkan serapan khas melebar gugus $-OH$, $C-O$ alkohol, $C-H$ aromatik, $C=C$ aromatik sebagai gugus kromofor yang khas dari flavonoid dalam ikatan terkonjugasi, $C=O$, dan $C-H$ alifatik *stretching* yang merupakan gugus khas dari senyawa aktif flavonoid. Pada penelitian kali ini, masing-masing sampel menunjukkan adanya gugus senyawa flavonoid. Ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan isolat kolom masing masing menunjukkan serapan $-OH$, $C-O$ alkohol sekunder, $C-H$ aromatik, $C=C$ aromatik, $C=O$ dan $C-H$ alifatik.

Ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat menunjukkan positif tanin. Sari *et al.* (2015) tanin memiliki gugus fungsi karakteristik yakni $-OH$, $C=O$ ester, $C=C$ aromatik, $C-O-C$ eter, serta $C-OH$. Selain itu menurut Lestari dan Sidik, (2013) bilangan gelombang yang identik dengan tanin yakni adanya gugus OH , adanya $CH\ sp^3$, $C-O$ alkohol sekunder, dan adanya serapan pada bilangan gelombang 1635 dan $759\ cm^{-1}$ yang menunjukkan adanya gugus cincin aromatik. Pada penelitian kali ini, ekstrak etanol dan fraksi etil asetat menunjukkan adanya gugus Csp^3-H pada panjang gelombang 2939 dan $2931\ cm^{-1}$, $C-O-C\ stretching$ pada panjang gelombang 1149 dan $1209\ cm^{-1}$, serta $C=O$ alkohol sekunder pada panjang gelombang 1109 dan $118\ cm^{-1}$.

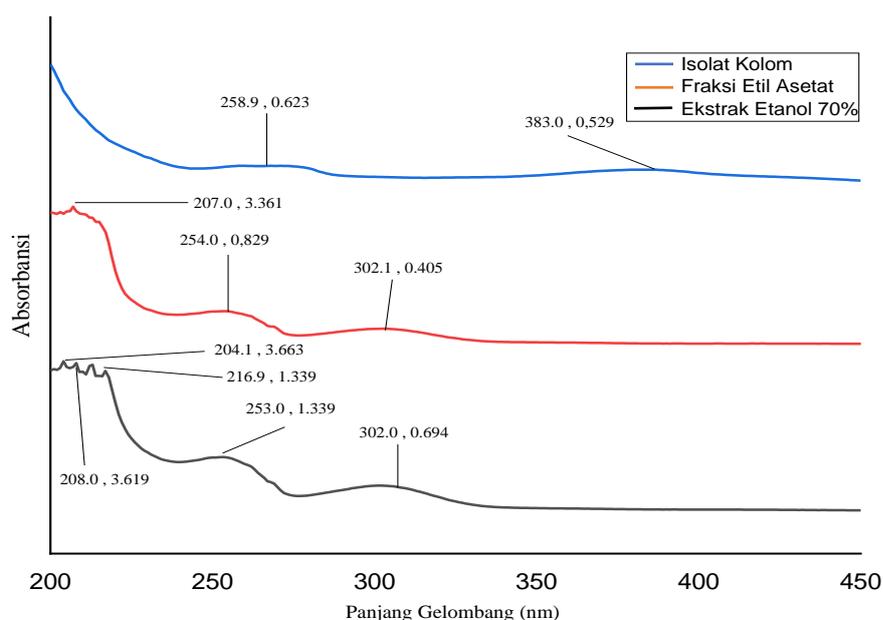
Adanya senyawa triterpenoid ditunjukkan dengan adanya gugus vibrasi $C=C$, $O-H$ dan vibrasi karbonil $C=O$. Hal ini diperkuat dengan adanya $C-H\ sp^3$ pada panjang gelombang $2940\ cm^{-1}$ yang menunjukkan adanya vibrasi ulur

(*stretching*) gugus C-H alifatik sehingga mengindikasikan adanya gugus geminal yakni gugus metil (-CH₃) dan metilena (-CH₂) dengan diperkuat adanya vibrasi tekuk C-H yang mengindikasikan gugus gem dimetil khas triterpenoid (Astuti *et al.*, 2017; Fasya *et al.*, 2018). Uji fitokimia ekstrak etanol 70% positif mengandung senyawa terpenoid jenis triterpenoid. Hasil FTIR ekstrak etanol 70% menunjukkan adanya gugus serapan khas terpenoid Csp³ H pada panjang gelombang 2939 cm⁻¹ dengan diikuti CH alifatik yang mengindikasikan terdapat gugus geminal CH₃ pada panjang gelombang 1459 cm⁻¹ dan CH₂ pada panjang gelombang 1409 cm⁻¹.

Selain senyawa metabolit sekunder flavonoid, tanin, dan terpenoid dugaan adanya senyawa lain terkandung dalam sampel Jeringau. Rajput *et al.* (2014) menyatakan bahwa pada rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) memiliki kandungan β-asaron sebesar 46,78%. Sehingga dimungkinkan adanya senyawa β-asaron pada ekstrak etanol maupun fraksi etil asetat. Pada penelitian Wu *et al.* (2007) mengekstrak jeringau (*Acorus calamus* L.) menggunakan etanol positif mengandung β-asaron. Asha & Ganjewala, (2009) melakukan ekstraksi Jeringau menggunakan etil asetat mampu mengekstrak senyawa β-asaron dari sampel. β-asaron ditandai dengan adanya gugus fungsi C=C *stretchin g* pada daerah serapan 1606,48-1457,45 cm⁻¹, dan C-O *stretching* pada daerah 1264,99-1028,90 cm⁻¹. Selain itu juga terdapat C-H *stretching* aldehyd dan C-H yang tersubstitusi pada benzena. Hasil GC-MS juga menunjukkan adanya β-asaron pada waktu retensi 1488 yang menghasilkan 18 puncak dengan ion molekuler [208]⁺ (m/z) (Kasture & Krishnamurthy, 2016).

4.5 Identifikasi Isolat Flavonoid Hasil Kolom Menggunakan Spektroskopi UV

Identifikasi senyawa aktif yang ada pada sampel ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat kolom radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang tertentu sehingga akan mengakibatkan elektron berpindah ke orbital dengan energi yang lebih tinggi. Identifikasi dilakukan pada panjang gelombang 200-450 nm. Hasil identifikasi UV- ditunjukkan pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10. Puncak hasil UV ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan isolat kolom kromatografi

Pada sampel ekstrak etanol 70% menunjukkan adanya serapan pada panjang gelombang 253 dan 302 nm, fraksi etil asetat pada 254 dan 302 nm, serta isolat kolom pada 258 dan 383 nm menunjukkan adanya serapan serapan flavonoid. Pada daerah tersebut diindikasikan adanya gugus kromofor C=O (pita II) dan C=C (pita I) dari gugus aromatik terkonjugasi sehingga menyebabkan adanya transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ dan $n \rightarrow \pi^*$ (Harbone, 1987). Arora & Itankar

(2018) menjelaskan bahwa flavon memiliki transisi pita II pada daerah 250-290 nm sedangkan flavonol memiliki daerah serapan pada panjang gelombang 270-290 nm. Pada daerah serapan pita I flavon berada pada panjang gelombang 310-350 nm sedangkan flavonol pada daerah serapan 350-385 nm. Rentang panjang gelombang yang berdekatan membuat kedua jenis flavonoid tersebut susah untuk dibedakan.

Pada penelitian yang dilakukan Muhridja *et al.*, (2016) menunjukkan isolat hasil kolom rimpang Jerigau memiliki daerah serapan pita I pada panjang gelombang 304,78 nm sedangkan pada pita serapan II yakni daerah 253,73 nm dimana pada rentang tersebut merupakan dugaan senyawa jenis flavonol. Transisi elektron pada $n - \pi^*$ menunjukkan adanya gugus kromofor tunggal C=O. Sedangkan pada pita I menunjukkan adanya eksitasi dari elektron $\pi - \pi^*$ yang mengindikasikan adanya gugus kromofor C=C terkonjugasi. Pada penelitian yang dilakukan Dewi *et al.*, (2017), daerah serapan spektrum UV-Vis pada pita II dengan rentang 250 – 280 nm dan pita I dengan 350 – 385 nm termasuk ke dalam golongan flavonol (3-OH bebas). Flavonoid jenis flavonol yang memiliki 3-OH bebas adalah kuersetin, sedangkan kaempferol memiliki 2 gugus bebas (Ma *et al.*, 1997). Menurut Barua *et al.* (2014) analisis ekstrak etanol rimpang jeringau menggunakan HPTLC (*High Performance Thin Layer Chromatography*) positif mengandung flavonoid jenis kuersetin dengan nilai R_f 0,85 dan pada area 10240,4 AU.

Selain itu, pada sampel ekstrak etanol 70% menunjukkan adanya senyawa terpenoid pada serapan panjang gelombang 201, 204, 205, 207, 208 dan 216 nm. Panjang gelombang triterpenoid memiliki rentang 200-215 nm pada sinar UV

(Jiang *et al.*, 2016). Pada penelitian Hashem *et al.*, (2012) salah satu jenis terpenoid memiliki serapan UV panjang gelombang 210 nm. Dimana didukung hasil EI-MS $[M]^+$ dengan puncak m/z 400 yang menunjukkan adanya cincin lakton dengan dasar pada m/z 69 (C_3HO_2). Hasil H-NMR menunjukkan adanya 5 singlet pada δ : 0,88; 0,89; 1,2; 1,21; dan 1,25 ppm. Dimana δ : 1,30-2,33 ppm merupakan karakteristik untuk molekul CH dan CH_2 pada cincin sikloalifatik fenantrena dari terpenoid.

Farikhah *et al.* (2020) mengidentifikasi adanya senyawa terpenoid yang ditunjukkan pada panjang gelombang 245 nm. Dimana pada serapan tersebut menunjukkan adanya gugus karbonil dari transisi $n - \pi^*$ yang berupa senyawa karboksilat. Selain itu senyawa terpenoid juga ditunjukkan dengan adanya serapan maksimum pada panjang gelombang 216,5; 217; dan 222,5 yang menunjukkan adanya pada $n - \pi^*$ dari kromofor $C=O$.

4.6 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% dan Fraksi Etil Asetat Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Uji aktivitas antibakteri rimpang Jeringau dilakukan pada ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi air rimpang Jeringau. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram karena metode ini lebih mudah dan praktis. Prinsip metode difusi cakram yakni berdifusinya zat antibakteri dari kertas cakram yang sebelumnya direndam pada sampel kemudian ditempel di permukaan media agar yang telah diberi bakteri uji. Perendaman kertas cakram bertujuan agar senyawa aktif terserap secara maksimal sehingga akan menumbuhkan zona

hambat yang baik. Pada penelitian kali ini, kertas cakram menggunakan kertas *whatman* no 42 dipotong dengan diameter 6 mm.

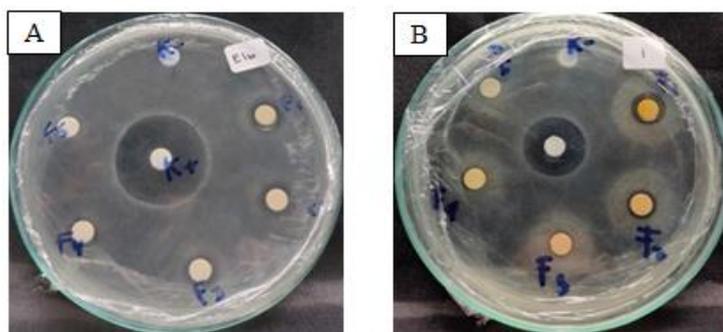
Suspensi bakteri memiliki nilai *optical density* (OD) 0,5 sesuai dengan standar kekeruhan *Mc Farland I*. Inoculum bakteri yang memiliki kekeruhan 0,5 setara dengan memiliki populasi 1×10^7 CFU/mL – 1×10^8 CFU/mL (Nuria *et al.*, 2010). Pembuatan media agar yang tepat yakni 4 mm. Ketebalan media mempengaruhi besarnya hambatan yang akan terbentuk. Semakin tebal media maka laju difusi ekstrak akan lebih lama. Begitupun kurang dari 4 mm, maka laju difusi ekstrak akan semakin cepat dan zona hambat yang diperoleh lebih besar. Hasil uji aktivitas antibakteri *Acorus calamus* L. terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dirangkum pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Zona hambat pertumbuhan bakteri pada ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat

Konsentrasi (%)	Zona Hambat	
	Ekstrak Etanol (mm)	Fraaksi Etil Asetat (mm)
60	4,54 ± 1,023 ^a	5,13 ± 0,753 ^a
50	3,82 ± 1,412 ^a	4,85 ± 0,989 ^a
40	3,68 ± 0,319 ^b	4,40 ± 0,400 ^b
30	2,65 ± 0,558 ^b	2,93 ± 0,887 ^b
20	2,30 ± 0,963 ^b	2,63 ± 0,701 ^b
K+		22
K-		0

Dari Tabel 4.5, dapat diketahui bahwa aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat memiliki peningkatan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi. Adanya aktivitas antibakteri pada sampel ditandai dengan adanya zona bening yang terbentuk di daerah sekitar kertas cakram. Semakin besar zona bening yang terbentuk, semakin besar pula kekuatan sampel tersebut mengandung

zat antibakteri. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan pada variasi konsentrasi 60, 50, 40, 30, dan 20% pada masing-masing sampel. Zona hambat yang terbentuk pada ekstrak etanol yakni sebesar 2,3-4,54 mm sedangkan pada fraksi etil asetat sebesar 2,63-5,29 mm. Merujuk pada kategori zona hambat menurut Davis dan Stout (2009), pada konsentrasi 60% fraksi etil asetat termasuk dalam kategori sedang sedangkan pada ekstrak etanol 70% masih tergolong lemah. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kuat dibandingkan pada ekstrak etanol 70% dikarenakan pada fraksi senyawanya lebih spesifik dibandingkan pada ekstrak. Fraksi etil asetat telah melalui proses pemutusan ikatan glikosida pada saat hidrolisis.



Gambar 4.11 Zona hambat hasil uji aktivitas antibakteri pada (a) ekstrak etanol 70% dan (b) hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat

Pada penelitian kali ini digunakan kontrol positif berupa kloramfenikol dan kontrol negatif menggunakan DMSO 100%. Kloramfenikol sebagai acuan keaktifan dari ekstrak sebagai aktivitas antibakterinya. Antibiotik kloramfenikol memiliki aktivitas anti bakteriostatik pada konsentrasi tinggi dan bakterisidal pada konsentrasi rendah. Kloramfenikol sebagai antibiotik menghasilkan zona hambat sebesar 20 mm pada konsentrasi 20%. Hal ini termasuk dalam kategori kuat (10-

20 mm). DMSO merupakan pelarut sulfur organik yang tidak memiliki warna, namun dapat melarutkan senyawa polar, nonpolar maupun pelarut organik lainnya seperti air (Choulis, 2012). Kontrol negatif DMSO juga dipilih karena tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri pada ekstrak maupun fraksi. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 4.11. bahwa kontrol negatif tidak menumbuhkan zona hambat.

Dari hasil uji aktivitas antibakteri kemudian dilakukan analisis SPSS yang ditunjukkan pada (L.4.8) untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara variasi pelarut dan konsentrasi zona hambat ekstrak dan fraksi rimpang Jeringau menggunakan varian *Two Way Anova* pada aplikasi SPSS. Hasil *output* uji normalitas didapatkan nilai sig. 0,091 yang berarti sig. <0.05 . hal ini menunjukkan bahwa nilai residual standard normal. Selanjutnya dilakukan two way anova dan tukey. Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa nilai sig. variasi konsentrasi $0,00 < 0,005$ yang artinya ada perbedaan pada variasi konsentrasi. Pada jenis pelarut juga didapatkan hasil nilai sig. $0,010 > 0,05$ yang artinya jenis pelarut yang digunakan terdapat beda nyata. Diperoleh nilai sig. pada interaksi antara variasi pelarut dan konsentrasi sebesar $0.882 > 0.05$ yang berarti dapat disimpulkan bahwa tidak ada interaksi antara ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat dengan variasi pelarut.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol dan fraksi rimpang Jeringau memiliki aktivitas antibakteri. Hal ini dapat dibuktikan dari hasil uji fitokimia pada ekstrak positif mengandung flavonoid, saponin, tanin dan terpenoid. Sedangkan pada fraksi etil asetat positif mengandung flavonoid dan tanin. Penelitian aktivitas antibakteri

rimpang *Acorus calamus* oleh Kumar *et al.*, (2014) dengan beberapa variasi konsentrasi dan bakteri, diketahui bahwa *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) ekstrak etanol 6,25 mg/500 μ L mampu menghambat 9 mm dan fraksi etil asetat 11 mm. Flavonoid bekerja sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, yang termasuk bakteri gram positif. Lipofilisitas flavonoid menjadikan flavonoid sebagai penghambat aktivitas bakteri gram positif. Mekanisme dugaan flavonoid dalam lapisan ganda lipid adalah antara flavonoid hidrofilik dan kepala polar fosfolipid (partisi) lebih banyak flavonoid hidrofilik dalam lapisan ganda lipidnya. Interaksi ini mengubah sifat membran sehingga makanan menghambat aktivitas bakteri gram positif (Yuan *et al.*, 2021).

4.7 Perspektif Manfaat Tanaman Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) dalam Pandangan Islam

Jeringau merupakan tanaman yang tumbuh hampir di setiap daerah. Dari hasil kajian penelitian ini, didapatkan bahwasannya pada bagian rimpang Jeringau memiliki beberapa kandungan senyawa aktif seperti flavonoid, tanin, dan terpenoid. Senyawa aktif tersebutlah yang kemudian dapat dimanfaatkan untuk dijadikan Rimpang Jeringau mampu menghambat pertumbuhan bakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian kali ini, telah terbukti bahwa Allah SWT tidaklah semata-mata menciptakan sesuatu yang akan berakhir sia-sia. MasyaAllah, segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam.

Allah SWT berfirman dalam Al-Qur'an QS. Ali-Imran (3): 191

رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya : *“Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka.”*

M. Quraish shihab dalam buku yang berjudul Tafsir Al-Misbah menjelaskan ciri-ciri makhluk hidup yang berjudukan Ulūl-albāb. Mereka mereka merupakan orang baik (laki-laki atau perempuan) yang selalu ingat kepada Allah SWT dengan mengucap dalam hati atau lisan pada kondisi apapun. Mereka selalu berdzikir kepada Allah SWT dan mensyukuri segala makhluk ciptaan-Nya. Objek dzikir adalah Allah, sedangkan objek akal pikiran adalah seluruh makhluk ciptaan-Nya. Manusia diberi akal untuk berpikiran luas tentang semua yang ada di alam dan terdapat keterbatasan dalam memikirkan dzat Allah. Prof. Dr. Haji Abdul Malik Abdul Karim dalam bukunya yang berjudul Tafsir Al-Azhar menjelaskan bahwa orang yang berakal tidak akan pernah melupakan Allah dalam keadaan apapun. Kata yadzkurūna berarti ingat atau dzikir. Disebutkan pula, bahwasanya dzikir hendaklah bertali diantara sebutan dan ingatan. Kita mampu menyebut Asma Allah SWT dengan mulut karena telah teringat terlebih dahulu dalam hati. Sesudah penglihatan atas kejadian langit dan bumi, atau pergantian siang dan malam, langsung ingatan kepada yang menciptakannya. Karena jelaslah dengan sebab ilmu pengetahuan bahwa semuanya itu tidaklah ada yang terjadi sia-sia atau secara kebetulan. Kegiatan mengingat (tadzakkur) itu berhubungan dengan kegiatan memikirkan (tafakkur). Lanjutan perasaan setelah mengingat dan berpikir, yaitu tawakal dan ridla, berserah diri dan mengakui kelemahan. Seyogyanya bertambah tinggi ilmu seseorang bertambah ingatlah kepada Allah. Sebagai alamat pengakuan atas kelemahannya di hadapan Allah, timbullah bakti dan ibadat sebagai hamba kepada penciptanya.

Sungguh sebagai manusia kita sudah sepatutnya bersyukur. Tuhan telah banyak menciptakan salah satunya tumbuhan dengan beberapa kegunaan. Hal ini juga karena adanya senyawa aktif yang terkandung dalam rimpang Jeringau. Pada penelitian kali ini, uji fitokimia ekstrak etanol 70% positif mengandung flavonoid, tanin dan terpenoid. Sedangkan pada fraksi etil asetat positif mengandung flavonoid dan tanin. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol pada konsentrasi 60% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 4,54 mm. zona hambat yang dihasilkan ekstrak etanol masih menunjukkan kategori lemah. Sedangkan pada fraksi etil asetat, konsentrasi 60% mampu menghambat pertumbuhan bakteri sebesar 5,29 mm dengan kategori sedang. Peningkatan konsentrasi akan meningkatkan aktivitas antibakterinya juga. Firman Allah dalam surah Asy-Syu'araa ayat 7 [QS. 26:7] yang berbunyi:

أَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya : *“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”*

Tafsir QS. Asy Syu'araa (26) : 7. Oleh Quraish Shihab yakni Adakah mereka akan terus mempertahankan kekufuran dan pendustaan serta tidak merenungi dan mengamati sebagian ciptaan Allah di bumi ini? Sebenarnya, jika mereka bersedia merenungi dan mengamati hal itu, niscaya mereka akan mendapatkan petunjuk. Kamilah yang mengeluarkan dari bumi ini beraneka ragam tumbuh-tumbuhan yang mendatangkan manfaat. Dan itu semua hanya dapat dilakukan oleh Tuhan yang Maha esa dan Maha kuasa. Dari firman-firman Allah SWT tersebut, manusia dibekali akal untuk selalu bersyukur dan berfikir.

Semakin kita tinggi ilmu manusia, maka semakin banyak pengetahuannya sehingga kita akan semakin bersyukur atas segala sesuatu yang diciptakan-Nya. Maha besar Allah dengan segala ciptaanya. Maka dari itu sebagai manusia kita patut selalu bersyukur atas segala nikmat yang telah diberikan Allah SWT.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil uji fitokimia rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) pada ekstrak etanol 70% positif mengandung flavonoid, tanin dan triterpenoid. Sedangkan pada fraksi etil asetat positif mengandung flavonoid. Hal ini didukung juga dengan adanya serapan maksimum flavonoid pada pada pita II dengan rentang 250 – 280 nm dan pita I dengan 350 – 385 nm, adanya triterpenoid pada hasil UV ditunjukkan pada serapan 204 dan 216 nm yang menunjukkan adanya pada $n - \pi^*$ dari kromofor C=O dan tanin adanya gugus C=C tidak terkonjugasi dengan transisi $\pi - \pi^*$. Hasil FTIR menunjukkan adanya gugus C=C aromatik sebagai gugus kromofor yang khas dari flavonoid dalam ikatan terkonjugasi, serapan khas C-H *stretch* atau gugus geminal menunjukkan gugus khas triterpenoid dan adanya gugus C=O dan C-O *stretching* eter menunjukkan gugus khas tanin.
2. Zona hambat konsentrasi 60% yang terbentuk pada ekstrak etanol 70% sebesar 4,54 nm yang termasuk dalam kategori lemah dan pada fraksi etil asetat sebesar 5,92 yang termasuk dalam golongan sedang.

5.2 Saran

1. Dilakukan pemisahan senyawa menggunakan KLT preparatif pada isolat hasil kolom agar didapatkan senyawa lebih murni.
2. Identifikasi senyawa menggunakan instrumen LC-MS dan H-NMR.
3. Uji aktivitas antibakteri pada hasil isolat yang telah dimurnikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agati, G., Brunetti, C., Fini, A., Gori, A., Guidi, L., Landi, M., Sebastiani, F., & Tattini, M. (2020). Are flavonoids effective antioxidants in plants? Twenty years of our investigation. *Antioxidants*, 9(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/antiox9111098>
- Agusta (2015). Indonesia Memiliki 7.500 Tanaman Obat. Retrieved Sept 16, 2020, from Lipi website: lipi.go.id
- Aihua, S., Chi, X., Yang, X., Feng, J., Li, Y., & Zhou, J. (2019). Applications and Prospects of Ultrasound-Assisted Extraction in Chinese Herbal Medicine. *Open Access Journal of Biomedical Science*, 1(1), 5–15. <https://doi.org/10.38125/oajbs.000103>
- Amalia, S., Fasya, A. G., Hasanah, F., Yuliani, D., & Kimia, J. (2018). *Pemisahan Senyawa Aktif Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Etanol Hydrilla verticillata dari Ranu Grati Pasuruan*.
- Amanto B. S., Siswanti dan Angga A. (2015). Kinetika Pengeringan Temu Giring (*Curcuma heyneana Valetton & van Ziiip*) Menggunakan Cabinet Dryer dengan Perlakuan Pendahuluan Blanching. Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Anggraeni, O. N., Fasya, A. G., Abidin, M., & Hanapi, A. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, Dan N-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga Chlorella sp. In *ALCHEMY* (Vol. 3, Issue 2).
- Anisah., Khotimah, Siti., dan Yanti, Ari Hepi. (2014). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus Calamus L.*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Protobiont*, 3(3), 1-5.
- Arora, S., & Itankar, P. (2018). Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Chenopodium album* aerial parts. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(4), 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.10.002>
- Asha, D. S., & Ganjewala, D. (2009). Antimicrobial activity of *acorus calamus* (L.) rhizome and leaf extract. *Acta Biologica Szegediensis*, 53(1), 45–49.
- Astuti, M. D., Sriwinarti, T., & Mustikasari, K. (2017). Isolation And Identification Of Terpenoid Compounds From N-Hexana Extract Of Permot Plant Bracts (*Passiflora foetida L.*). *Jurnal Sains Dan Terapan Kimia*, 11(2), 80. <https://doi.org/10.20527/jstk.v11i2.4041>
- Atisanto, V. S., Mulyani, S., & Triani, I. G. A. L. (2017). KARAKTERISTIK

EKSTRAK PADA BUAH KELUBI (*Eliodoxa conferta*). *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 5(3), 35–44.

- Badshah, S. L., Faisal, S., Muhammad, A., Poulson, B. G., Emwas, A. H., & Jaremko, M. (2021). Antiviral activities of flavonoids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 140(April), 111596. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111596>
- Barua, C., Sen, S., Das, A. S., Talukdar, A., Hazarika, N. J., Gohain Barua, A., Baruah, A. M., & Barua, I. (2014). A comparative study of the in vitro antioxidant property of different extracts of *Acorus calamus* Linn. *J. Nat. Prod. Plant Resour*, 4(1), 8–18. <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>
- Choulis, N. H. (2012). Miscellaneous drugs, materials, medical devices, and techniques. In *Side Effects of Drugs Annual* (1st ed., Vol. 34). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59499-0.00049-0>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
- Dewi, N. W. R. K., Gunawan, I. W., & Puspawati, N. M. (2017). Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Antioksidan Golongan Flavonoid Dari Ekstrak Etil Asetat Daun Pranajiwa (*Euchresta horsfieldii* Lesch Benn.). *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 5(1), 26. <https://doi.org/10.24843/ck.2017.v05.i01.p04>
- Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., & Iranshahy, M. (2019). Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research*, 33(1), 13–40. <https://doi.org/10.1002/ptr.6208>
- Fasya, A. G., Riska Dinasti, A., Syofiyah, M., Maghfiroh Rahmawati, L., Millati, N., Aulia Safitri, D., Handoko, S., Hanapi, A., & Ningsih, R. (2016). Ekstraksi, Hidrolisis dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga *Chlorella* sp. In *ALCHEMY : Journal of Chemistry | EISSN* (Vol. 5).
- Fatima, S., Raheela, T., Nusrat, S., Musarat, N., & Shafiullah, K. (2014). Latent natural product and their potential application as anti-infective agents. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 8(4), 100–105. <https://doi.org/10.5897/ajpp2013.3971>
- Fatimah, S., Nadifah, F., & Burhanudin, I. (2016). Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Kubis (*Brassica oleracea* var. capitata f. alba) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, 4(1), 102–106. <https://doi.org/10.24252/bio.v4i2.2515>

- Ferawaty, A.S., Agus, S., dan Delianis, P. (2012). Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut Terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. *Jurnal of Marine Research*. 1(2): 152-160.
- Firnando H., Nera U.P., dan Ressi Susanti. 2019. Penetapan Kadar Total Fenolik Dan Flavonoid Fraksi Butanol Dan Fraksi Air Dari Ekstrak Etanol Rimpang *Acorus SP*. Vol 4, No 1 (2019).
- 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.
- Fuad Masduqi, A., & Radix Rahardhian, M. R. (2021). Determinasi Total Flavonoid Dan Total Fenolik Rimpang Jeringau (*Acorus Calamus L.*) Dengan Perbedaan Konsentrasi Pelarut. *Media Farmasi Indonesia*, 16(1), 1625–1631. <https://doi.org/10.53359/mfi.v16i1.169>
- Ganjewala, D., Srivastava, A.K., 2011. *Asian J. Plant Sci.* 10, 182–189.
- Habibi, A. I., Firmansyah, R. A., & Setyawati, S. M. (2018). Skrining Fitokimia Ekstrak n-Heksan Korteks Batang Salam (*Syzygium polyanthum*). *Indonesian Journal of Chemical Science*, 7(1), 1–4.
- Handoko, D. S. (2006). Kinetika hidrolisis maltosa pada variasi suhu dan jenis asam sebagai katalis. *SIGMA: Jurnal Sains dan Teknologi*, 9(1).
- Hanifa, N. I., Wirasisya, D. G., Muliani, A. E., Utami, S. B., & Sunarwidhi, A. L. (2021). Phytochemical Screening of Decoction and Ethanolic Extract of *Amomum dealbatum* Roxb. Leaves. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(2), 510–518. <https://doi.org/10.29303/jbt.v21i2.2758>
- Harborne, J.B., (1987), *Metode Fitokimia*, Edisi ke dua, ITB, Bandung.
- 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>
- Hardjono Sastrohamidjojo. (1985). *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty
- Harvey, David., (2000), *Modern Analytical Chemistry*. New York: McGraw-Hill Comp.
- Haryati, N.A., C.S. Erwin. 2015. Uji Toksisitas dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Merah (*Syzygium mytifolium Walp*) terhadap Bakteri *Staphylococcus*

aureus dan *Escherichia coli*. J. Kimia Mulawarman, 13(1): 35-39

- Hasan, Muhammad Nur. 2015. Pengaruh Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus L.*) dalam Beberapa Pelarut Organik Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Antifungi Secara In Vitro. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hashem, F. ., Sengab, A. ., Shabana, M. ., & Khaled, S. (2012). Antioxidant activity of *Mayodendron igneum* Kurz and the cytotoxicity of the isolated terpenoids. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1(3), 3.
- Husa, F., & Mita, S. R. (2020). Identifikasi Bahan Kimia Obat dalam Obat Tradisional Stamina Pria dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis. *Farmaka*, 18(2), 16–25. <https://jurnal.unpad.ac.id/farmaka/article/view/25955>
- Ikalinus, R., Widyastuti, S., & Eka Setiasih, N. (2015). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa Oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*, 4(1), 77.
- Illing, I., Safitri, W., & Erfiana. (2017). Uji Fitokimia Ekstrak Buah Degen Ilmiati Illing, Wulan Safitri dan Erfiana. *Jurnal Dinamika*, 8(1), 66–84.
- Irwan, A.S. (2017). Uji Aktivitas Antimikroba Hasil Fraksinasi Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus L.*) terhadap Bakteri Patogen. Skripsi, Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Current Protocols in Plant Biology*, 1(2), 345–358. <https://doi.org/10.1002/cppb.20024>
- Kasture, A., & Krishnamurthy, R. (2016). Evaluation of the Chemical Variability and Phytochemical Analysis among Indian Germplasm of *Acorus calamus* Linn Using GC- MS and FTIR. *European Journal of Medicinal Plants*, 15(3), 1–11. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2016/25774>
- Khazeei Tabari, M. A., Iranpanah, A., Bahramsoltani, R., & Rahimi, R. (2021). Flavonoids as promising antiviral agents against sars-cov-2 infection: A mechanistic review. *Molecules*, 26(13), 1–36. <https://doi.org/10.3390/molecules26133900>
- Khwairakpam, A. D., Damayenti, Y. D., Deka, A., Monisha, J., Roy, N. K., Padmavathi, G., & Kunnumakkara, A. B. (2018). *Acorus calamus*: A bio-reserve of medicinal values. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 29(2), 107–122. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2016-0132>
- Koca, H. B., Köken, T., Özkurt, M., Kuş, G., Kabadere, S., Erkasap, N., & Çolak, Ö. (2018). Effects of *Acorus calamus* plant extract on prostate cancer cell

- culture. *Anatolian Journal of Botany*, 2(1), 46–51. <https://doi.org/10.30616/ajb.391985>
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2), 1–25. <https://doi.org/10.3390/nu12020457>
- Kristanti, A. N., N. S. Aminah, M. Tanjung, dan B. Kurniadi. 2008. Buku Ajar Fitokimia. Surabaya: Airlangga University Press. Hal. 23, 47.
- Kumar, V. (2014). Antimicrobial activity of rhizome extract of *Acorus calamus* against different micro-organisms. *Octa Journal of Biosciences*, January 2019.
- Kwiecinski, J. M., & Horswill, A. R. (2020). *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.005>. *Staphylococcus*
- Lalani, S., & Poh, C. L. (2020). Flavonoids as antiviral agents for enterovirus A71 (EV-A71). *Viruses*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/v12020184>
- Latief. (2022). *Isolasi Senyawa Triterpenoid Ekstrak Etanol Daun Jeruju*. 16(February).
- Li, K. S., & Wah, C. S. (2017). Antioxidant and antibacterial activity of *Acorus calamus*. L leaf and rhizome extracts 1 Antioksidan dan aktivitas antibakterial ekstrak daun dan rizoma *Acorus calamus*. L. In *Jurnal Gizi Klinik Indonesia* (Vol. 13, Issue 4). <https://jurnal.ugm.ac.id/jgki>
- Ma, Y. L., Li, Q. M., Van Den Heuvel, H., & Claeys, M. (1997). Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(12), 1357–1364. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(199708\)11:12<1357::AID-RCM983>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(199708)11:12<1357::AID-RCM983>3.0.CO;2-9)
- Mamta, S., & Jyoti, S. (2012). Surface characteristics of posterior composites after polishing and toothbrushing. *Acta Odontologica Scandinavica*, 45(5), 337–346. <https://doi.org/10.3109/00016358709096356>
- Mandal, S.C., Mandal, V. dan Das, A.K., 2015, *Essentials of Botanical Extraction : Principles and Application*, Elsevier, 96
- Marliana, S.D., Saleh, C. 2011. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Fraksi n-Heksana, Etil asetat, dan Metanol dari Buah Labu Air (*Lagenari Siceraria* (*Morliana*)). *J. Kimia Mulawarman*, 8(2): 39-63
- Marliana, S. D., V. Suryanti, dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium*

- edule Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*, 3 (1). Pp. 26-31.
- Marliana, S. D., V. Suryanti, dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*, 3 (1). Pp. 26-31.
- Masduqi A. F dan Muhammad Ryan R. R., 2021. Determinasi Total Flavonoid Dan Total Fenolik Rimpang Jeringau (*Acorus Calamus L.*) Dengan Perbedaan Konsentrasi Pelarut. *Media Farmasi Indonesia* Vol 16 No 1.
- Maulita Cut Nuria, Enny Puji Astuti, S. (2010). *Antibacterial Activities of Ethyl Acetate Fraction of Methanol Extract from Sosor Bebek Leaves (Kalanchoe pinnata Pers.)*. *Mediagro*, 6(2), 51–61.
- Megawati, & Ulinuha, A. Y. (2015). Ekstraksi Pektin Kulit Buah Naga (Dragon Fruit) Dan Aplikasinya Sebagai Edible Film. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*, 3(1), 16–23. <https://doi.org/10.15294/jbat.v3i1.3097>
- Mohammed, G. J., & Hameed, I. H. (2018). Anti-fungal, antitumor and anti-inflammatory activity of *Acorus calamus*. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, 9(3), 254–258. <https://doi.org/10.5958/0976-5506.2018.00218.8>
- Muchtaromah, B., Hayati, A., & Agustina, E. (2019). Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of *Acorus calamus L.* Extracts. *Jurnal Biodjati*, 4(1), 68–78. <https://doi.org/10.15575/biodjati.v4i1.4235>
- Muhridja, Melisa., Bialangi, Nurhayati., dan Musa, J. A. Weny. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Repellent Nyamuk dari Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calammus*). *Jurnal Entropi*, 11(2), 176-184.
- 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), 44-51.
- Nia, M. M. ., Amiri, H., & Jazi, B. (2010). Dielectric constants of water, methanol, ethanol, butanol and acetone: Measurement and computational study. *Journal of Solution Chemistry*, 39(5), 701–708. <https://doi.org/10.1007/s10953-010-9538-5>
- Nugroho, K.M.D., Supartono., dan Harjono., 2016, isolasi Senyawa Bioaktif Batang Pisang Ambon (*Musa parasidiaca* var. *Sapientum*) Sebagai Bahan Baku Antibakteri, *Indonesian Journal of Chemical Science*, 5(3), 2252-6951.
- Paithankar, V. V., Belsare, S. L., M., C. R., & V., V. J. (2011). International Journal of Biomedical Research. *International Journal of Biomedical Research*, 10(2), 518–529.

- Pelczar, M. J., Chan, E. C. S., 1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Pollitt, E. J. G., Szkuta, P. T., Burns, N., & Foster, S. J. (2018). Staphylococcus aureus infection dynamics. *PLoS Pathogens*, 14(6), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007112>
- Prawiroharsono, Suyanto 2011. Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan. Yogyakarta:FMIPA UGM
- Purwanti, N. U. (2020). *European Journal of Biomedical AND Pharmaceutical sciences The Effect Of Total Phenol And Flavonoid Total Compounds Of The N- Butanol And Ethyl Acetate Fraction Of Acorus Sp . To Antibacterial Machine Translated by Google*. 7(353), 353–364.
- Rajput, S. B., Tonge, M. B., & Karuppayil, S. M. (2014). 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>
- Ranjha, M. M. A. N., Irfan, S., Lorenzo, J. M., Shafique, B., Kanwal, R., Pateiro, M., Arshad, R. N., Wang, L., Nayik, G. A., Roobab, U., & Aadil, R. M. (2021). Sonication, a potential technique for extraction of phytoconstituents: A systematic review. *Processes*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/pr9081406>
- Rita, W. S., Swantara, I. M. D., & Utami, G. A. P. (2019). Antimicrobial activity of *Acorus calamus* L. rhizome extract and its total flavonoid and phenolic contents. *AIP Conference Proceedings*, 2155(September). <https://doi.org/10.1063/1.5125558>
- Sa'adah, L. (2010). Isolasi dan identifikasi senyawa tanin dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Safrina, Nina., Susanti, Ressi., dan Sari, Rafika. 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*-265, 45(6), 409-413.
- Saman, S. I., Bialangi, N., & Musa, W. J. A. (2013). Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Flavonoid Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Rimpang Jeringau. In *Pendidikan Kimia* (Vol. 1, Issue 1, pp. 1–10).
- Sankari, G. et al. (2010) *Analysis of serum immunoglobulins using Fourier transform infrared spectral measurements. Biology and Medicine*, 2010; V, Biology and Medicine.

- Sangi, M., M.R.J. Runtuwene., H.E.I. Simbala., V.M.A. Makang. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di kabupaten Minahasa Utara. *Chem. Prog.* 1(1):47-53.
- Sekarsari, S., I Wayan Rai, W.& Agung, N.A.J. 2019. Pengaruh suhu dan waktu ekstraksi dengan gelombang ultrasonik terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan.* 8(3), 267-277.
- Selvakumar, P., Badgeley, A., Murphy, P., Anwar, H., Sharma, U., Lawrence, K., & Lakshmikuttyamma, A. (2020). Flavonoids and Other Polyphenols Act as Epigenetic Modifiers in Breast Cancer. *Nutrients*, 12, 1–18. <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.30614>
- Setyantoro, M. E., Haslina, H., & Wahjuningsih, S. B. (2019). Pengaruh Waktu Ekstraksi Dengan Metode Ultrasonik Terhadap Kandungan Vitamin C, Protein, Dan Fitokimia Ekstrak Rambut Jagung (*Zea mays L.*). *Jurnal Teknologi Pangan Dan Hasil Pertanian*, 14(2), 53.
- Shi, X., Niu, L., Zhao, L., Wang, B., Jin, Y., & Li, X. (2018). The antiallergic activity of flavonoids extracted from Citri Reticulatae Pericarpium. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(4), 1–7. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13588>
- 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>
- Sofyan A, Widodo E, Natsir H. (2017) Komponen Bioaktif, Aktivitas Antioksidan Dan Profil Asam Lemak Ekstrak Rimpang Jeringau Merah (*Acorus sp*) Dan Jeringau Putih (*Acorus calamus*). *Jurnal Teknologi Pertanian*. XVIII(3):176.
- Srividya, A. R., Aishwaria, S. N., dan Vishnuvarhan, V. J. 2014. *Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxicity Activity of Hydroethanolic Extract and its Fraction of Acorus calamus Linn. Journal International for Pharmaceutical*, 3(1): 114-125.
- Sriwahyuni I. 2010. Uji fitokimia ekstrak tanaman anting-anting (*Acalypha Indica Linn*) dengan variasi pelarut dan uji toksisitas menggunakan brine shrimp (*artemia salina leach*). Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Stahl, E., 1985, Analisis Obat Secara kromatografi dan Mikroskopi, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, 3-17, ITB, Bandung.
- Suhaenah, A., Pratama, M., & Amir, A. H. W. (2021). *Penetapan Kadar*

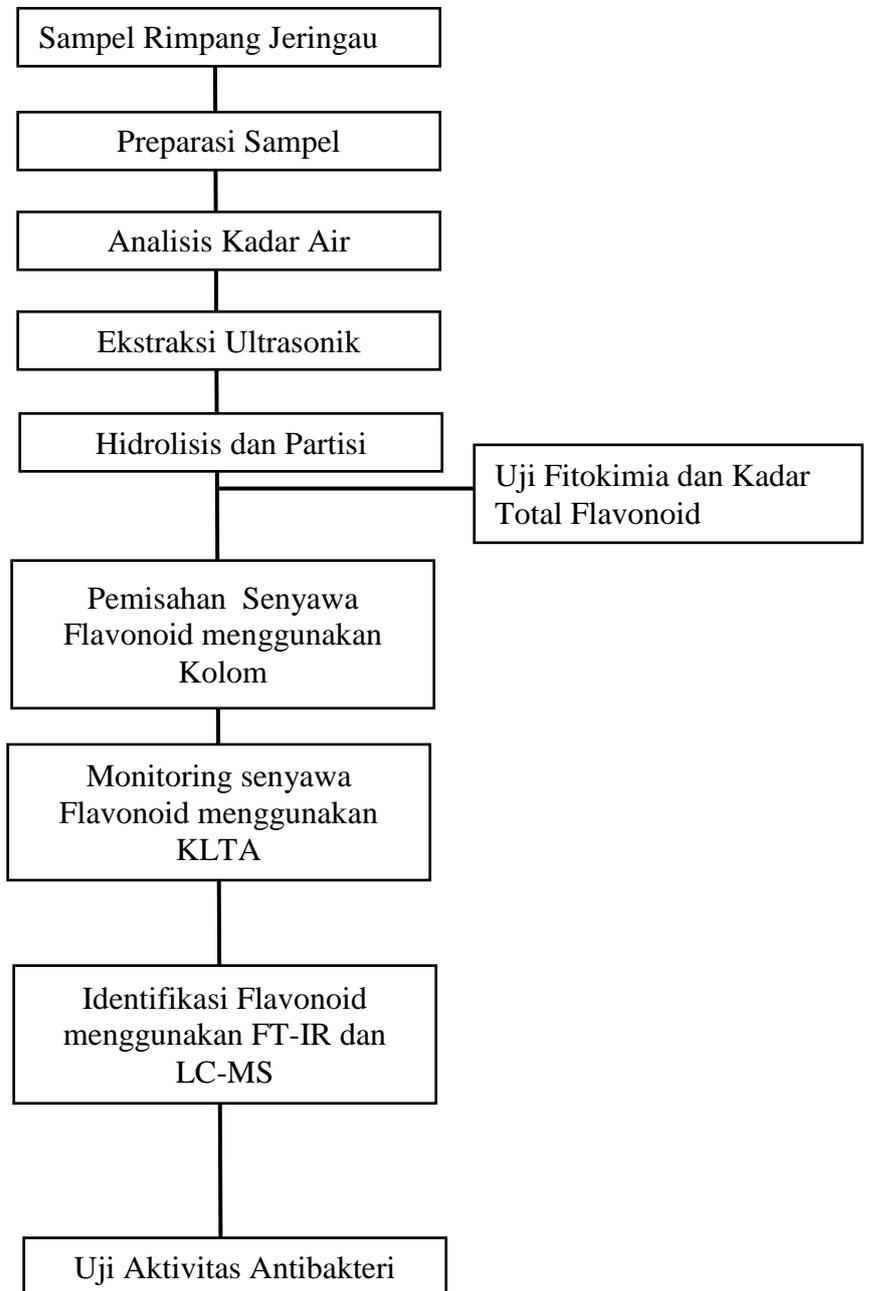
Flavonoid Fraksi Etil Asetat Daun Karet Kebo (Ficus Elastica) Dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS. 13(1), 6.

- Sukmawati, N.A. (2015). Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Dlingo (*Acorus calamus Linn*). Skripsi, Universitas Sebelas Maret.
- Sulistyarini, I., Sari, D. A., & Wicaksono, T. A. (2019). Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, 56–62.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Torres, N. M., Talavera, T. A., Andrews, H. E., Contreras, A. S., dan Pacecho, N. 2017. *Ultrasond Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compound from Vegetable Sources. Agronomy*, 7 (47): 1-19.
- Wahyuni, A., Kadir, A., & Najib, A. (2012). Isolasi Dan Identifikasi Komponen Kimia Fraksi N-Heksana Daun Tumbuhan Jeringau (*Acorus calamus Linn.*). *Jurnal Ilmiah As-Syifaa*, 4(1), 58–64. <https://doi.org/10.33096/jifa.v4i1.143>
- Wendersteyt, N. V., Wewengkang, D. S., & Abdullah, S. S. (2021). Uji Aktivitas Antimikroba Dari Ekstrak Dan Fraksi Ascidian *Herdmania Momus* Dari Perairan Pulau Bangka Likupang Terhadap Pertumbuhan Mikroba *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* DAN *Candida albicans*. *Pharmacon*, 10(1), 706. <https://doi.org/10.35799/pha.10.2021.32758>
- Wijaya, A., & Noviana. (2022). Penetapan Kadar Air Simplisia Daun Kemangi (*Ocimum Basilicum L.*) Berdasarkan Perbedaan Metode Determination Of The Water Content Of Basil Leaves Simplicia (*Ocimum Basilicum L.*) Based On Different Drying Methods. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, 4(2), 185–199.
- Wulandari R., Muhamad A.W., dan Delima F.L., 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Rimpang Jeringau Merah (*Acorus calamus Linn.*) terhadap pertumbuhan *Shigella flexneri* secara in vitro. *Jurnal Cerebellum*. Volume 1 Nomor 4. November 2015.
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., & Ren, L. (2014). Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 132–149. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140916113443>
- Yende, S.R., Harle, U.N., Rajgure, D.T., Tuse, T.A., Vyawahare, N.S., 2008. *Pharmacogn. Rev.* 2, 22–26.

- Yuan, G., Guan, Y., Yi, H., Lai, S., Sun, Y., & Cao, S. (2021). Antibacterial activity and mechanism of plant flavonoids to gram-positive bacteria predicted from their lipophilicities. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90035-7>
- Yuliantari, N.W.A., I.W.R. Widarta dan I.D.G.M. Permana. 2017. Pengaruh suhu dan waktu ekstraksi terhadap kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan daun sirsak (*Annona muricata* L.) menggunakan ultrasonik. *Scientific Journal of Food Technology*. *4*(1): 35-42.
- Zeng, Y., Song, J., Zhang, M., Wang, H., Zhang, Y., & Suo, H. (2020). Comparison of in vitro and in vivo antioxidant activities of six flavonoids with similar structures. *Antioxidants*, *9*(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antiox9080732>
- Zenta, F., & Kumanireng, H.A.S. 1999. Teknik Laboratorium Kimia Organik. Makassar: Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin
- Zhen, X., Lundborg, C. S., Zhang, M., Sun, X., Li, Y., Hu, X., Gu, S., Gu, Y., Wei, J., & Dong, H. (2020). Clinical and economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a multicentre study in China. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60825-6>
- Zuhra, C.F.J.B., Tarigan dan H, Sihotang. 2008. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid Dari Daun Katuk (*Sauropus Andrognus* (L) Merr.) *Jurnal Biologi Sumatera*, *3* (1): 7 – 10 ISSN1907-5537.

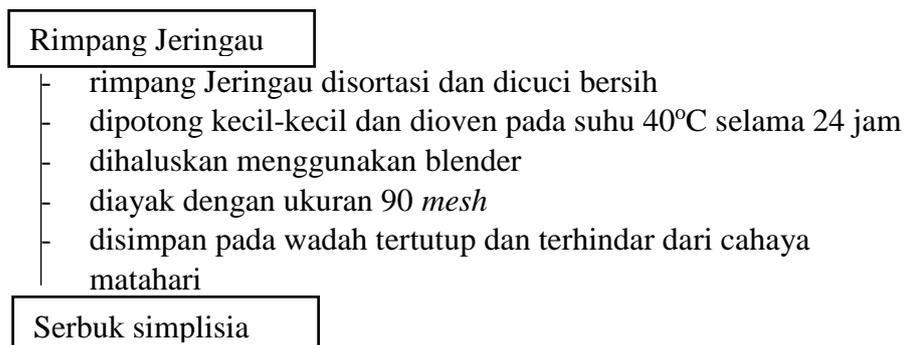
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian

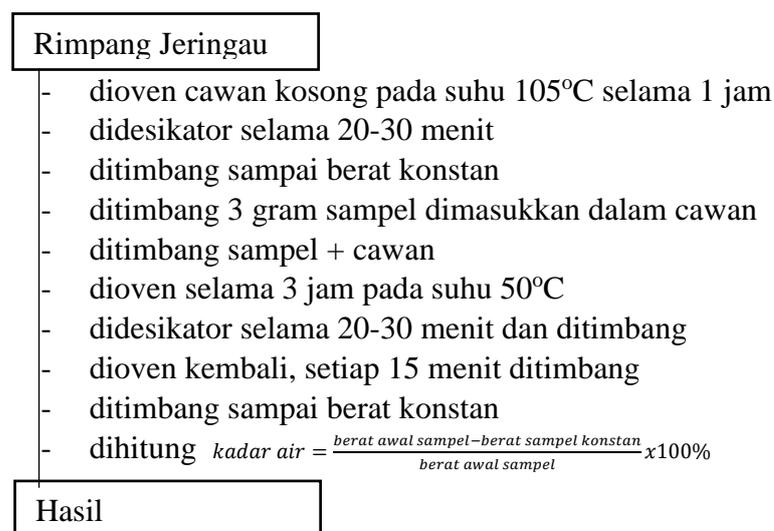


Lampiran 2. Skema Kerja

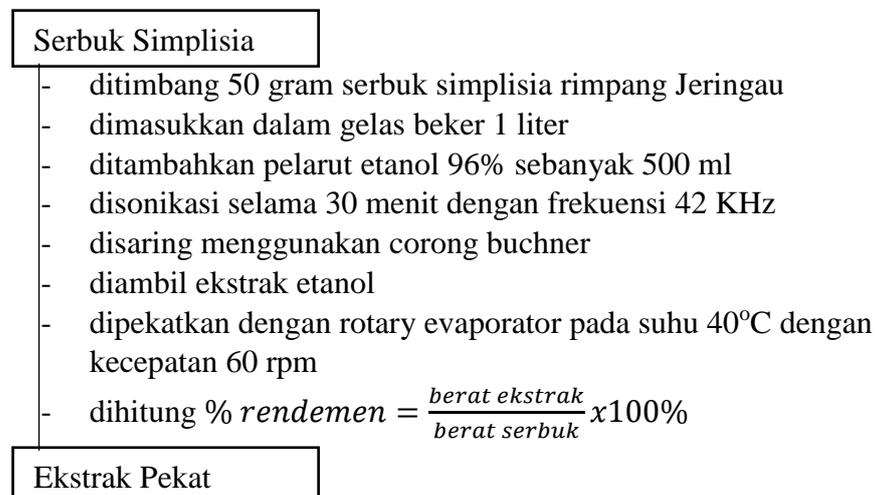
a. Preparasi Sampel

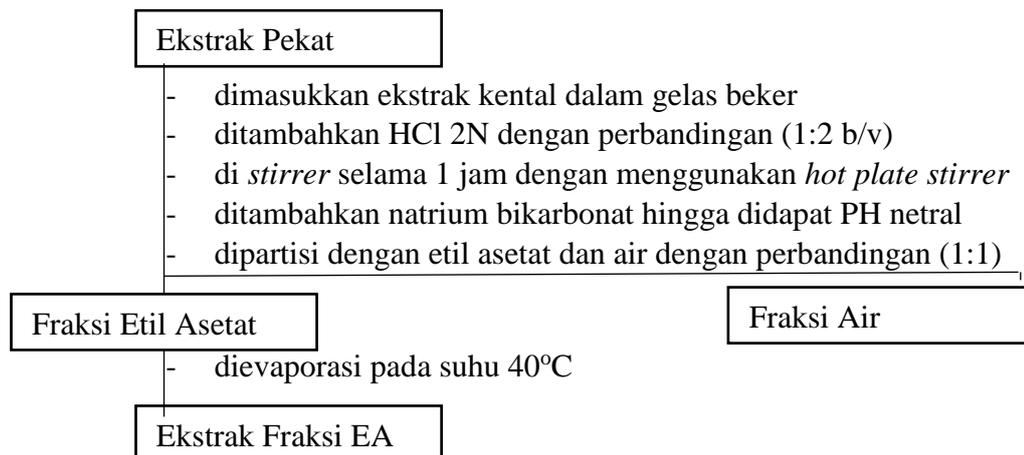
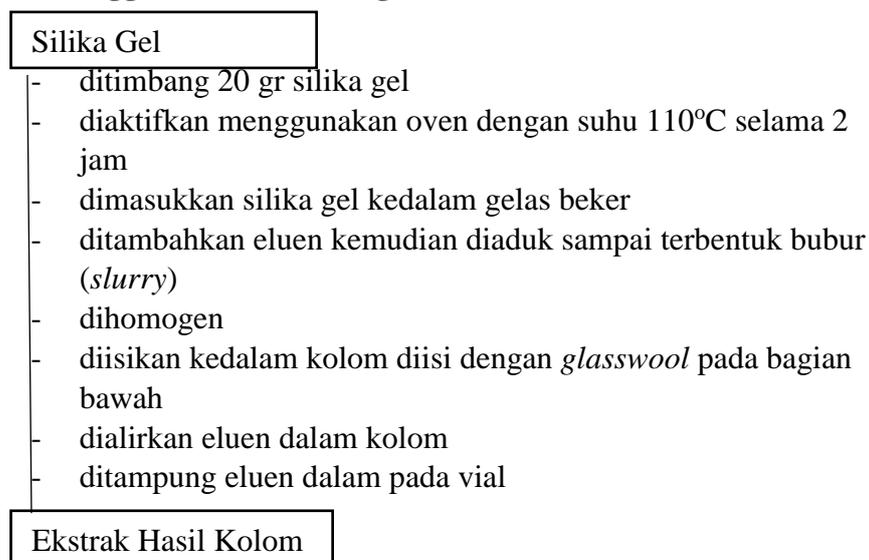


b. Analisis Kadar Air

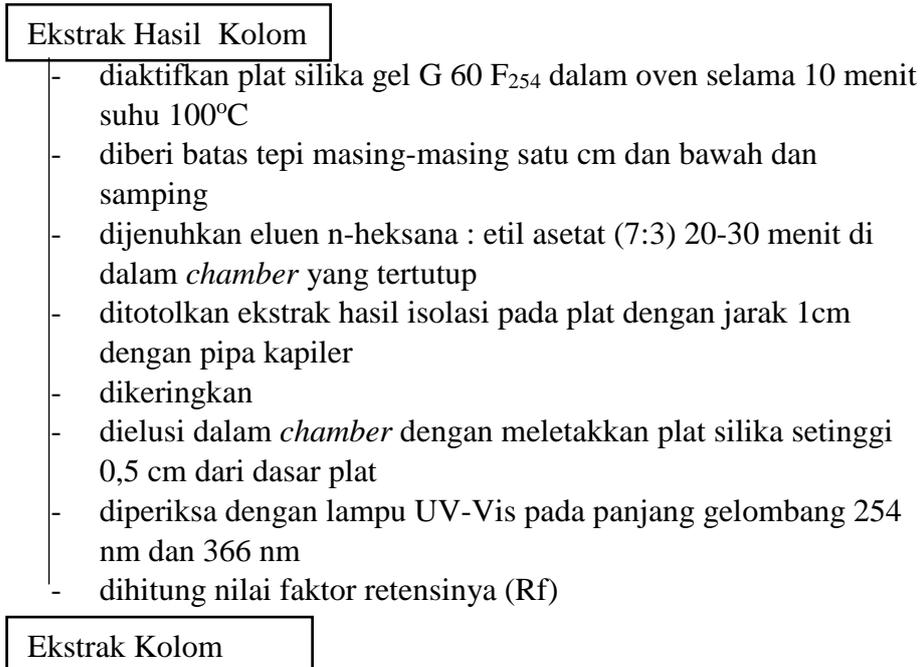


c. Ekstraksi Sampel



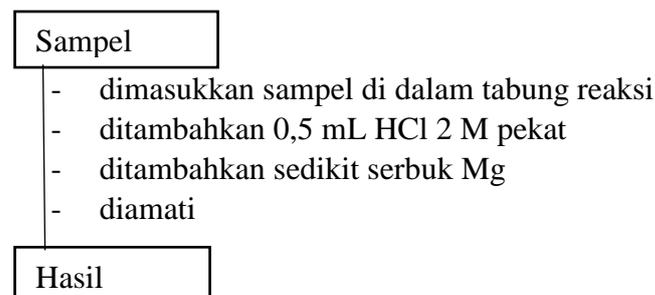
d. Hidrolisis dan Partisi**e. Pemisahan Menggunakan Kromatografi Kolom**

f. Monitoring Menggunakan KLTA

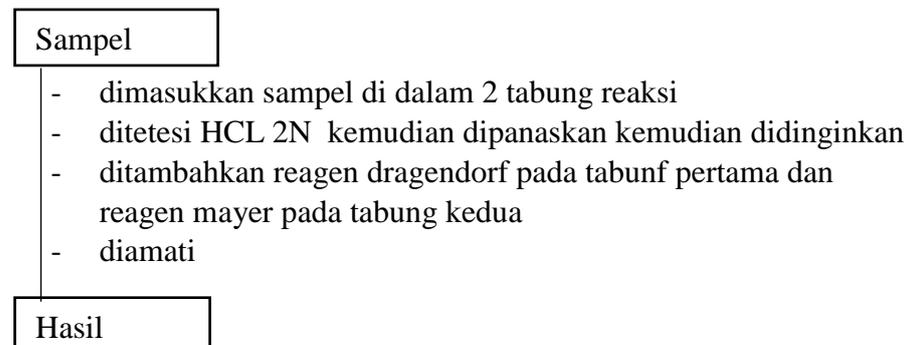


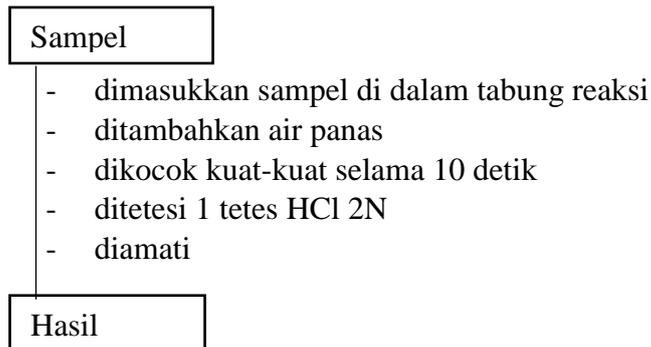
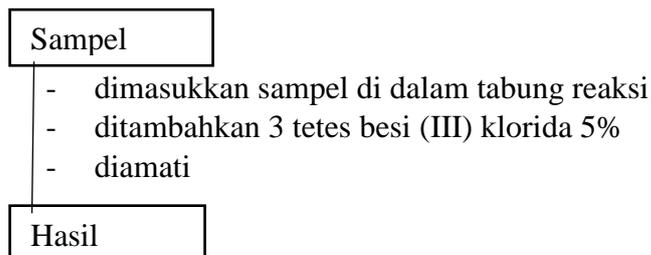
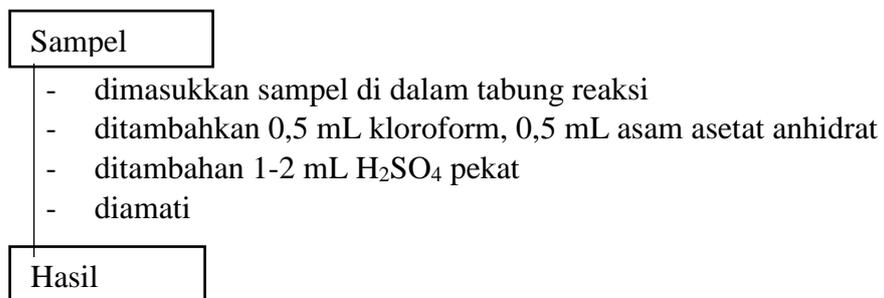
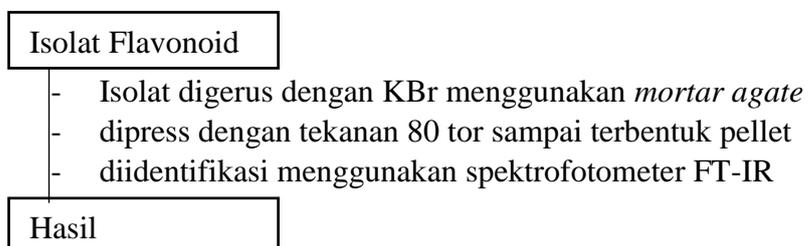
g. Uji Fitokimia

Uji Flavonoid



Uji Alkaloid



Uji Saponin**Uji Tanin****Uji Terpenoid****h. Identifikasi Senyawa Flavonoid Menggunakan FT-IR**

i. Uji Aktivitas Antibakteri

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan Bahan

- dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus kertas
- dimasukkan alat dan bahan untuk uji bakteri kedalam autoklaf
- disterilisasi selama 15 menit pada suhu 120°C dengan tekanan 1 atm

Hasil

Pembuatan Media NA

Agar NA

- ditimbang 2 gram agar NA dimasukkan erlenmeyer
- dilarutkan dalam 100 mL aquades
- dipanaskan hingga mendidih dengan diaduk hingga homogen
- dituang larutan agar NA kedalam cawan petri dan ditutup
- disterilisasikan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Didiamkan hingga memadat

Hasil

Pembuatan Media NB

Sampel

- ditimbang 0,8 g NB dan dimasukkan dalam gelas beker
- dilarutkan dalam 100 mL aquades
- dipanaskan hingga mendidih
- ditutup gelas beker menggunakan kapas, dirapatkan dengan plastik wrap kemudian dibungkus dengan aluminium foil
- disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

Hasil

Peremajaan Bakteri Uji *Staphylococcus aureus*

Isolat murni bakteri

- diambil 1 ose bakteri biakan murni dengan jarum ose yang disterilkan
- diinokulasikan dalam media NA dengan cara digoreskan secara aseptik
- ditutup
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator
- disimpan dalam kulkas untuk regenerasi dan akan dipanen setelah 24 jam

Hasil

Pembuatan Inokulum Bakteri

Bakteri hasil peremajaan

- diambil 1 ose bakteri uji dan dimasukkan dalam 10 ml NB
- ditambahkan dalam 10 ml media cair NB pada tabung reaksi
- diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C dalam inkubator

Hasil

Pengujian Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram

Isolat Flavonoid

- dibuat pada berbagai macam konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 5,25%, dan 3,125%
- dilarutkan pada pelarut DMSO 10% (b/v)
- dipanaskan media NA
- didinginkan hingga suhu 40°C
- diambil sebanyak 15 mL NA
- ditambahkan 0,1 ml bakteri uji dari media NB
- dihomogenkan dan dibiarkan memadat
- diletakkan kertas cakram 5 mm yang sudah direndam dalam ekstrak flavonoid pada masing-masing konsentrasi
- kertas tersebut diletakkan media inokulum selama 24 jam pada suhu 37°C
- diamati zona bening yang terbentuk

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan, Pembuatan Larutan dan Reagen

L.3.1 Pembuatan Larutan HCl 2N

Pengenceran HCl 2 N dari HCl pekat :

Konsentrasi = 37% atau 0,37

Densitas = 1,19 Kg/L atau 1190 g/L

Mr HCl : 36,46 g/mol

n = 1 (jumlah mol proton)

N HCl = n x Molaritas HCl

$$N \text{ HCl} = 1 \times \frac{\text{konsentrasi HCl pekat} \times \text{densitas HCl}}{\text{Mr HCl}}$$

$$N \text{ HCl} = 1 \times \frac{0,37 \times 1190 \text{ g/L}}{36,46 \text{ g/mol}}$$

$$N \text{ HCl} = 12,08 \text{ N}$$

Pengenceran HCl 2N =

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12,08 \text{ N} \times V_1 = 2 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{2 \text{ N} \times 100 \text{ mL}}{12,08 \text{ N}}$$

$$V_1 = 16,56 \text{ mL}$$

Larutan HCl 2N dibuat dengan melarutkan HCl pekat 37% sebanyak 16,56 mL dalam labu ukur 100 mL menggunakan aquades. Larutan kemudian dihomogenkan dan ditandabatkan.

L.3.2 Pembuatan Larutan Uji Antibakteri

a. Ekstrak dengan konsentrasi 60%

$$\text{Massa sampel} = 600 \text{ mg} \times 1 \text{ mL} = 600 \text{ mg/mL}$$

Sebanyak 0,60 g ekstrak dilarutkan dengan pelarutnya sampai volume 1 mL, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 60% sebanyak 1 mL.

b. Ekstrak dengan konsentrasi 50%

$$\text{Massa sampel} = 500 \text{ mg} \times 1 \text{ mL} = 500 \text{ mg/mL}$$

Sebanyak 0,50 g ekstrak dilarutkan dengan pelarutnya sampai volume 1 mL, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 50% sebanyak 1 mL.

c. Ekstrak dengan konsentrasi 40%

$$\text{Massa sampel} = 400 \text{ mg} \times 1 \text{ mL} = 400 \text{ mg/mL}$$

Sebanyak 0,40 g ekstrak dilarutkan dengan pelarutnya sampai volume 1 mL, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 40% sebanyak 1 mL.

d. Ekstrak dengan konsentrasi 30%

$$\text{Massa sampel} = 300 \text{ mg} \times 1 \text{ mL} = 300 \text{ mg/mL}$$

Sebanyak 0,30 g ekstrak dilarutkan dengan pelarutnya sampai volume 1 mL, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 30% sebanyak 1 mL.

e. Ekstrak dengan konsentrasi 20%

$$\text{Massa sampel} = 200 \text{ mg} \times 1 \text{ mL} = 200 \text{ mg/mL}$$

Sebanyak 0,20 g ekstrak dilarutkan dengan pelarutnya sampai volume 1 mL, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 20% sebanyak 1 mL.

L.3.4 Pembuatan NaCO₃ 5%

Natrium bikarbonat dibuat dengan cara menimbang sebanyak 5 gram kemudian dilarutkan dengan sedikit aquades dalam beaker glass. Selanjutnya larutan dimasukkan dalam labu takar 100 mL dan ditanbataskan.

L.3.5 Pembuatan Larutan Etanol 70%

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 99,9\% = 300 \text{ mL} \times 70\%$$

$$V_1 = \frac{300 \text{ mL} \times 70\%}{99,9\%}$$

$$V_1 = 210 \text{ mL}$$

Cara pembuatan etanol 70% dari etanol p.a maka dilakukan pengenceran. Dimasukkan sebanyak 210 mL larutan etanol p.a kedalam 300 mL labu ukur. Ditambahkan aquades sampai tandabatas.

Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan

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

Tabel L.4.1.1 Data berat cawan kosong

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (g)				Berat Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	58,6673	58,6609	58,6601	58,6599	58,6597
A2	57,1222	57,1160	57,1157	57,1156	57,1156
A3	54,8959	54,8897	54,8887	54,8886	54,8886

Keterangan: A adalah cawan dan P adalah ulangan. Data 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.4.1.2 Data berat cawan + sampel

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (g)				Berat Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	59,1597	59,1231	59,1206	59,1198	59,1198
A2	57,6157	57,5776	57,5770	57,5764	57,5764
A3	55,3888	55,3514	55,3510	55,3509	55,3510

Keterangan: A adalah cawan dan P adalah ulangan. Data berat konstan yang diperoleh adalah data berat cawan + sampel konstan yang akan dihitung kadar airnya.

1. Kadar air sampel pada cawan A1

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

2. Kadar air sampel pada cawan A2

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\
 &= \frac{(57,6157 - 57,5764) \text{ g}}{(57,6157 - 57,1156) \text{ g}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,0393}{0,5001} \times 100\% \\
 &= 7,86\%
 \end{aligned}$$

3. Kadar air sampel pada cawan A3

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

$$= \frac{0,0378}{0,5000} \times 100$$

$$= 7,56\%$$

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

$$\text{Kadar air rata-rata} = \frac{\text{kadar air pada cawan 1+2+3}}{3} \times 100\%$$

$$= \frac{7,98\%+7,86\%+7,56\%}{3} \times 100\%$$

$$= \frac{23,4\%}{3} \times 100\%$$

$$= 7,80\%$$

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

Tabel L.4.2.1 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

Rendemen ulangan 1

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

$$= \frac{5,3984 \text{ g}}{30 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 17,99\%$$

Rendemen ulangan 2

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

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

$$= 18,83\%$$

Rendemen ulangan 3

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

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

$$= 18,06\%$$

Rendemen ulangan 4

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

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

$$= 20,03\%$$

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

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen rata-rata} &= \frac{\text{Rendemen ulangan (1+2+3+4)}}{4} \times 100\% \\
 &= \frac{17,99\%+18,83\%+18,06\%+20,03\%}{4} \times 100\% \\
 &= \frac{23,4\%}{4} \times 100\% \\
 &= 18,73\%
 \end{aligned}$$

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

Tabel L.4.3.1 Data hasil partisi menggunakan pelarut etil asetat

Ulangan	Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah+ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (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

Rendemen fraksi etil asetat 1

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

Rendemen fraksi etil asetat 2

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

Rendemen fraksi etil asetat 3

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

Rendemen fraksi etil asetat 4

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

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 Data Uji Aktivitas Antibakteri

a. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70%

Tabel L.4.4.1 Data hasil antibakteri ekstraksi etanol 70%

Konsentrasi (%)	Ulangan I		Ulangan II		Ulangan III		Rata-rata
	I	II	I	II	I	II	
60	5.4	5.35	4.2	5.3	4.2	2.8	4.54
50	4	4.9	3.8	5.2	3.8	1.2	3.81
40	3.2	4.1	3.8	3.5	3.9	3.6	3.68
30	2.1	2.5	3.4	2.3	2.3	3.3	2.65
20	1.8	1.1	2.8	1.7	2.6	3.8	2.3
K+	21	20	21.5	24.1	24.6	22.8	22.33
K-	0	0	0	0	0	0	0

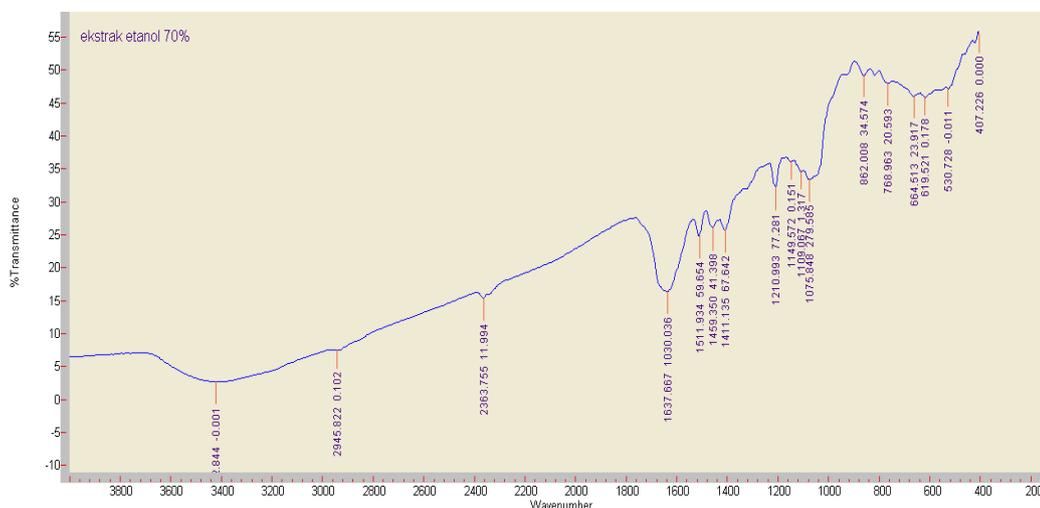
b. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat

Tabel L.4.4.2 Data hasil antibakteri fraksi etil asetat

Konsentrasi (%)	Ulangan I		Ulangan II		Ulangan III		Rata-rata
	I	II	I	II	I	II	
60	6	4.5	4.4	6.45	5.2	5.2	5.29
50	5.2	4.2	6.3	5.4	4.5	3.5	4.85
40	4.15	4.8	4.5	4.9	3.85	4.05	4.37
30	3.1	3.7	2.55	3.4	1.3	3.5	2.92
20	2.55	3.8	2.5	2.6	2.7	1.6	2.62
K+	21.5	25.7	22.6	21.2	21.1	18.1	21.7
K-	0	0	0	0	0	0	0

L.4.5 Gambar Hasil Identifikasi Senyawa Aktif Menggunakan FTIR

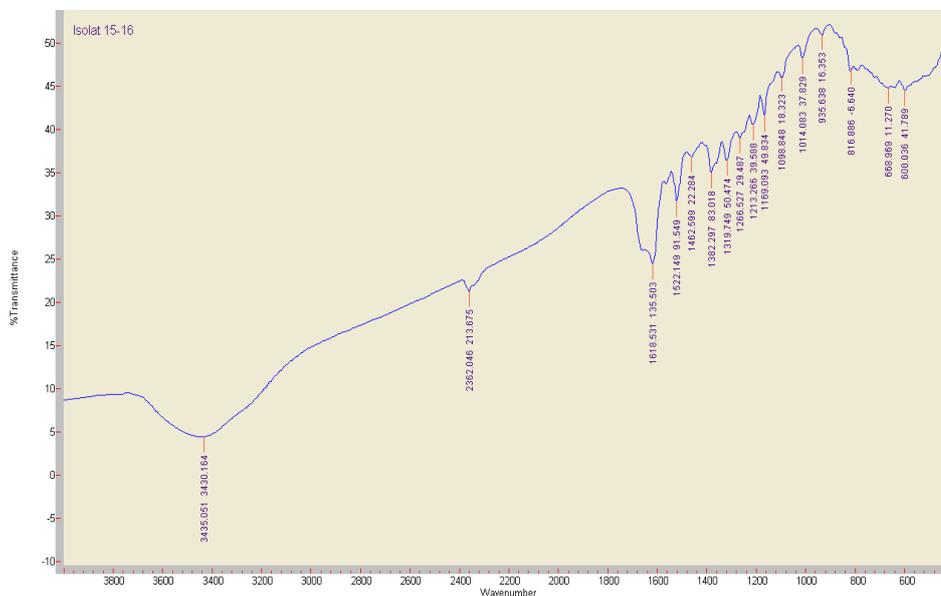
a. Ekstrak Etanol 70%



b. Fraksi Etil Asetat

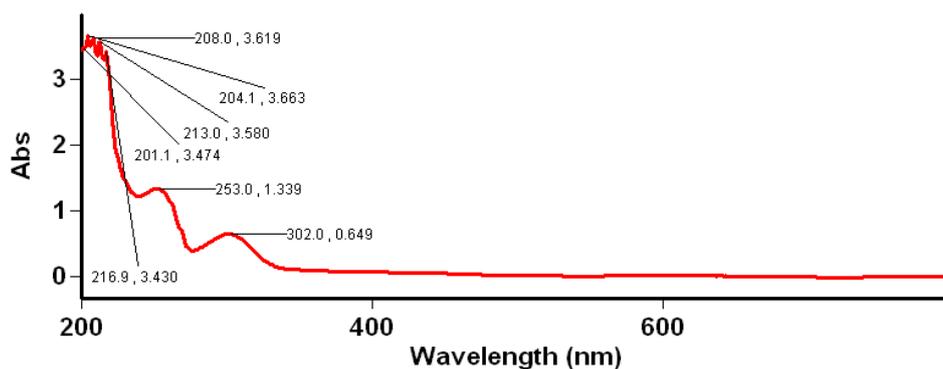


c. Isolat Hasil Kolom

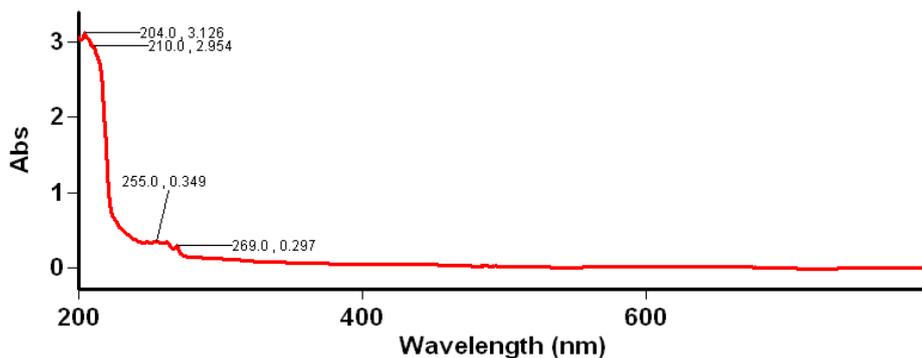


L.4.6 Gambar Hasil Identifikasi Senyawa Aktif Menggunakan UV-Vis

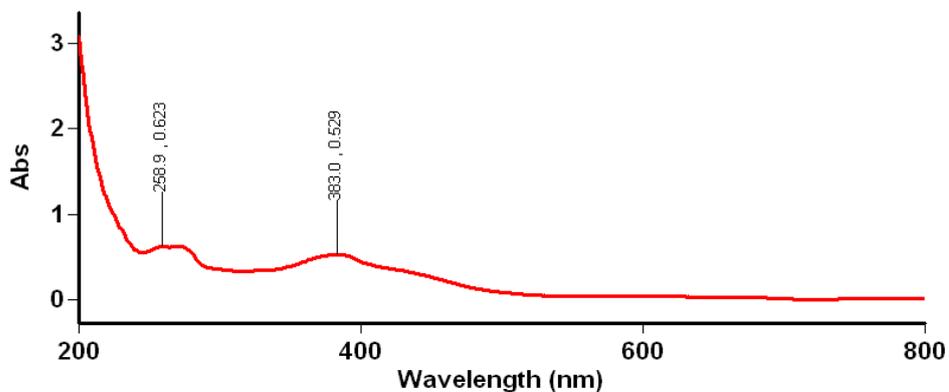
a. Ekstrak Etanol 70%



b. Fraksi Etil Asetat



c. Isolat Hasil Kolom



L.4.7 Data Hasil Analisis Two Way Anova Menggunakan SPSS

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Hambatan	.096	60	.200*	.966	60	.091

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Variasi Konsentrasi	1	60%	12
	2	50%	12
	3	40%	12
	4	30%	12
	5	20%	12
Jenis Pelarut	1	Ekstrak Etanol 70%	30
	2	Fraksi Etil Asetat	30

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Zona Hambat Antibakteri

Variasi Konsentrasi	Jenis Pelarut	Mean	Std. Deviation	N
60%	Ekstrak Etanol 70%	4.5417	1.02295	6
	Fraksi Etil Asetat	5.1333	.75277	6
	Total	4.8375	.91033	12
50%	Ekstrak Etanol 70%	3.8167	1.41197	6
	Fraksi Etil Asetat	4.8500	.98944	6
	Total	4.3333	1.28157	12
40%	Ekstrak Etanol 70%	3.6833	.31885	6
	Fraksi Etil Asetat	4.4000	.40000	6
	Total	4.0417	.50894	12
30%	Ekstrak Etanol 70%	2.6500	.55767	6
	Fraksi Etil Asetat	2.9333	.88694	6
	Total	2.7917	.72169	12
20%	Ekstrak Etanol 70%	2.3000	.96333	6
	Fraksi Etil Asetat	2.6333	.70048	6
	Total	2.4667	.82168	12
Total	Ekstrak Etanol 70%	3.3983	1.20176	30
	Fraksi Etil Asetat	3.9900	1.25872	30
	Total	3.6942	1.25604	60

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Zona Hambat Antibakteri

F	df1	df2	Sig.
1.089	9	50	.388

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Konsentrasi + Sampel +
Konsentrasi * Sampel

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Zona Hambat Antibakteri

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	56.262 ^a	9	6.251	8.489	.000
Intercept	818.812	1	818.812	1111.950	.000
Konsentrasi	49.893	4	12.473	16.939	.000
Sampel	5.251	1	5.251	7.131	.010
Konsentrasi * Sampel	1.117	4	.279	.379	.822
Error	36.819	50	.736		
Total	911.893	60			
Corrected Total	93.080	59			

a. R Squared = .604 (Adjusted R Squared = .533)

Estimated Marginal Means

1. Variasi Konsentrasi

Dependent Variable: Zona Hambat Antibakteri

Variasi Konsentrasi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
60%	4.838	.248	4.340	5.335
50%	4.333	.248	3.836	4.831
40%	4.042	.248	3.544	4.539
30%	2.792	.248	2.294	3.289
20%	2.467	.248	1.969	2.964

2. Jenis Pelarut

Dependent Variable: Zona Hambat Antibakteri

Jenis Pelarut	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Ekstrak Etanol 70%	3.398	.157	3.084	3.713
Fraksi Etil Asetat	3.990	.157	3.675	4.305

3. Variasi Konsentrasi * Jenis Pelarut

Dependent Variable: Zona Hambat Antibakteri

Variasi Konsentrasi	Jenis Pelarut	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
60%	Ekstrak Etanol 70%	4.542	.350	3.838	5.245
	Fraksi Etil Asetat	5.133	.350	4.430	5.837
50%	Ekstrak Etanol 70%	3.817	.350	3.113	4.520
	Fraksi Etil Asetat	4.850	.350	4.146	5.554
40%	Ekstrak Etanol 70%	3.683	.350	2.980	4.387
	Fraksi Etil Asetat	4.400	.350	3.696	5.104
30%	Ekstrak Etanol 70%	2.650	.350	1.946	3.354
	Fraksi Etil Asetat	2.933	.350	2.230	3.637
20%	Ekstrak Etanol 70%	2.300	.350	1.596	3.004
	Fraksi Etil Asetat	2.633	.350	1.930	3.337

Zona Hambat Antibakteri

Tukey HSD

Variasi Konsentrasi	N	Subset	
		1	2
20%	12	2.4667	
30%	12	2.7917	
40%	12		4.0417
50%	12		4.3333
60%	12		4.8375
Sig.		.885	.171

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .736.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b. Alpha = .05.

Comparisons for Zona Hambat

Tukey Pairwise Comparisons: Sampel

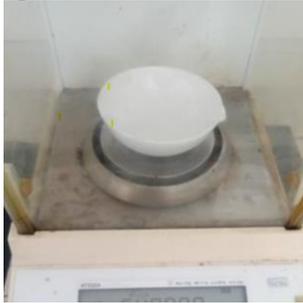
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Sampel	N	Mean	Grouping
2	5	4.016	A
1	5	3.398	B

Means that do not share a letter are significantly different.

L.8. Dokumentasi Penelitian

Uji Kadar Air



Ditimbang cawan porselen



Cawan porselen dioven



Cawan didesikator



Ditimbang cawan+sampel



Dioven cawan+sampel



Cawan+sampel didesikator

Ekstraksi Rimpang Jeringau



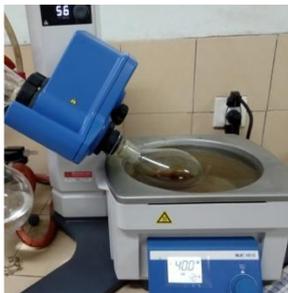
Sampel ditimbang



Sampel diekstraksi sonikasi



Filtrat hasil ekstraksi



Pemekatan Filtrat



Hasil pemekatan ekstrak etanol 70%

Hidrolisis dan Partisi



Ekstrak+HCl distirer selama 30 menit



Penambahan NaHCO_3 sampai netral



Terbentuk busa ketika ditambahkan NaHCO_3



PH diukur dengan indikator universal



Partisi menggunakan etil asetat



Hasil partisi dipekatkan



Fraksi ditimbang

Monitoring Eluen Terbaik Menggunakan KLTA



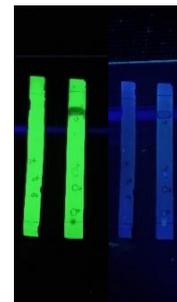
Aktivasi plat silika



Penjenuhan chamber



Proses elusi



dilihat dari UV

Pemisahan Menggunakan Kolom Kromatografi



Aktivasi silika gel



Pendinginan dengan desikator



Pembuatan kolom



Penjenuhan kolom



Proses elusi sampel



Hasil penampungan eluen



Aktivasi plat silika



Proses penotolan sampel pada plat



Proses elusi sampel pada KLTA



Hasil KLTA di bawah lampu UV 366 nm

Uji Aktivitas Antibakteri



Media NA+NB



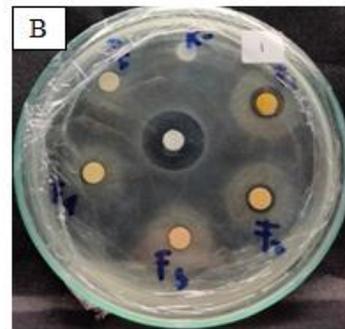
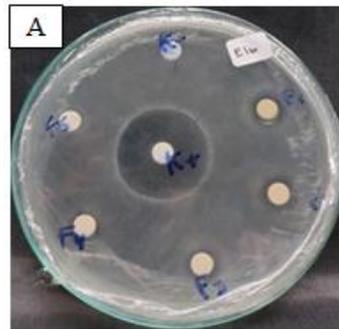
Peremajaan bakteri
S. aureus



Inokulum bakteri
S. aureus



Pembuatan
konsentrasi



Hasil uji aktivitas antibakteri