

**ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN UJI BIOAKTIVITAS ANTIBAKTERI
SENYAWA FLAVONOID DARI KULIT BATANG TUMBUHAN PUDAU
(*Artocarpus kemandu* Miq.)**

(Skripsi)

Oleh

**NUR ISTYQOMAH
NPM 1717011012**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2021**

ABSTRAK

ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN UJI BIOAKTIVITAS ANTIBAKTERI SENYAWA FLAVONOID DARI KULIT BATANG TUMBUHAN PUDAU (*Artocarpus kemando* Miq.)

Oleh

Nur Istyqomah

Tumbuhan pudau merupakan salah satu famili Moraceae, genus *Artocarpus*, dan spesies *Artocarpus kemando* Miq. Genus *Artocarpus* telah dilaporkan memiliki manfaat sebagai antimalaria, antibakteri, antikanker, antidiabetes, antioksidan, dan antivirus. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengkarakterisasi, serta menguji bioaktivitas antibakteri senyawa flavonoid yang terkandung dalam kulit batang tumbuhan pudau (*A. kemando* Miq.) yang diperoleh dari Dusun Karang Anyar, Klaten, Penengahan, Lampung Selatan.

Tahapan penelitian ini meliputi pengambilan dan persiapan sampel, ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan metanol, fraksinasi ekstrak dengan metode partisi, serta pemisahan dan pemurnian senyawa menggunakan metode kromatografi cair vakum dan kromatografi kolom. Kemurnian dan struktur molekul senyawa hasil isolasi ditentukan berdasarkan sifat fisika dan data spektrum UV-Vis, IR, dan NMR.

Pada penelitian ini, telah berhasil diisolasi senyawa berupa padatan kuning sebanyak 10 mg, dengan titik leleh 247–249 °C. Berdasarkan hasil analisis data spektroskopi serta perbandingan dengan literatur, menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan artoheterofilin C. Uji bioaktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* dari senyawa hasil isolasi yang dilakukan pada variasi konsentrasi 0,3; 0,4; 0,5 mg/disk pada kedua bakteri menunjukkan daya hambat kategori sedang.

Kata Kunci : *Artocarpus kemando*, flavonoid, artoheterofilin C, antibakteri

ABSTRACT

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND ANTIBACTERIAL BIOACTIVITY TEST OF FLAVONOID COMPOUND DERIVED FROM BARK OF PUDAU (*Artocarpus kemando* Miq.) PLANT

By

Nur Istyqomah

Pudau plant is part of the Moraceae family, *Artocarpus* genus and its species is *Artocarpus kemando* Miq. *Artocarpus* genus was reported to have anti-malaria, antibacterial, anti-cancer, anti-diabetic, antioxidant, and antiviral properties. This research is aimed to isolate, characterize, also testing the antibacterial bioactivity of the flavonoid compound derived from the wood bark of the pudau plant (*A. kemando* Miq.), taken from Karang Anyar Village, Klaten, Penengahan, South Lampung.

The steps of this research includes the collection and preparation of the sample, extraction with maceration using methanol, fractionation of the extract using partition method, and separation and purification using vacuum liquid chromatography and column chromatography. The purity and the structure of the isolation result compound determined based on the physical properties and UV-Vis, IR, and NMR spectrum data.

In this research, a compound with 10mg mass of yellow solids with 247-249°C melting point has been successfully isolated. Based on spectroscopy data and the comparison with literature, the isolation result compound was shown as artoheterophyllin C. Antibacterial bioactivity test of the isolation result compound against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* was done with 0.3; 0.4; 0.5 mg/disc concentration variations and the result was that the compound showed moderate category inhibition activity on both of the bacteria.

Keywords : *Artocarpus kemando*, flavonoid, artoheterophyllin C, antibacterial

**ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN UJI BIOAKTIVITAS ANTIBAKTERI
SENYAWA FLAVONOID DARI KULIT BATANG TUMBUHAN PUDAU
(*Artocarpus kemandu* Miq.)**

Oleh

Nur Istyqomah

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2021**

Judul Skripsi : **ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN UJI
BIOAKTIVITAS ANTIBAKTERI SENYAWA
FLAVONOID DARI KULIT BATANG TUMBUHAN
PUDAU (*Artocarpus kemando* Miq.)**

Nama Mahasiswa : **Nur Istyqomah**

No. Pokok Mahasiswa : 1717011012

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.
NIP 19540510 198803 2 001

Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S., M.S.
NIP 19560905 199203 1 001

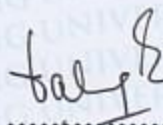
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 21 002

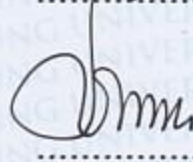
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

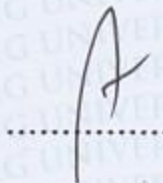
Ketua : **Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.**



Sekretaris : **Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S., M.S.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Drs. Aspita Laila, M.S.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, S.Si., M.T.
NIP. 19740705 200003 1 001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **26 November 2021**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nur Istyqomah
NPM : 1717011012
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **“Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Kulit Batang Tumbuhan Puda (Artocarpus kemando Miq.)”** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 17 Desember 2021
Yang menyatakan,



Nur Istyqomah
NPM. 1717011012

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Panca Marga, pada tanggal 10 Mei 1999 sebagai anak pertama dari dua bersaudara, anak dari pasangan Bapak Maulidin dan Ibu Kuswati Ningsih.

Penulis memulai jenjang pendidikannya di TK Citra Insani pada tahun 2003-2005, lalu melanjutkan Sekolah Dasar di SDS Citra Insani tahun 2005-2011, Sekolah Menengah Pertama di MTS Wali Songo tahun 2011-2012

dan SMP PGRI 2 Gunung Terang tahun 2012-2014, serta Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 1 Pagar Dewa tahun 2014-2017. Pada tahun 2017 penulis diterima sebagai mahasiswa di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Selama menjadi mahasiswa penulis menerima beasiswa Bidikmisi selama 4 tahun yakni tahun 2017-2021. Penulis mengikuti beberapa kegiatan organisasi sebagai Kader Muda Himaki (KAMI) periode 2017-2018, anggota Biro Kesekretariatan Himaki FMIPA Unila periode 2018-2019, dan anggota Biro Kesekretariatan Himaki FMIPA Unila periode 2019-2020. Saat menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten Praktikum Kimia Organik II semester genap tahun 2020/2021.

MOTTO

“Jika kamu berbuat baik (berarti) kamu berbuat baik untuk dirimu sendiri. Dan jika kamu berbuat jahat, maka (kerugian kejahatan) itu untuk dirimu sendiri.”
(Q.S. Al-Isra’ 17: Ayat 7)

“Aku sudah pernah merasakan semua kepahitan dalam hidup dan yang paling pahit ialah berharap kepada manusia, maka berharaplah hanya kepada Allah SWT.”
(Ali bin Abi Thalib)

“Karena semua orang melihat apa yang ingin mereka lihat, memang mudah menghakimi dari pada percaya, terkadang pikiran itu menghampiriku dan menyiksaku, tetapi semakin banyak hal yang aku lakukan aku menjadi semakin bersinar terang dan mereka takkan pernah bisa menyingkirkanku.”
(Blackpink-You’ll never know)

“Yakinlah bahwa dari semua masalah yang kita hadapi pasti ada hikmah yang terkandung di dalamnya, maka jangan menyerah apalagi menyalahkan keadaan karena Allah akan memberikan yang terbaik untuk hamba-Nya.”
(Nur Istyqomah)

“Aku akan melindungi keluargaku, bahkan jika aku memiliki banyak musuh di seluruh dunia.”
(Song Jinwo-Manhwa Solo Leveling)

“Kau boleh menangis, kau juga boleh lari, tapi kau tidak boleh menyerah!, tetap berjuang dan jangan lupa bersyukur dengan pencapaianmu selama ini, kamu hebat.”
(Nur Istyqomah)

PERSEMBAHAN

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya, sholawat dan salam selalu terlimpahkan kepada Rasulullah Muhammad SAW.

Kupersembahkan karya sederhana ini kepada orang terkasih dan tersayangku:

**Ibu dan Bapak Tercinta
(Ibu Kuswati Ningsih dan Bapak Maulidin)**

Kedua superheroku yang telah berjuang untuk mendidik, membesarkan, dan menyekolahkanku hingga bisa menjadi seorang sarjana. Terimakasih bu, pak, terimakasih selalu mendukung dan mendoakan mimpi putrimu ini.

**Adikku Tersayang
Anisa Rahmawati**

Yang menjadi salah satu alasan kakakmu ini terus berjuang mengejar mimpi agar memberikan contoh yang baik dan memotivasi dirimu.

**Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. dan Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri
A.S., M.S.**

Yang selalu membimbing saat penelitianku menemui jalan buntu, menyemangati saat semangatku mulai pudar, dan mendoakan yang terbaik untukku. Terimakasih telah menjadi orangtua kedua bagiku, semoga ibu dan bapak selalu sehat dan senantiasa diberikan kebahagiaan dunia dan akhirat.

**Teman-teman dan sahabatku
Yang selalu berbagi canda dan tawa**

Serta
Almamatrku Tercinta Universitas Lampung

SANWACANA

Alhamdulillah ya rabb.. Segala puji dan syukur kehadiran Allah SWT, atas segala nikmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains pada program studi kimia FMIPA Universitas Lampung yakni sebuah skripsi yang berjudul:

“Isolasi, karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Kulit Batang Tumbuhan Puda (Artocarpus kemandu Miq.)”.

Shalawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada suri tauladan insan, Nabi Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat, dan para pengikutnya, semoga kita termasuk umat yang mendapatkan *Syafa'at* Beliau di *Yaumul Akhir* kelak, aamiin.

Selama proses pengerjaan skripsi ini penulis tidak lepas dari bimbingan, dukungan, dan bantuan dari banyak pihak. Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan rasa terimakasih yang tulus kepada:

1. Superhero terhebat Ibu Kuswati Ningsih dan Bapak Maulidin, wanita tercantik di dunia dan lelaki pemberani, terimakasih atas cinta, kasih sayang, serta perjuangan besar yang telah diberikan dalam membesarkan, mendidik, dan mendukung segala mimpi penulis, semua hal yang ingin Isty capai semata-mata hanya untuk membahagiakan kalian berdua, semoga ibu dan bapak selalu sehat.
2. Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. selaku pembimbing I yang selalu membimbing penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah SWT mambalas semua kebaikan beliau.
3. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. selaku pembimbing II yang telah memberikan arahan dan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini, semoga Allah SWT membalas semua kebaikan beliau.

4. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S. selaku pembahas yang telah memberikan banyak masukan dan saran kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
5. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku pembimbing akademik yang telah mendengarkan keluh kesah penulis selama menjalani perkuliahan.
6. Ibu Noviany, Ph. D. selaku kepala laboratorium kimia organik yang telah mempermudah segala urusan penulis di laboratorium.
7. Bapak Mulyono, Ph. D. selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
8. Ibu dan bapak dosen Jurusan Kimia FMIPA Unila yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terimakasih atas ilmu bermanfaat yang telah diajarkan kepada penulis, semoga Allah SWT membalas segala kebaikan ibu dan bapak dosen.
9. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
10. Seluruh staf di Jurusan Kimia FMIPA Unila yang telah membantu dan memberi kemudahan penulis dalam menyelesaikan penelitian.
11. Adikku Anisa Rahmawati yang telah memberikan motivasi kepada penulis meskipun terkadang membuat kesal dan marah, terimakasih adikku semoga kamu bisa menjadi seseorang yang lebih baik dari kakakmu ini.
12. Keluarga besarku, Mbah Putri, Mbah Kakung, Pakde Kuswanto, Bude Ulfa, Bibi Siti, Om Iswar, Paman Su, Om Hardi, Bibi Naini, Bibi Vina dan Suami, Kak Biyan, kak Sahira, Dek Syaqi, Dek Shanum, Ikhsan, Rafi, Algi, Sofyan, semoga Allah SWT selalu memberikan kita nikmat-Nya yang tiada batas. Terkhusus untuk pakde dan bude terimakasih atas bantuannya selama ini, semoga Isty bisa membalas sedikit kebaikan kalian berdua.
13. Partner terhebat, Fitri Puspita Sari yang selalu menjadi teman bercerita, jalan-jalan, nonton anime, dan berjuang selama 4 tahun ini, serta Dhita Amarthani yang selalu menjadi bantuan besar saat penulis mengalami masalah baik tentang penelitian maupun kehidupan pribadi. Terimakasih untuk kalian berdua, kenangan nonton film sembari makan di kamar kos Dhita pasti akan menjadi kenangan yang tak terlupakan.

14. Anggota Griya Tawang, Fitri (BAe Ro Na), Dhita (Cheon Seo Jin), Erma (Ha Eun Byul), Panop (Oh Yoon Hee), Eci (Joo Seok Kyung), serta Rezka (Min Seol Ah), chingu seperhaluan yang memberikan asupan semangat disaat penulis ingin menyerah, terimakasih telah membuat bundadari Shim Sur Ryeon ini selalu semangat. Semoga pertemanan kita tidak berakhir meskipun sudah lulus.
15. Sahabat-sahabat terbaik penulis sejak SMA, Mak Ollan sang ibu ketiga, Indah pacar tercinta, Nelli si comel, Amalitik calon ibu dokter gratis, Enool kawan perhedonan, serta Nyoel si misterius, mereka selama 7 tahun ini selalu menjadi tempat pulang bagi penulis ketika kehilangan arah, terimakasih untuk semuanya, semoga pertemanan kita akan terus terjalin hingga tua nanti.
16. Teman-teman KKN Kelurahan Kuripan, Istiqomah, Zuama, Ana, Sultan, Vicky, dan Ica yang selalu memotivasi penulis untuk segera lulus.
17. Suami-suami dua dimensi dan tiga dimensiku, Tang San, Xiao Yan, Raphaelo Kedrey, Duke Floyen, Marquis Helio, Dekis Belliard, Dion Agriche, Jeremy Agriche, Satoru Gojo, Deris Kaleid, Nocton Edgar, Yustaf De Lachia, Ahin, Rudiger Vintervalt, Peilon, Izana, Dylan, Cale Henituse, Rupert Edgar, dan masih banyak lagi yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu, terimakasih selalu menjadi pembangkit semangat penulis para lelaki tampan.
18. Seluruh member Blackpink (Rose, Lisa, Jiso, dan Jenie), Gaho, Do Kyung So, Cha Eun Wo, dan Xu Minghao (The 8) yang lagu-lagu dan acaranya selalu menemani penulis dalam mengerjakan penelitian serta menyusun skripsi.
19. Teman seperbimbingan Ibu Prof. Dr Tati Suhartati, M.S., Alya Rahmatina Salsabilla, Nurvita Sari, dan Fitri Puspita Sari yang telah menjadi teman berdiskusi saat penulis menemukan masalah dalam melakukan penelitian.
20. Rekan menginap di Lab Kimia Organik, Ni Made Feni Astuti, Dhita Amarhani, dan Fitri Puspita Sari yang telah menemani penulis menginap di laboratorium selama ini, hal tersebut akan menjadi kenangan yang tak terlupakan.
21. Kakak-kakakku, Mba Rinda, Mba Mentari, Mba Novita, Mba May, Kak Irfan, Kak Ilham, Kak Arif, dan Mba Uus yang telah membimbing dan memberikan masukan kepada penulis saat menemui masalah dalam penelitian. Teruntuk Mba rinda makasih banyak sudah mengajari banyak hal terutama KCV dan Kolom, semoga dipermudah penelitian S2 nya, tetap semangat mba.

22. Seluruh rekan-rekan kerja Laboratorium Kimia Organik, Alya, Fitri, Nurvita, Dhita, Feni, Kadek, Rami, Jere, Mba Rinda, Mba Mentari, Kak Arif, Kak Irfan, Mba Uus, Mba Upik, Mba Elma, Mba Bibah, semoga Allah SWT mempermudah urusan kita.
23. Rekan-rekan penelitian di Laboratorium Biokimia, Ria, Qonita, Aiga, Noura, Mega, Melly, Kak Hendrik, dan Firyal, semoga segala urusan kita dipermudah oleh Allah SWT.
24. Teman-teman satu angkatan kimia 2017, terutama kelas A yang telah membuat kehidupan perkuliahan penulis lebih berwarna.
25. Teman-teman Jurusan Kimia FMIPA Unila tahun 2013-2019.
26. Alamamater tercinta Universitas Lampung.
27. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam penyusunan skripsi ini baik secara langsung maupun tak langsung.
28. *Last but not least, I wanna thank me, I wanna thank me for believing in me, I wanna thank me for doing all this hard work, I wanna thank me for having no days off, I wanna thank me for never quitting, for just being me at all times.*

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat baik bagi penulis maupun bagi pembaca serta dapat dijadikan sumber informasi bagi penelitian tentang bahan alam kedepannya.

Bandar Lampung, Desember 2021

Penulis,

Nur Istyqomah

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	3
1.3. Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Moraceae	4
2.2. Tumbuhan Puda (A. kemando Miq.)	6
2.3. Metabolit Sekunder	7
2.4. Flavonoid.....	7
2.5. Ekstraksi dan Fraksinasi	10
2.6. Pelarut.....	11
2.6.1. Metanol	13
2.6.2. Heksana	13
2.6.3. Etil asetat.....	14
2.7. Kromatografi	15
2.7.1. Kromatografi cair vakum (KCV)	15
2.7.2. Kromatografi lapis tipis (KLT)	17
2.7.3. Kromatografi kolom gravitasi (KKG).....	18
2.8. Spektrofotometri.....	19
2.8.1. Spektrofotometri UV-Vis	20

2.8.2. Spektrofotometri <i>Infra red</i> (IR)	23
2.8.3. Spektrofotometri NMR	25
2.9. Bakteri	26
2.9.1. <i>Eschericia coli</i>	26
2.9.2. <i>Bacillus subtilis</i>	27
2.10. Antibakteri.....	28
III. METODE PENELITIAN.....	30
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	30
3.2. Alat dan Bahan	30
3.2.1. Alat-alat yang digunakan	30
3.2.2. Bahan-bahan yang digunakan	31
3.3. Prosedur Penelitian	31
3.3.1. Pengumpulan dan persiapan sampel	32
3.3.2. Ekstraksi sampel dengan metode maserasi	32
3.3.3. Fraksinasi ekstraksi	32
3.3.4. Kromatografi	33
3.3.5. Analisis kemurnian.....	35
3.3.6. Analisis struktur	35
3.3.7. Pengujian bioaktivitas antibakteri	37
3.3.8. Diagram penelitian	39
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1. Isolasi Senyawa Flavonoid.....	40
4.2. Penentuan Titik Leleh	50
4.3. Analisis Spektrofotometri	51
4.3.1. Analisis spektrofotometri UV- <i>Vis</i>	51
4.3.2. Analisis spektrofotometri inframerah (IR).....	54
4.3.3. Analisis spektrofotometri NMR	55
4.4. Uji Bioaktivitas Antibakteri	64
V. SIMPULAN DAN SARAN	66
5.1. Simpulan.....	66
5.2. Saran	66
DAFTAR PUSTAKA.....	68

LAMPIRAN.....	77
Lampiran 1. Diagram alir penelitian	77
Lampiran 2. Perhitungan absorptivitas molar	80
Lampiran 3. Pembuatan pereaksi geser spektrofotometri UV-Vis.....	81
Lampiran 4. Karakteristik spektrum serapan UV-Vis flavonoid.....	82
Lampiran 5. Perhitungan tetapan kopling $^1\text{H-NMR}$	83
Lampiran 6. Pembuatan larutan uji bioaktivitas antibakteri	84
Lampiran 7. Hasil uji antibakteri terhadap <i>E. coli</i> dan <i>B. subtilis</i>	85
Lampiran 8. Hasil determinasi tumbuhan	88

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Konstanta dielektrikum bahan-bahan pelarut.....	12
2. Sifat fisika metanol.	13
3. Sifat fisika <i>n</i> -heksana.	14
4. Sifat fisika etil asetat	14
5. Penggolongan kromatografi berdasarkan fase diam dan fase gerak.	15
6. Urutan kekuatan adsorben, kepolaran eluen, dan elusi senyawa pada kromatografi.	19
7. Absorpsi sinar UV pada panjang gelombang maksimum dari beberapa pelarut.....	21
8. Rentang serapan spektrum UV- <i>Vis</i> flavonoid.....	22
9. Daerah panjang gelombang spektrum inframerah.	23
10. Daftar bilangan gelombang dari berbagai jenis ikatan.....	24
11. Pengelompokkan fraksi KCV tahap 1-3 menjadi 8 fraksi utama.....	43
12. Data spektrum HSQC kristal DOKS.....	58
13. Data spektrum HMBC kristal DOKS.....	60
14. Perbandingan ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR kristal DOKS dengan artoheterofilin C.....	61

15. Posisi proton dan karbon senyawa artoheterofilin C hasil isolasi (kristal DOKS).....63
16. Pengukuran zona hambat dari senyawa artoheterofilin C hasil isolasi terhadap bakteri *E. coli*.....64
17. Pengukuran zona hambat dari senyawa artoheterofilin C hasil isolasi terhadap bakteri *B. subtilis*.65

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tumbuhan Puda (A. <i>kemando</i> Miq.).....	6
2. Tiga jenis flavonoid.	8
3. Cara penomoran flavon.....	8
4. Penggolongan struktur flavonoid.....	9
5. Urutan kenaikan tingkat kepolaran eluen.....	17
6. Tipe transisi elektron disertai dengan ΔE dan λ yang sesuai, berturut-turut untuk transisi $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$	21
7. Diagram penelitian.....	39
8. Kromatogram KLT ekstrak kasar metanol (M), fraksi <i>n</i> -heksana (H), dan fraksi etil asetat (E) menggunakan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (6:4).....	41
9. Proses KCV (a) Pengelusian sampel dan (b) Pita yang terbentuk.....	42
10. Kromatogram KLT hasil (a) KCV tahap 1,(b) KCV tahap 2, dan (c) KCV tahap 3 menggunakan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (6:4).....	42
11. Kromatogram KLT fraksi utama A, B, C, D, E, F, G, dan H hasil KCV menggunakan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (6:4).....	43
12. Kromatogram hasil KLT fraksi utama C KKG tahap 1 menggunakan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (9:1).....	44

13. Kromatogram hasil KLT fraksi Co KKG tahap 2 menggunakan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (7,5 : 2,5).....	45
14. Kromatogram hasil KLT fraksi Coc KKG tahap 3 menggunakan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (7:3).....	45
15. Kromatogram KLT hasil KCV fraksi utama D menggunakan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (6:4).....	46
16. Kromatogram hasil KLT gabungan fraksi D KKG tahap 1 menggunakan eluen <i>n</i> -heksana : aseton (9,5 : 0,5).	47
17. Kromatogram hasil KLT fraksi D8 KKG tahap 2 menggunakan eluen <i>n</i> -heksana : aseton (7,5 : 2,5).	47
18. Kromatogram hasil KLT fraksi DO KKG tahap 3 menggunakan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (7:3).	48
19. Kromatogram hasil KLT kristal DOK dan Coc+ menggunakan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (6:4).	48
20. Padatan berwarna kuning kristal DOKS	49
21. Kromatogram KLT kristal DOKS menggunakan 3 sistem eluen (a) <i>n</i> -heksana/aseton (8:2), (b) <i>n</i> -heksana/DCM/etil asetat (7:1,5:1,5), dan (c) etil asetat/ <i>n</i> -heksana (3:7).....	49
22. Kromatogram KLT kristal DOKS dan senyawa standar artokarpin menggunakan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (1:1).....	50
23. Spektrum UV- <i>Vis</i> senyawa DOKS dalam MeOH.	51
24. Spektrum UV- <i>Vis</i> senyawa DOKS dalam MeOH dan MeOH+NaOH.....	52
25. Spektrum UV- <i>Vis</i> senyawa DOKS dalam MeOH, MeOH+AlCl ₃ , dan MeOH+AlCl ₃ /HCl.....	53
26. Spektrum UV- <i>Vis</i> Senyawa DOKS dalam MeOH, MeOH+NaOAc, dan MeOH+NaOAc+H ₃ BO ₃	53
27. Spektrum IR kristal DOKS.	55
28. Spektrum ¹ H-NMR (500 MHz) kristal DOKS dalam pelarut CDCl ₃	56
29. Spektrum ¹³ C-NMR (125 MHz) kristal DOKS dalam pelarut CDCl ₃	57

30. Spektrum HSQC kristal DOKS.	58
31. Spektrum HMBC kristal DOKS.	59
32. Struktur senyawa artoheterofilin C.	62
33. Struktur senyawa hasil isolasi (kristal DOKS) berdasarkan spektrum HMBC.	62

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diare adalah pengeluaran tinja yang konsistensinya lembek sampai cair dengan frekuensi pengeluaran tinja sebanyak 3 kali atau lebih dalam sehari. Diare dapat mengakibatkan demam, sakit perut, penurunan nafsu makan, rasa lelah dan penurunan berat badan (Mafazah, 2013). Diare merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas yang tinggi di Indonesia. Survei morbiditas yang dilakukan oleh Subdit Diare Departemen Kesehatan dari tahun 2000 sampai 2010 terlihat kecenderungan insidens naik. Pada tahun 2000 penyakit Diare 301/ 1000 penduduk, tahun 2003 naik menjadi 374 /1000 penduduk, tahun 2006 naik menjadi 423 /1000 penduduk dan tahun 2010 menjadi 411/1000 penduduk (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2011). Secara global setiap tahun penyakit ini menyebabkan kematian balita sebesar 1,6 juta (Hannif dan Kuschitawaty, 2011). Penyakit diare dapat disebabkan oleh infeksi bakteri, salah satu bakteri yang dapat menyebabkan penyakit diare adalah bakteri *Escherichia coli*.

Bakteri *E. coli* merupakan bakteri gram negatif enterik (*Enterobacteriaceae*) yaitu kuman flora normal yang ditemukan dalam usus besar manusia. Bakteri ini bersifat patogen apabila pindah dari habitatnya yang normal (usus besar) ke bagian lain dalam inang. Bakteri *E. coli* sering menimbulkan infeksi pada saluran kemih, saluran empedu dan tempat-tempat lain di rongga perut (Jawetz dkk., 2005). Selain bakteri *E. coli*, bakteri *Bacillus subtilis* juga dapat menyebabkan infeksi bakteri. Bakteri ini dapat menyebabkan penyakit yang membuat fungsi

imun seseorang terganggu, misalnya meningitis, endokarditis, infeksi mata, dan lain-lainnya (Rahim dkk., 1994).

Infeksi yang disebabkan oleh bakteri *E. coli* dan bakteri *B. subtilis* dapat dihambat menggunakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri, salah satunya senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid memiliki kemampuan menghambat fungsi membran sel (Wu *et al.*, 2013), merusak dinding sel, dan menonaktifkan kerja enzim (Nguyen *et al.*, 2013). Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tumbuhan (Rajalakshmi *and* Narasimhan, 1985).

Salah satu genus dari famili Moraceae yang kaya akan kandungan fenol termasuk flavonoid terprenilasi yaitu *Artocarpus* (Suhartati *et al.*, 2010). *Artocarpus* terdiri dari 50 spesies yang tersebar di kawasan Asia Selatan, Papua Nugini, Pasifik Selatan, dan Indonesia (Hakim, 2010). Studi farmakologi secara *in vitro* dan *in vivo* pada bioaktivitas genus *Artocarpus* telah banyak dilakukan, seperti aktivitas antimalaria (Hakim, 2010), antibakteri (Zakaria dkk., 2017), antikanker (Risidian dkk., 2014), antidiabetes (Nuntawong *et al.*, 2017), antioksidan (Octiviani dkk., 2019), dan antivirus (Hafid *et al.*, 2017).

Tumbuhan pudau (*A. kemandu* Miq.) merupakan salah satu spesies dari genus *Artocarpus* yang mengandung berbagai senyawa fenol turunan flavonoid dan santon, seperti artomandin, artosimmin, artoindonesianin C (Ee *et al.*, 2011), 6,7-dimetoksikumarin, dihidroartoindonesianin C (Hashim *et al.*, 2011), artonin E (Harijuliatri, 2019), artonin M (Borisha, 2017), flavon (Ariza, 2020), calkon (Fatimah, 2017), artokarpin, sikloartokarpin (Yulia, 2019), artoindonesianin, sikloartobiloksanton (Ee *et al.*, 2012), serta artonol B (I) yang menunjukkan aktivitas penghambat pertumbuhan yang signifikan dengan garis sel HL-60 (Ee *et al.*, 2010).

Berdasarkan studi literatur diketahui bahwa tumbuhan pudau (*A. kemando* Miq.) mengandung banyak senyawa turunan flavonoid. Sehingga tidak menutup kemungkinan bila ditemukan senyawa yang belum dilaporkan dari bagian lain pada tumbuhan pudau (*A. kemando* Miq.). Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan kulit batang tumbuhan pudau (*A. kemando* Miq.) untuk mengetahui kandungan senyawa flavonoid serta sifat antibakterinya.

Isolasi senyawa flavonoid dilakukan dengan cara maserasi menggunakan metanol. Pemisahan dilakukan dengan cara kromatografi. Identifikasi kemurnian dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan uji titik leleh. Identifikasi struktur molekul dilakukan secara spektroskopi. Uji bioaktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri *E. coli* dan *B. subtilis*.

1.2. Tujuan Penelitian

Mendapatkan senyawa flavonoid murni dari kulit batang tumbuhan pudau (*A. kemando* Miq.) yang mempunyai bioaktivitas antibakteri dan mengetahui struktur senyawa hasil isolasi.

1.3. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai senyawa flavonoid yang terkandung dalam kulit batang tumbuhan pudau (*A. kemando* Miq.), metode yang digunakan dalam isolasi senyawa flavonoid, serta aktivitas antibakteri dari senyawa hasil isolasi tersebut.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Moraceae

Keluarga murbei atau ara merupakan nama lain dari Moraceae yang memiliki bunga kecil dengan satu atau tidak ada daun perianth yang melingkar. Bunga Moraceae sering disebut sebagai *pseudanthia* (bunga palsu) (Leite *et al.*, 2018). Tumbuhan Moraceae berasal dari daerah tropis, persebarannya juga terdapat di daerah hutan hujan tropis seperti Amerika Selatan, Amerika Tengah, Meksiko, India, Sri Lanka, Indonesia, Thailand, dan Malaysia (Ashari, 1995). Moraceae merupakan tumbuhan yang jumlahnya relatif besar terdiri dari 60 genus yang meliputi 1400 spesies (Hakim, 2009).

Famili Moraceae memiliki banyak manfaat bagi kehidupan sehari-hari. Kayunya dapat digunakan secara langsung untuk bahan bangunan. Selain itu, terdapat beberapa genus dalam famili Moraceae yang juga dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional yaitu *Artocarpus*, *Ficus*, *Morus*, dan *Cudrania* (Heyne, 1987). Famili Moraceae dapat digunakan sebagai obat karena banyak mengandung senyawa fenolat turunan flavonoid, arilbenzofuran, stilbenoid, dan santon yang memiliki aktivitas-aktivitas biologis sebagai antibakteri, antiinflamasi, antikanker, antifungal, dan promotor antitumor (Ersam, 2004).

Genus *Artocarpus* yang terdiri dari kurang lebih 50 spesies, adalah tumbuhan tropika yang terdistribusi mulai dari India, Sri Lanka, hingga kepulauan Salomon, dan keanekaragaman terbesar terdapat di wilayah Indonesia (Verheij *and* Coronel,

1992). *Artocarpus* merupakan tumbuhan dengan ciri-ciri antara lain pohonnya tinggi sekitar 20-30 meter, bergetah putih, daunnya tersusun berselang-seling, buahnya berdaging dari ukuran kecil hingga besar, kayu berukuran besar dan berakar tunggang. Tumbuhan *Artocarpus* banyak dimanfaatkan oleh masyarakat, mulai dari buahnya yang dijadikan sebagai bahan pangan, kayunya dapat dijadikan sebagai bahan bangunan, hingga bagian-bagian dari pohon seperti bunga, daun, serta akar yang dapat digunakan sebagai obat tradisional. Obat tradisional yang berasal dari bagian tumbuhan *Artocarpus* misalnya, akar dari tumbuhan *A. heterophyllus* yang digunakan untuk obat demam (Heyne, 1987), serta daun dari *A. altilis* yang telah kuning dapat digunakan untuk obat tekanan darah tinggi dan kencing manis (Raydian *et al.*, 2017).

Tumbuhan *Artocarpus* mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder. Metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dari genus *Artocarpus* terdiri dari terpenoid, steroid, flavonoid, stilbenoid, arilbenzofuran, neolignan, dan *adduct* Diels-Alder. Kelompok flavonoid merupakan senyawa yang paling banyak ditemukan dari tumbuhan *Artocarpus*, khususnya flavonoid dengan variasi kerangka yang beragam seperti flavanon, flavan-3-ol, flavon sederhana, calkon, prenilflavon, oksepinoflavon, piranoflavon, dihidrobenzosanton, furanodihidrobenzosanton, piranodihidrobenzosanton, kuinonosanton, siklolopentenosanton, santonolid, dan dihidrosanton (Hakim, 2010). Gugus prenil pada flavonoid terprenilasi tersebut ada pada posisi C-3 dan cincin B teroksigenasi pada posisi C-4' atau C-2', C-4' atau C-2', C-4', C-5'. Selain itu prenilasi juga dapat terjadi pada posisi C-6, C-8, dan C-3' (Hakim, 2009).

Berdasarkan penelitian sebelumnya telah ditemukan sejumlah senyawa flavonoid yang berbeda-beda dari genus *Artocarpus*, antara lain siklomunol dan artonin E dari *A. altilis* (Risidian dkk., 2014; Santoso dan Suhartati, 2018), dihidroflavonol dan flavon dari *A. heterophyllus* (Darmawanti dkk., 2015), serta artopeden A, moracalkon A, artoindonesianin A dan B dari *A. champeden* (Hafid *et al.*, 2012).

2.2. Tumbuhan Puda (A. kemando Miq.)

Tumbuhan puda (A. kemando Miq.) merupakan tumbuhan liar yang tumbuh di dekat sungai dan tersebar pada beberapa pulau di Indonesia, seperti Sumatera, Jawa, dan Kalimantan. Tumbuhan ini memiliki beberapa nama lokal, antara lain cempedak air (Jambi), nangka air atau tempedak air (Bangka), serta puda atau puda (Kalimantan). A. kemando Miq. merupakan tumbuhan yang memiliki tinggi mencapai 35 meter dengan penopang pendek. Tumbuhan ini memiliki batang yang diselubungi bulu halus berwarna coklat dan daun bertulang menyirip berukuran kecil sekitar 3-4 x 1,5-2 cm. Selain itu, tumbuhan ini juga memiliki getah berwarna putih yang melimpah. Habitat tumbuhan A. kemando Miq. yaitu hutan sekunder bersuhu dingin (Mandia dkk., 2010), ketinggian tanah 50-80 mdpl, kemiringan tanah 3-9°, pH tanah 5,6-6,2 dan ordo tanah ultisol/inseptisol dengan kandungan liat relatif dominan (Lestari, 2009). Bentuk tumbuhan puda (A. kemando Miq.) dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tumbuhan Puda (A. kemando Miq.).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, senyawa dihidroartoinonesianin C, 6,7-dimetoksikumarin, sikloartobilosanton, artoinonesianin C, sikloartobilosanton A, dan artonol B berhasil diisolasi dari kulit batang tumbuhan puda (A. kemando Miq.) (Ee *et al.*, 2012; Hashim *et al.*, 2011). Artonol B (I) yang diperoleh menunjukkan aktivitas penghambat pertumbuhan yang signifikan dengan garis sel HL-60 (Ee *et al.*, 2010).

2.3. Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang disintesa oleh makhluk hidup yang berfungsi untuk membantu proses pertahanan diri dari kondisi lingkungan sekitar serta tanaman atau hewan pengganggu. Oleh karena itu, keanekaragaman metabolit sekunder dari suatu makhluk hidup sangat dipengaruhi oleh keadaan ekosistem tempat makhluk tersebut hidup. Pada tumbuhan, metabolit sekunder diproduksi dengan tujuan utama sebagai “*antifeedant*” dan “*attractant*”, di mana kedua fungsi tersebut dapat membantu tumbuhan untuk berkembangbiak dan bertahan dari berbagai serangan hama pengganggu (Achmad, 1986). Adanya fungsi tersebut mendorong manusia untuk memanfaatkan metabolit sekunder sebagai sumber senyawa bioaktif.

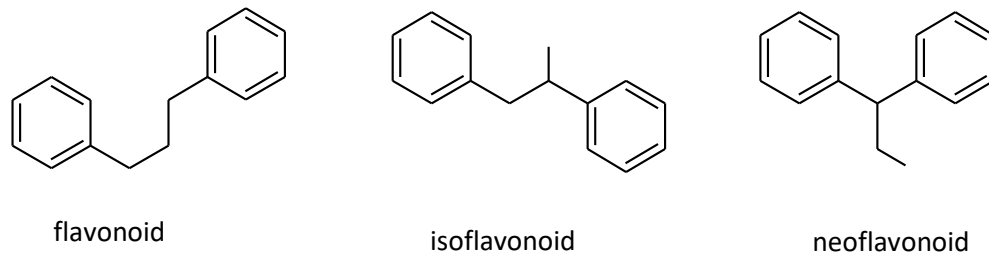
Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme dapat digolongkan menjadi alkaloid, fenolik dan turunannya, flavonoid, isokumarin, kuinon, peptida, terpenoid, dan sebagainya (Agusta, 2009). Senyawa-senyawa ini mayoritas bersifat semipolar sehingga larut dalam pelarut organik. Hanya sebagian saja dari metabolit sekunder yang bersifat polar dan larut dalam metanol atau air.

Metabolit sekunder yang larut dalam metanol kebanyakan adalah senyawa glikosida yang mengikat satu atau lebih molekul gula heksosa/pentosa (Saifudin, 2014).

2.4. Flavonoid

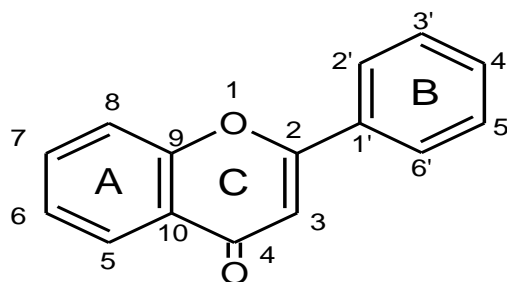
Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa fenol alam yang terdapat pada semua tumbuhan hijau dengan mengecualikan alga dan *hornwort*. Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nektar bunga, buah buni dan biji. Pada tumbuhan, aglikon flavonoid (flavonoid tanpa gula terikat) terdapat dalam berbagai bentuk struktur dengan kerangka dasar yang mengandung 15 atom karbon yang tersusun dalam

konfigurasi C_6 , $-C_3$, $-C_6$, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh 3 atom karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Markham, 1988). Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yaitu flavonoid (1,3-diaril propana), isoflavonoid (1,2-diaril propana), neoflavonoid (1,1-diaril propana) seperti ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Tiga jenis flavonoid (Achmad, 1986).

Pada flavonoid cincin diberi tanda A, B, C, atom karbon dinomori menurut sistem penomoran dengan menggunakan angka biasa untuk cincin A dan C, serta angka “beraksen” untuk cincin B (Markham, 1988). Cara penomoran senyawa turunan flavonoid dapat dilihat pada Gambar 3.

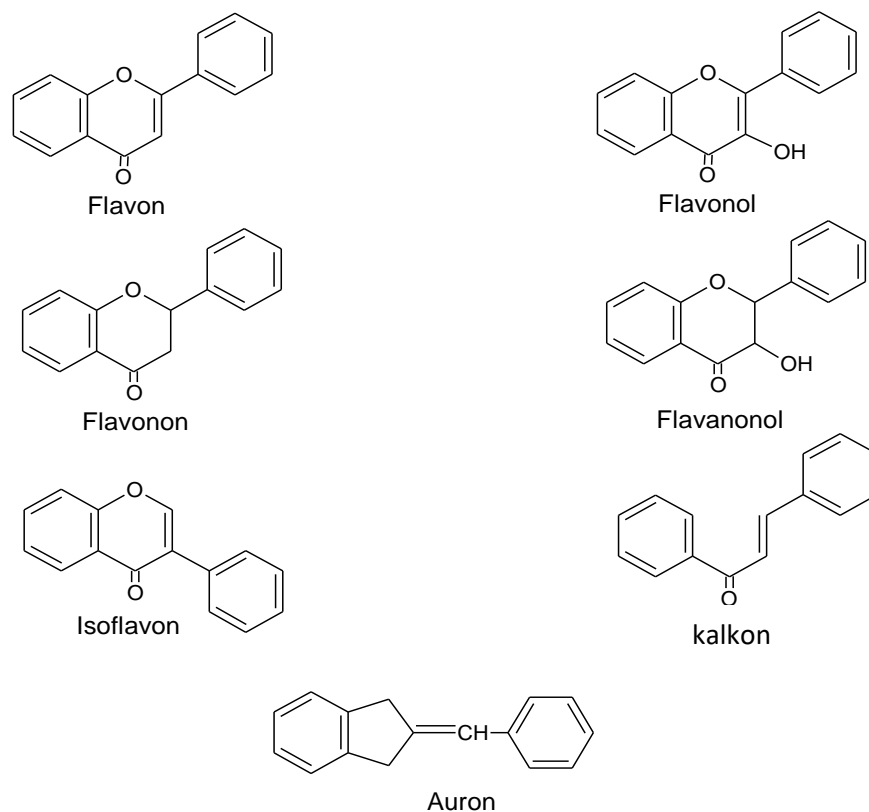


Gambar 3. Cara penomoran flavon (Markham, 1988).

Flavonoid yang terdapat pada tanaman dapat digolongkan menjadi dua yaitu aglikon dan glikosida. Aglikon merupakan flavonoid tanpa gugusan gula terikat dan bersifat kurang polar sehingga lebih larut dalam pelarut eter dan kloroform dibanding pelarut air (Harborne, 1987). Glikosida sendiri merupakan flavonoid

yang mengandung gugusan gula. Golongan glikosida dibagi lagi menjadi dua jenis yaitu *O*-glikosida dan *C*-glikosida. Pada flavonoid *O*-glikosida, satu gugus hidroksil flavonoid (atau lebih) terikat pada satu gula (atau lebih) dengan ikatan hemisetal yang tak tahan asam. Pada flavonoid *C*-glikosida, gula terikat langsung pada inti benzena dengan suatu ikatan karbon-karbon yang tahan asam. Pengaruh glikosida menyebabkan flavonoid menjadi kurang reaktif dan cenderung bersifat polar sehingga mudah larut dalam air, sifat ini memungkinkan penyimpanan flavonoid di dalam vakuola sel (Markham, 1988).

Perbedaan pola substitusi dan hidroksilasi pada atom C_3 menentukan klasifikasi dari senyawa flavonoid yaitu flavon, flavanon, flavonol, flavanonol, isoflavon, auron, dan kalkon. Bagian terbesar dari golongan tersebut adalah flavon dan flavanol (Markham, 1988). Penggolongan struktur flavonoid dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Penggolongan struktur flavonoid (Markham, 1988).

Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Pada tumbuhan, senyawa flavonoid berfungsi sebagai pengaturan tumbuh, pengaturan fotosintesis, antimikroba dan antivirus. Flavonoid dapat dijadikan obat tradisional karena senyawa ini dapat bekerja sebagai inhibitor pernafasan, menghambat aldoreduktase, monoamina oksidase, protein kinase, DNA polimerase dan lipooksigenase (Robinson, 1995). Flavonoid terbukti mempunyai efek biologis antibakteri yang sangat kuat yaitu sebagai antibakteri yang dapat menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi (Nomer dkk., 2019).

2.5. Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi merupakan suatu proses penarikan komponen senyawa yang diinginkan dari suatu bahan dengan cara pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu bahan yang merupakan sumber komponennya. Ekstraksi bertujuan untuk melarutkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam jaringan tanaman ke dalam pelarut yang dipakai untuk proses ekstraksi tersebut. Pada umumnya ekstraksi akan semakin baik bila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan pelarut semakin luas. Dengan demikian, semakin halus serbuk simplisia maka akan semakin baik ekstraksinya. Selain luas bidang, ekstraksi juga dipengaruhi oleh sifat fisik dan kimia simplisia yang bersangkutan (Rezki dkk., 2007). Salah satu metode yang dapat digunakan untuk proses ekstraksi adalah maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman simplisia menggunakan pelarut yang sesuai dengan beberapa kali pengadukan yang biasanya dilakukan pada temperatur 15 - 20°C dalam waktu selama 3 hari sampai zat yang diinginkan dapat larut (Ansel, 2008).

Fraksinasi adalah metode pemisahan campuran menjadi beberapa fraksi yang berbeda susunannya. Metode pemisahan yang banyak digunakan adalah metode ekstraksi cair-cair dan kromatografi (Harborne, 1987). Ekstraksi cair-cair

merupakan proses pemisahan di mana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur. Koefisien distribusi atau koefisien partisi yang merupakan tetapan kesetimbangan kelarutan relatif dari suatu senyawa terlarut dalam dua pelarut yang tidak bercampur. Prinsip ekstraksi cair-cair adalah *like dissolves like* yang berarti bahwa senyawa polar akan mudah larut dalam pelarut polar, dan senyawa nonpolar mudah larut dalam senyawa nonpolar (Fajariah, 2009). Ekstraksi cair-cair dalam prosesnya terjadi perpindahan solut dari satu fase ke fase lain. Pada ekstraksi cair-cair, fase yang digunakan adalah dua cairan yang tidak saling bercampur, biasanya digunakan air dan pelarut organik (Harborne, 1987).

2.6. Pelarut

Pelarut adalah benda cair atau gas yang melarutkan benda padat, cair, atau gas yang menghasilkan sebuah larutan. Pelarut yang paling umum digunakan dalam kehidupan sehari-hari adalah air. Pelarut lain yang juga umum digunakan adalah bahan kimia organik (mengandung atom karbon) yang disebut sebagai pelarut organik. Pelarut organik biasanya memiliki titik didih rendah dan lebih mudah menguap, meninggalkan substansi terlarut yang didapatkan. Pelarut biasanya terdapat dalam jumlah yang lebih besar untuk membedakan antara pelarut dengan zat yang dilarutkan (Wanto dan Romli, 1977). Pelarut organik dapat bersifat polar dan non-polar bergantung pada gugus kepolaran yang dimilikinya (Sudarmadji dkk., 1997). Polaritas bahan pelarut dan angka konstanta dielektrikunya disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Konstanta dielektrikum bahan-bahan pelarut (Sudarmadji dkk., 1997).

Bahan Pelarut	Konstanta Dielektrikum	Tingkat Kelarutan dalam Air		
		Tak Larut	Sedikit	Misibel*
<i>n</i> -heksana	1,89	√		
Petroleum eter	1,90	√		
<i>n</i> -oktan	1,95	√		
Sikloheksan	2,02	√		
Benzena	2,28		√	
Toluena	2,38	√		
Asam propanoat	3,30			√
Dietileter	3,34		√	
Kloroform	4,81		√	
Butil asetat	5,01		√	
Etil asetat	6,02		√	
Asam asetat	6,15		√	
Metil asetat	6,68		√	
Tetrahidrofur	7,58		√	
Metilengklorida	9,08		√	
<i>t</i> -butanol	10,09			√
Piridin	12,30			√
2-butanol	15,80		√	
<i>n</i> -butanol	17,80		√	
2-propanol	18,30			√
1-propanol	20,10		√	
Aseton	20,70			√
Etanol	24,30			√
Metanol	33,60			√
Asam format	58,50			√
Air	80,40			√

*misibel artinya dapat bercampur dengan air dalam berbagai proporsi

Menurut prinsip *like dissolved like*, suatu pelarut akan cenderung melarutkan senyawa yang mempunyai tingkat kepolaran yang sama. Flavonoid merupakan senyawa golongan polifenol yang terdistribusi luas pada tumbuhan dalam bentuk glikosida yang berikatan dengan suatu gula, karena itu flavonoid merupakan senyawa yang bersifat polar. Pelarut polar yang biasa digunakan untuk ekstraksi flavonoid adalah metanol, aseton, etanol, dan air (Sudarmadji dkk., 1997). Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan pelarut metanol untuk maserasi simplisia. Sedangkan untuk ekstraksi cair-cair digunakan pelarut *n*-heksana terlebih dahulu untuk mengilangkan senyawa pengganggu yang bersifat non-polar.

Selanjutnya digunakan pelarut etil asetat yang bersifat semipolar, namun etil asetat sulit dipisahkan dari metanol sehingga perlu penambahan air yang bersifat polar. Metanol akan bergabung dengan pelarut air sehingga dapat dipisahkan dari pelarut etil asetat yang mengandung senyawa flavonoid.

2.6.1. Metanol

Metil alkohol atau metanol salah satu zat kimia yang termasuk ke dalam golongan alkohol dan memiliki bentuk paling sederhana dari alkohol. Metanol sering digunakan sebagai pelarut dalam cat, cairan mesin fotokopi, pembuatan formaldehid, asam asetat, metil derivat, dan asam anorganik (Abramson *and* Singh, 2000). Metanol memiliki struktur kimia CH_3OH , bersifat polar, mudah menguap, dan beracun dengan baunya yang khas pada keadaan atmosfer (Bebarta *et al.*, 2006). Sifat fisika dari pelarut metanol dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Sifat fisika metanol (Epker *and* Bakker, 2010).

Sifat Fisika	Keterangan
Bobot molekul	32,04 gram/mol
Warna	Tak berwarna
Wujud	Cair
Titik lebur	-97,6 °C
Titik didih	64,6 °C (pada 1 atm)
Densitas	0,7918 gram/cm ³ , cairan

2.6.2. Heksana

Heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} . Awalan *heks-* merujuk pada enam atom karbon yang terdapat pada heksana dan akhiran *-ana* berasal dari alkana, yang merujuk pada ikatan tunggal yang menghubungkan atom-atom karbon tersebut. Pada keadaan standar senyawa ini merupakan cairan tak berwarna yang tidak larut dalam air. Keuntungan pelarut ini yaitu bersifat selektif dalam melarutkan zat, menghasilkan jumlah kecil lilin,

albumin, dan zat warna, namun dapat mengekstrak zat pewangi dalam jumlah besar (Guenther, 1987). Sifat fisika dari pelarut *n*-heksana dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Sifat fisika *n*-heksana (Munawaroh dan Handayani, 2010).

Sifat Fisika	Keterangan
Bobot molekul	86,2 gram/mol
Warna	Tak berwarna
Wujud	Cair
Titik lebur	-95 °C
Titik didih	69 °C (pada 1 atm)
Densitas	0,6603 gram/mol pada 20 °C

2.6.3. Etil asetat

Etil asetat adalah senyawa organik dengan rumus $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$. Senyawa ini merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Senyawa ini sering disingkat EtOAc, dimana Et mewakili gugus etil dan OAc mewakili asetat. Etil asetat merupakan pelarut polar menengah yang mudah menguap, tidak beracun, dan tidak higroskopis. Etil asetat dibuat melalui reaksi esterifikasi Fischer dari asam asetat dan etanol. Reaksi ini bersifat *reversible* dan sangat lambat, tetapi bila menggunakan katalis, kesetimbangan reaksi akan tercapai lebih cepat. Asam yang dapat digunakan sebagai katalis adalah asam sulfat, asam klorida, dan asam fosfat. Sifat fisika dari pelarut etil asetat dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Sifat fisika etil asetat (McKetta *and* Cuningham, 1977).

Sifat Fisika	Keterangan
Bobot molekul	88,105 gram/mol
Warna	Tak berwarna
Wujud	Cair
Titik lebur	-83,6 °C
Titik didih	77,1 °C (pada 1 atm)
Densitas	0,897 gram/mol

2.7. Kromatografi

Kromatografi merupakan prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase. Teknik kromatografi umum membutuhkan zat terlarut terdistribusi di antara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995). Fasa diam (stasioner) adalah fase dengan permukaan yang luas berupa zat padat dan fase gerak berupa cairan atau gas (Day dan Underwood, 1981). Kromatografi dapat dibedakan menjadi beberapa golongan berdasarkan jenis fase diam dan fase gerak yang dipartisi seperti pada Tabel 5.

Tabel 5. Penggolongan kromatografi berdasarkan fase diam dan fase gerak (Johnson dan Stevenson, 1991).

Fase diam	Fase gerak	Sistem kromatografi
Padat	Cair	Cair-adsorpsi
Padat	Gas	Gas-adsorpsi
Cair	Cair	Cair-partisi
Cair	Gas	Gas-partisi

Hampir setiap campuran kimia, mulai dari bobot molekul rendah sampai tinggi, dapat dipisahkan menjadi komponen-komponennya dengan beberapa metode kromatografi (Gritter dkk., 1991). Pada penelitian ini akan digunakan metode kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi lapis tipis (KLT), dan kromatografi kolom gravitasi (KKG).

2.7.1. Kromatografi cair vakum (KCV)

Kromatografi cair vakum (KCV) merupakan bentuk kromatografi kolom khususnya berguna untuk fraksinasi kasar yang cepat terhadap suatu ekstrak. Pemakaian vakum merupakan alternatif untuk mempercepat aliran fase gerak dari atas ke bawah, sedangkan pemakaian corong Buchner kaca masir atau kolom yang lebih panjang digunakan untuk meningkatkan daya pisah. Metode ini sering

digunakan pada fraksinasi awal ekstrak non-polar atau ekstrak semipolar (Raymond, 2006).

Kromatografi cair vakum (KCV) ini tergolong dalam kromatografi cair padat (cair-adsorpsi) yang menggunakan fase diam berwujud padat dan fase gerak berwujud cair. Berbagai fase diam atau adsorben yang digunakan dalam KCV, diantaranya silika, alumina, poliamida, florisil, dan lain-lain. Di antara fase diam di atas, silika memiliki pemakaian hingga 90% karena memberikan hasil yang unggul (Johnson dan Stevenson, 1991). Fase diam yang akan digunakan untuk KCV perlu dikemas ke dalam kolom. Proses pengemasan fase diam ke dalam kolom terbagi menjadi dua jenis, yaitu:

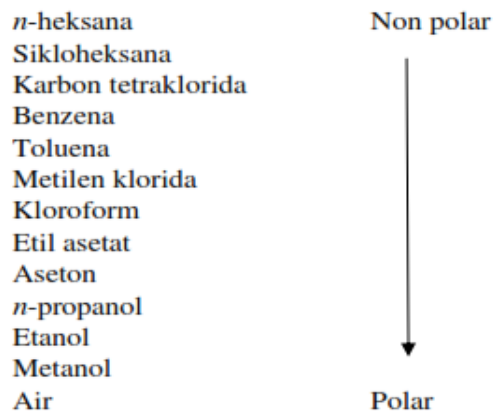
a. Cara basah

Preparasi fase diam dengan cara basah dilakukan dengan melarutkan fase diam dalam fase gerak yang akan digunakan. Campuran kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan dibuat merata. Fase gerak dibiarkan mengalir hingga terbentuk lapisan fase diam yang tetap dan rata, kemudian aliran dihentikan (Sarker *et al.*, 2006).

b. Cara kering

Preparasi fase diam dengan cara kering dilakukan dengan cara memasukkan fase diam yang digunakan ke dalam kolom KCV. Fase diam tersebut selanjutnya dibasahi dengan pelarut yang akan digunakan (Sarker *et al.*, 2006).

Kolom KCV yang telah diisi dengan fase diam selanjutnya dielusi menggunakan pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolaran pelarut ditingkatkan, kemudian kolom dihisap dengan pompa vakum sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi (Hostettman dkk., 1995). Urutan kenaikan tingkat kepolaran eluen pada kromatografi ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Urutan kenaikan tingkat kepolaran eluen (Gritter dkk., 1991).

2.7.2. Kromatografi lapis tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu kromatografi padat-cair yang fase diamnya direkatkan pada lempeng tipis alumunium atau kaca. KLT digunakan untuk mengidentifikasi komponen dan mendapatkan eluen yang tepat untuk kromatografi kolom gravitasi (KKG) dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Hostettman dkk., 1995). KLT merupakan metode pilihan untuk pemisahan senyawa dengan kepolaran yang berbeda. Pada KLT digunakan fase diam berupa pelarut yang terjerap pada lempeng tipis alumina, silika gel, selulosa, magnesium karbonat, pati, talk dan turunannya. KLT juga menggunakan fase gerak berupa campuran dari pelarut organik dengan tujuan untuk mendapatkan pemisahan yang lebih baik. Pelarut-pelarut yang digunakan adalah etanol, propanol, *n*-butanol, *n*-heksana, etil asetat, atau kloroform (Sastrohamidjojo, 1985).

Pada KLT, campuran yang akan dipisahkan berupa larutan yang ditotolkan berupa bercak noda atau pita (awal). Plat tersebut selanjutnya ditaruh dalam bejana tertutup rapat berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan akan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Senyawa pada sampel akan bergerak jika memiliki sifat kepolaran yang sama dengan fase geraknya (Stahl, 1985). Zat-zat berwarna pada plat KLT dapat terlihat langsung, tetapi dapat juga

digunakan *reagent* penyemprot untuk dapat melihat bercak nodanya (Khopkar, 2008). Jarak perambatan senyawa pada kromatogram dinyatakan dengan nilai *Retardation factor* (Rf) dengan rentang nilai antara 0,00 – 1,00 (hanya dua desimal) yang didefinisikan pada persamaan berikut:

$$Rf = \frac{\text{jarak tempuh sampel}}{\text{jarak tempuh pelarut}}$$

Semakin besar nilai Rf yang dihasilkan maka semakin besar pula jarak perambatan senyawa pada plat KLT. Saat membandingkan sampel yang berbeda pada plat yang sama, nilai Rf akan besar bila senyawa bersifat kurang polar dan berinteraksi dengan adsorben polar dari plat KLT. Nilai Rf digunakan untuk mengidentifikasi senyawa, apabila nilai Rf yang dihasilkan sama maka senyawa tersebut dapat dikatakan memiliki karakteristik yang sama.

2.7.3. Kromatografi kolom gravitasi (KKG)

Pada kromatografi kolom gravitasi (KKG) proses pemisahan campuran bergantung pada perbedaan distribusi campuran komponen antara fase diam berupa kolom dan fase gerak yang dibiarkan untuk mengalir (Christian, 1994). KKG merupakan kromatografi cair-adsorpsi yang bekerja pada kondisi normal tanpa vakum, hanya berdasarkan gaya gravitasi bumi. Waktu yang dibutuhkan untuk KKG lebih lama, namun dengan kondisi tersebut diharapkan hasil pemisahan yang diperoleh lebih baik dan lebih murni (Hernawan, 2008).

KKG digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa organik terutama terhadap senyawa yang memiliki sifat semipolar pada konstanta dielektrik 2 hingga 10 (Mamonto dkk., 2014). Kolom KKG dapat berupa pipa gelas yang dilengkapi dengan kran dan gelas penyaringan di bagian dalam. Ukuran kolom tergantung pada banyaknya zat yang akan dipisahkan. Untuk menahan penyerap yang diletakkan di dalam kolom dapat digunakan *glass wool* atau kapas (Hardjono, 1985).

Kromatografi kolom didasarkan pada adsorpsi komponen-komponen campuran dengan afinitas berbeda terhadap permukaan fase diam. Adsorben bertindak sebagai fase diam dan fase geraknya adalah cairan yang mengalir membawa komponen campuran sepanjang kolom. Senyawa dalam sampel yang mempunyai afinitas besar terhadap adsorben akan secara selektif tertahan dan afinitas yang paling kecil akan mengikuti aliran pelarut. Pada KKG, tingkat adsorpsi tergantung pada polaritas molekul, fasa gerak, dan aktivitas adsorben (Braithwaite *and* Smith, 1995). Urutan kekuatan adsorben, kepolaran eluen, dan elusi senyawa dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Urutan kekuatan adsorben, kepolaran eluen, dan elusi senyawa pada kromatografi (Braithwaite *and* Smith, 1995).

Kekuatan Adsorben	Polaritas Eluen	Elusi Senyawa
Selulosa	<i>Petroleum Eter</i>	Hidrokarbon jenuh
Gula	Karbontetra Klorida	Alkena
Asam Silika (Silika Gel)	Benzena	Hidrokarbon Aromatik
Florisil (Magnesium Silikat)	Kloroform	Eter
Aluminium Oksida (Alumina)	Dietil Eter	Aldehida, keton, ester
	Etil Asetat	Alkohol
	<i>Aseton</i>	Asam Karboksilat
	Etanol	
	Metanol	
	Air	

Keterangan: Semakin ke bawah kekuatan adsorben, polaritas eluen dan elusi senyawa semakin tinggi.

2.8. Spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan salah satu jenis analisis instrumental yang berhubungan dengan segala sesuatu tentang interaksi sinar dengan molekul. Hasil interaksi tersebut dapat menimbulkan beberapa peristiwa seperti pemantulan,

pembiasan, penyerapan, fluoresensi, fosforesensi, dan ionisasi. Setiap zat kimia akan menyerap sinar pada panjang gelombang tertentu secara spesifik. Metode ini dapat digunakan untuk analisis struktur kimia secara kualitatif dan kuantitatif (Situmorang, 2010). Spektrofotometer adalah alat yang digunakan dalam analisis spektrofotometri, terdiri dari spektro yang menghasilkan sinar dari spektrum pada panjang gelombang tertentu dan fotometer yang mengukur intensitas cahaya yang ditransmisi atau diabsorpsi (Neldawati dkk., 2013). Pada penelitian ini, analisis struktur dilakukan berdasarkan metode spektrofotometri UV-*Vis* dan spektrofotometri *Infra red* (IR).

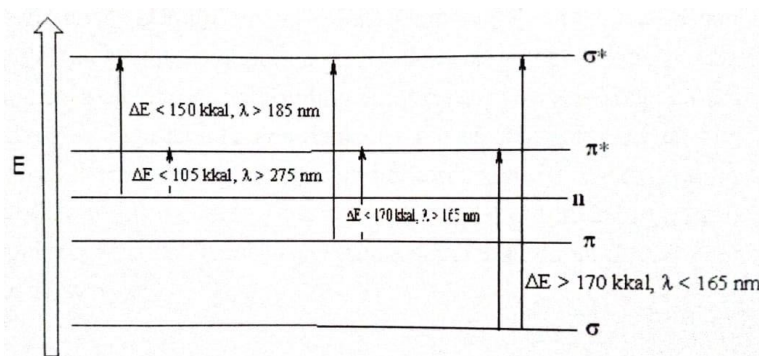
2.8.1. Spektrofotometri UV-*Vis*

Spektrofotometri UV-*Vis* adalah pengukuran serapan cahaya pada daerah sinar tampak (*Vis*) dengan rentang panjang gelombang sekitar 400 nm (ungu) sampai 750 nm (merah) dan daerah sinar ultraviolet terentang dari 100 nm sampai 400 nm (Fessenden dan Fessenden, 1986). Analisis spektrofotometri UV-*Vis* dapat digunakan untuk sampel yang berupa larutan, gas, atau uap. Pada umumnya sampel harus diubah menjadi suatu larutan yang jernih dengan memenuhi syarat-syarat tertentu, yaitu harus melarutkan sampel dengan sempurna, pelarut yang dipakai tidak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna (tidak boleh mengabsorpsi sinar yang dipakai oleh sampel), tidak terjadi interaksi dengan molekul senyawa yang dianalisis, serta memiliki kemurnian yang tinggi. Pelarut- pelarut yang sering digunakan untuk mengabsorpsi sinar pada daerah UV adalah air, etanol, metanol, dan *n*-heksana (Suhartati, 2017). Absorpsi sinar UV pada panjang gelombang maksimum dari beberapa pelarut dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Absorpsi sinar UV pada panjang gelombang maksimum dari beberapa pelarut (Suhartati, 2017).

Pelarut	λ_{maks} (nm)	Pelarut	λ_{maks} (nm)
Asetonitril	190	<i>n</i> -heksana	201
Kloroform	240	Metanol	205
Sikloheksana	195	Isooktana	195
1-4 dioksan	215	Air	190
Etanol 95%	205	Aseton	330
Benzena	285	Piridina	305

Interaksi sinar ultraviolet atau sinar tampak akan menghasilkan transisi elektron dari elektron-elektron ikatan, baik ikatan sigma (σ), pi (π), maupun elektron non ikatan (*n*) yang ada dalam molekul organik. Elektron-elektron ini berada di bagian luar molekul organik. Transisi elektron yang terjadi merupakan perpindahan elektron dari tingkat dasar (orbital ikatan/non ikatan) ke tingkat eksitasi (orbital antiikatan). Senyawa organik yang hanya memiliki ikatan sigma akan mengabsorpsi pada daerah panjang gelombang di bawah 200 nm yang disebut sebagai absorpsi di daerah ultraviolet vakum. Pada daerah ini, informasi mengenai struktur molekul organik sukar diperoleh. Molekul organik yang memiliki ikatan pi atau memiliki elektron nonikatan akan mengabsorpsi pada panjang gelombang yang lebih besar (Suhartati, 2017). Tipe transisi elektron yang terjadi dalam molekul organik disertai dengan nilai ΔE dan panjang gelombang (λ) yang sesuai ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Tipe transisi elektron disertai dengan ΔE dan λ yang sesuai, berturut-turut untuk transisi $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$ (Suhartati, 2017).

Spektrum UV-Vis digambarkan dalam bentuk dua dimensi, dengan absis merupakan panjang gelombang dan ordinat merupakan absorban (serapan). Spektrum UV maupun tampak terdiri dari pita absorpsi lebar pada daerah panjang gelombang yang lebar. Hal ini disebabkan karena terbaginya keadaan dasar dan keadaan eksitasi sebuah molekul dalam subtingkat-subtingkat rotasi dan vibrasi (Fessenden dan Fessenden, 1986).

Spektrum flavonoid biasanya ditentukan dalam larutan menggunakan pelarut metanol atau etanol, namun spektrum yang dihasilkan dalam etanol kurang memuaskan. Spektrum khasnya terdiri atas dua maksimal pada rentang 240-285 nm (pita II) dan 300-550 nm (pita I) (Markham, 1988). Rentang serapan spektrum UV-Vis flavonoid dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Rentang serapan spektrum UV-Vis flavonoid (Markham, 1988).

Pita II (nm)	Pita I (nm)	Jenis Flavonoid
250-280	310-350	Flavon
250-280	330-360	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
250-280	350-385	Flavonol (3-OH bebas)
245-275	310-330	Isoflavon
275-295	300-330	Flavanon dan dihidroflavonol
230-270	340-390	Calkon
230-270	380-430	Auron
270-280	465-560	Antosianidin dan antosianin

Semakin banyak sinar yang diabsorpsi oleh sampel organik, maka semakin tinggi absorban yang dinyatakan dalam hukum Lambert-Beer:

$$A = \log I_0/I = a \cdot b \cdot c = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Keterangan: A = absorban
a = absorptivitas ($\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
b = lebar sel yang dilalui sinar (cm)
c = konsentrasi (mol/L)
 ϵ = ekstinsi (absorptivitas) molar ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
 I_0 = intensitas sinar sebelum melalui sampel
I = intensitas sinar setelah melalui sampel

Nilai ekstingsi molar (ϵ) yang diperoleh dari hasil perhitungan sangat penting digunakan untuk penentuan struktur, karena terkait dengan transisi elektron yang dibolehkan atau transisi elektron terlarang. Nilai ini juga dapat digunakan untuk memperkirakan kromofor dari senyawa yang dianalisis. Dengan menggunakan persamaan Lambert-Beer, konsentrasi suatu senyawa dalam suatu pelarut dapat dihitung (Suhartati, 2017).

2.8.2. Spektrofotometri *Infra red* (IR)

Metode spektrofotometri inframerah merupakan metode yang meliputi teknik serapan (absorpsi), teknik emisi dan teknik fluoresensi. Spektrofotometri inframerah (IR) merupakan suatu metode analisis yang mengamati molekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada daerah panjang gelombang 0,75 – 1.000 μm atau pada bilangan gelombang 13.000 – 10 cm^{-1} (Yudhapratama, 2010). Daerah panjang gelombang inframerah umumnya terbagi menjadi tiga bagian, yaitu inframerah dekat, inframerah pertengahan dan inframerah jauh yang dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Daerah panjang gelombang spektrum inframerah (Yudhapratama, 2010).

Daerah Inframerah	Panjang Gelombang (μm)	Bilangan Gelombang (cm^{-1})	Interaksi
Dekat	0,75 – 2,5	13.000 – 4.000	Interaksi ikatan
Pertengahan	2,5 – 50	4.000 – 200	Interaksi ikatan
Jauh	50 – 1.000	200 - 10	Interaksi ikatan

Pengukuran pada spektrum inframerah dilakukan pada daerah panjang gelombang inframerah pertengahan (*mid-infrared*) yaitu pada pangjang gelombang 2,5 – 50 μm atau bilangan gelombang 4.000 – 200 cm^{-1} (Dachriyanus, 2004). Pada molekul yang dianalisis menggunakan spektrofotometri IR, inti-inti atom yang terikat secara kovalen akan mengalami getaran (vibrasi) atau osilasi (*oscillation*)

seperti dua bola yang terikat oleh suatu pegas. Bila molekul menyerap radiasi inframerah, energi yang diserap akan menyebabkan kenaikan dalam amplitudo getaran atom-atom tersebut. Keadaan molekul ini dinamakan keadaan vibrasi tereksitasi di mana energi yang terserap akan dibuang dalam bentuk panas bila molekul kembali ke keadaan dasar. Keadaan vibrasi dari ikatan terjadi pada keadaan tetap, sehingga panjang gelombang suatu ikatan bergantung pada macam getaran atau vibrasi ikatannya. Oleh karena itu, tipe ikatan yang berlainan akan menyerap radiasi inframerah pada panjang gelombang karakteristik yang berlainan. Pada ikatan non-polar tidak terjadi absorpsi radiasi inframerah karena tidak ada perubahan momen ikatan apabila atom-atom saling berosilasi, sebaliknya pada ikatan polar absorpsi yang dihasilkan kuat (Fessenden dan Fessenden, 1986). Beberapa daerah serapan yang khas dari jenis ikatan yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Daftar bilangan gelombang dari berbagai jenis ikatan (Dachriyanus, 2004).

Bilangan gelombang (ν , cm^{-1})	Jenis ikatan
3750-3000	Regang O-H, N-H
3000-2700	Regang $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, C-H aldehyd
2400-2100	Regang $-\text{C}=\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{N}$
1900-1650	Regang C=O (asam, aldehyd, keton, amida, ester, anhidrida)
1675-1500	Regang C=C (aromatik dan alifatik), C=N
1475-1300	C-H bending
1000-650	C=C-H, Ar-H bending

Spektrum IR yang dihasilkan berupa grafik yang menunjukkan persentase transmittan pada garis vertikal yang bervariasi pada setiap radiasi inframerah. Tak adanya serapan oleh suatu senyawa pada suatu panjang gelombang tertentu direkam sebagai transmittan 100% (keadaan ideal). Pada garis horizontal (aksis), menunjukkan nilai bilangan gelombang, yaitu banyaknya gelombang dalam tiap satuan panjang (Dachriyanus, 2004; Fessenden dan Fessenden, 1986).

2.8.3. Spektrofotometri NMR

Spektrofotometri *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) didasarkan pada penyerapan gelombang radio oleh inti-inti tertentu dalam molekul organik, apabila molekul ini berada dalam suatu medan magnet kuat (Fessenden dan Fessenden, 1986). Banyak informasi yang dapat diperoleh dari hasil pengukuran spektrum NMR khususnya spektrum satu dimensi: ^1H dan ^{13}C , *Distortionless Enhancement of NMR Signals by Polarization Transfer* (DEPT) atau *Attached Proton Test* (APT). Spektrum ^1H -NMR dapat memberikan informasi seperti adanya gugus-gugus fungsi yang dinyatakan dalam bentuk khas seperti jumlah dan posisi gugus fungsi (*ortho*, *meta*, *para*) dengan melihat nilai pergeseran kimia dan konstanta koplingnya. Pengukuran spektrum ^{13}C -NMR dan DEPT dapat memberikan jenis karbon primer, sekunder, tersier, dan kuartener (CH_3 , CH_2 , CH , C , O-C , C=O , H-C=O , $-\text{CONH}$, $-\text{COOH}$ dan $-\text{COOR}$) dengan melihat nilai pergeseran kimianya (Derome, 1995; Sanders and Hunter, 1993).

Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC) merupakan pengukuran spektrum NMR dua dimensi yang memberikan informasi tentang korelasi antara proton dengan karbon dalam satu ikatan, sehingga dapat diketahui inti ^1H mana yang terikat pada inti ^{13}C . *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC) digunakan untuk mengetahui hubungan antara proton dengan karbon yang berjarak 2 sampai 3 ikatan, sehingga dapat diketahui atom karbon tetangganya (Breitmaier, 2002).

Pelarut yang digunakan untuk analisis NMR adalah pelarut organik dalam bentuk *deuterated*, walaupun tidak 100%. Hal yang cukup penting untuk diketahui adalah nilai pergeseran kimia dan bentuk sinyal dari suatu pelarut yang digunakan. Pelarut yang umum digunakan adalah CDCl_3 , bila sampel tidak larut dalam CDCl_3 maka dapat digunakan pelarut lain seperti metanol, aseton, air, dan DMSO dalam bentuk *deuterated*. Selain sinyal dari pelarut itu sendiri, kadangkala muncul sinyal dari air, yang muncul pada daerah tertentu tergantung

dari jenis pelarut yang digunakan. Misalnya, bila digunakan CDCl_3 maka biasanya sinyal air muncul pada δ sekitar 1,5 ppm (Jenie dkk., 2014).

2.9. Bakteri

Bakteri adalah sel prokariot yang khas bersifat uniseluler dan inti selnya tidak memiliki membran inti. Secara umum bakteri memiliki ukuran sel 0,5 – 1,0 μm x 2,0 – 5,0 μm . Bentuk dasar bakteri dibagi menjadi tiga jenis, yaitu bentuk bulat (kokus), bentuk batang (Bacillus), dan bentuk spiral (Dwidjoseputro, 1985). Berdasarkan ciri fisiknya, bakteri diklasifikasikan menjadi bakteri gram positif dan gram negatif. Perbedaan yang mendasar terletak pada komponen peptidoglikan dan lipid yang terkandung dalam dinding sel kedua kelompok bakteri tersebut. Pada bakteri gram positif, kandungan lipid rendah (15-80 mm) dan peptidoglikan terletak pada lapisan tunggal (bobot lebih dari 50% berat kering). Pada bakteri gram negatif, kandungan lipid rendah (10-15 mm) dan peptidoglikan terletak pada lapisan kaku sebelah dalam (bobot sekitar 10% berat kering) (Purwoko, 2007).

2.9.1. *Eschericia coli*

E. coli merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang pendek yang memiliki panjang sekitar 2 μm , diameter 0,7 μm , lebar 0,4 – 0,7 μm . Bakteri ini membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata (Jawetz, 1996; Smith-Keary, 1988). *E. coli* menjadi patogen jika jumlahnya meningkat di dalam saluran pencernaan atau berada di luar usus yang merupakan tempat tinggal normalnya. Bakteri *E. coli* dapat menyebabkan berbagai macam infeksi tergantung tempat terjadinya infeksi, seperti infeksi saluran kemih, diare, sepsis, dan meningitis (Jawetz, 1996). Bakteri *E. coli* merupakan bagian dari mikrobiota normal usus yang dapat berpindah tempat, seperti melalui tangan ke mulut atau dengan pemindahan pasif lewat makanan atau minuman yang

terkontaminasi bakteri tersebut (Elfidasari dkk., 2011). Adapun klasifikasi bakteri *E. coli* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Eubacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i> (Supardi dan Sukamto, 1999).

2.9.2. *Bacillus subtilis*

Bakteri *B. subtilis* merupakan bakteri gram positif yang dapat membentuk endospora yang berbentuk oval di bagian sentral sel. Bakteri ini berbentuk batang dengan ukuran sel sebesar $0,3 - 2,2 \mu\text{m} \times 1,2 - 7,0 \mu\text{m}$ dan memiliki flagel peritrikus. *B. subtilis* dapat bertahan pada kondisi lingkungan tertentu yaitu pada suhu -5°C sampai 75°C , dengan tingkat keasaman (pH) antara 2-8. Pada kondisi yang sesuai, populasi bakteri ini akan menjadi dua kali lipat yang disebut sebagai waktu generasi atau penggandaan (Soesanto, 2008). Adapun klasifikasi bakteri *B. subtilis* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bakteri
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacili
Order	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus subtilis</i> (Holt <i>et al.</i> , 2000).

2.10. Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan serta perusakan bahan oleh mikroorganisme (Sulistyo, 1971). Menurut Madigan *et al.* (2000), berdasarkan sifat toksisitas selektifnya, senyawa antibakteri dapat dibedakan menjadi tiga macam efek terhadap pertumbuhan bakteri yaitu:

1. Bakteriostatik, yaitu senyawa antibakteri yang memberikan efek dengan cara menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh bakteri. Senyawa jenis ini bekerja dengan cara menghambat sintesis protein atau mengikat kromosom. Hal ini ditunjukkan saat penambahan zat antibakteri pada fase logaritmik didapatkan jumlah sel total maupun jumlah sel hidup adalah tetap.
2. Bakteriosidal, yaitu senyawa antibakteri yang memberikan efek dengan cara membunuh sel tetapi tidak terjadi lisis sel atau pecahnya sel. Hal ini ditunjukkan saat penambahan zat antibakteri pada fase logaritmik didapatkan jumlah sel total tetap sedangkan jumlah sel hidup berkurang.
3. Bakteriolitik, yaitu senyawa antibakteri yang menyebabkan sel menjadi lisis atau pecah sehingga jumlah sel berkurang atau terjadi kekeruhan setelah penambahan antibakteri. Hal ini ditunjukkan saat penambahan zat antibakteri pada fase logaritmik didapatkan jumlah sel total maupun jumlah sel hidup yang menurun.

Mekanisme kerja antibakteri dalam menghambat pertumbuhan enzim dapat dibedakan menjadi lima kelompok, yaitu menghambat sintesis dinding sel, merubah molekul protein dan asam nukleat, merusak membran plasma, menghambat sintesis asam nukleat dan menghambat sintesis metabolit esensial (Pelczar dan Chan, 1988; Tortora *et al.*, 2002).

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan dilusi. Metode dilusi digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambatan Minimum (KBM) atau konsentrasi terendah dari agen antibakteri yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba (Mahon *and* Manuselis, 1995). Uji aktivitas antibakteri dengan metode *Disc Diffusion* (Tes Kirby-Beuer) digunakan untuk mengukur zona bening (*clear zone*) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambat pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam sampel (Hermawan., 2007). Pengukuran zona hambat dapat dilakukan setelah 24 jam masa inkubasi. Menurut teori Trager *and* Jensen, kekuatan zona hambatan mikroba berdasarkan diameter zona hambatnya terbagi menjadi beberapa klasifikasi, yaitu: sangat kuat (zona hambat lebih dari 20 mm), kuat (zona hambat 10-20 mm), sedang (zona hambat 5-10 mm), dan lemah (zona hambat kurang dari 5 mm) (Davis *and* Stout, 1971).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2021 – September 2021, bertempat di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor. Analisis spektrofotometri ultraungu-tampak (UV-Vis) dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis spektrofotometri inframerah (IR) dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik Institut Teknologi Bandung. Analisis spektrofotometri NMR dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Institut Teknologi Bandung. Uji bioaktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat-alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, penguap putar vakum, satu set alat Kromatografi Cair Vakum (KCV), satu set alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT), satu set alat Kromatografi Kolom (KK), lampu UV, pipet kapiler, pengukur titik leleh MP-10 Stuart, neraca analitik, *autoclave*,

Laminar Air Flow (LAF), jarum ose, cawan petri, Bunsen, inkubator, pinset, mikropipet, penggaris, botol media, spektrofotometer FT-IR, spektrofotometer ultraungu-tampak (UV-Vis), dan spektrofotometer $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) serta $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) merk *Agilent* dengan sistem konsol DD2.

3.2.2. Bahan-bahan yang digunakan

Kulit batang tumbuhan puda (A. *kemando* Miq) yang telah dideterminasi diperoleh dari Dusun Karang Anyar, Desa Klaten, Kecamatan Penengahan, Lampung Selatan pada tanggal 01 Februari 2020. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dan kromatografi dalam penelitian ini berkualitas teknis yang telah didestilasi sedangkan untuk analisis menggunakan spektrofotometer berkualitas pro-analisis (p.a). Bahan kimia yang digunakan meliputi metanol (MeOH), *n*-heksana ($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$), etil asetat (EtOAc), benzena (C_6H_6), aseton ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), akuades (H_2O), serium sulfat ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) 1,5 % dalam asam sulfat (H_2SO_4) 2 N, diklorometana (CH_2Cl_2), kloroform (CHCl_3), silika gel Merck G 60 untuk impregnasi, silika gel Merck 60 (35-70 Mesh) untuk KCV dan KK, untuk KLT digunakan plat KLT silika gel Merck kiesegal 60 F₂₅₄ 0,25 mm. Pereaksi geser untuk analisis spektrofotometer UV-Vis adalah AlCl_3 , HCl pekat, NaOAc, NaOH, dan H_3BO_3 . Bahan yang digunakan pada uji bioaktivitas meliputi kertas *Whatman* no.42, kapas, kain kasa, akuades steril, media *Nutrient Agar* (NA), bakteri *B. subtilis*, bakteri *E. coli*, *chloramphenicol*, dan *amoxycillin*.

3.3. Prosedur Penelitian

Adapun prosedur yang dilakukan pada penelitian ini meliputi pengumpulan dan persiapan sampel, ekstraksi sampel dengan metode maserasi, fraksinasi ekstraksi, kromatografi, analisis kemurnian, analisis struktur, dan pengujian bioaktivitas antibakteri.

3.3.1. Pengumpulan dan persiapan sampel

Sampel berupa kulit batang tumbuhan pudau yang diperoleh dari Dusun Karang Anyar, Desa Klaten, Kecamatan Penengahan, Lampung Selatan, kemudian dibersihkan dengan air sampai seluruh kotoran yang menempel pada kulit batang hilang. Apabila kotoran yang menempel sulit dihilangkan maka dibantu dengan menyikat kulit batang dengan sikat gigi. Sampel kulit batang tumbuhan pudau yang telah bersih kemudian dijemur di bawah sinar matahari sampai kering. Kulit batang tumbuhan pudau yang telah kering dipotong-potong menjadi ukuran yang lebih kecil, kemudian digiling hingga menghasilkan serbuk halus.

3.3.2. Ekstraksi sampel dengan metode maserasi

Serbuk halus kulit batang tumbuhan pudau sebanyak 3 kilogram diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol yang telah didestilasi. Maserasi dilakukan selama 1x24 jam sebanyak 3 kali pengulangan. Maserat hasil maserasi digabung dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan 100 rpm hingga diperoleh ekstrak pekat dan dihitung berat ekstrak yang terbentuk sebagai ekstrak kasar.

3.3.3. Fraksinasi ekstraksi

Ekstrak pekat metanol yang diperoleh dari proses maserasi selanjutnya dipisahkan berdasarkan tingkat polaritasnya yaitu mulai dari non polar, semi polar, dan polar. Fraksinasi sampel dilakukan dengan cara partisi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana (1:3) sebanyak 3 kali pengulangan dan dilanjutkan dengan pelarut etil asetat (1:2) dengan penambahan air sebanyak 3 kali pengulangan. Campuran dalam corong pisah dikocok, kemudian dibiarkan hingga terlihat pemisahan yang sempurna antara fase atas dan fase bawah lalu dipisahkan. Fraksi etil asetat hasil partisi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*, kemudian ditimbang berat ekstrak kering etil asetat yang dihasilkan dari partisi.

3.3.4. Kromatografi

Fraksi yang telah diperoleh kemudian dipisahkan lebih lanjut untuk memperoleh senyawa murni dengan metode kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi lapis tipis (KLT), dan kromatografi kolom gravitasi (KKG).

3.3.4.1. Kromatografi cair vakum (KCV)

Fraksi etil asetat hasil partisi yang telah kering ditimbang, kemudian dipisahkan dengan KCV. Pemisahan tersebut memanfaatkan kolom yang berisi fase diam dan aliran fase geraknya dibantu dengan pompa vakum (Raymond, 2006). Fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah silika gel 60 GF₂₅₄. Sedangkan eluen yang digunakan adalah *n*-heksana : etil asetat. Kolom KCV yang telah terpasang diisi dengan fase diam silika gel (silika halus) sebanyak 10 kali berat sampel yang dikemas dalam keadaan kering lalu dihisap dengan alat vakum, kemudian bagian atas fase diam ditutup dengan kertas saring. Eluen *n*-heksana selanjutnya dituangkan ke dalam kolom KCV lalu dihisap dengan alat vakum hingga kering untuk memperoleh kerapatan yang maksimum.

Fraksi etil asetat yang telah ditimbang selanjutnya diimpregnasi menggunakan silika gel yang ukuran partikelnya lebih besar (silika kasar) sebanyak 2 kali berat sampel. Fraksi kering etil asetat dilarutkan dalam aseton lalu diimpregnasikan pada silika kasar, kemudian silika kasar dimasukkan pada bagian atas fase diam silika halus secara merata. Pada bagian atas silika kasar diletakkan kertas saring lalu dihisap dengan alat vakum. Sampel yang telah siap kemudian dielusi secara bertahap dengan berbagai varian perbandingan kepolaran menggunakan pelarut *n*-heksana : etil asetat (100 : 0% – 0 : 100%). Kolom dihisap sampai kering pada setiap penambahan eluen. Fraksi–fraksi yang memiliki pola fraksinasi yang sama digabungkan. Proses pemurnian sampel dengan metode KCV ini dilakukan secara berulang dengan perlakuan yang sama seperti tahapan KCV awal.

3.3.4.2. Kromatografi lapis tipis (KLT)

Uji KLT dilakukan pada setiap fraksi-fraksi hasil KCV untuk memonitoring pola pemisahan komponen-komponen senyawa yang terdapat dalam tiap fraksi hasil KCV. Fraksi yang menghasilkan pola pemisahan atau nilai R_f yang sama digabungkan menjadi satu fraksi. Pada uji KLT digunakan sistem campuran eluen sebagai fase gerak yaitu dapat berupa kombinasi antara *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan yang sesuai. Fase diam yang digunakan pada uji KLT ini yaitu silika gel Merck kiesegal 60 F₂₅₄ 0,25 mm. Sampel yang akan diKLT dilarutkan dalam aseton, kemudian ditotolkan pada permukaan plat silika menggunakan pipa kapiler. Plat silika selanjutnya dielusi menggunakan campuran eluen dengan perbandingan yang menghasilkan pola pemisahan terbaik. Bercak/noda pada plat silika dilihat di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Plat silika tersebut selanjutnya disemprot menggunakan larutan serum sulfat untuk menampakkan noda hasil KLT yang spesifik terhadap senyawa flavonoid. Fraksi-fraksi yang menghasilkan pola pemisahan dengan nilai R_f yang sama digabungkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* untuk fraksinasi lebih lanjut hingga didapatkan isolat murni dengan noda/spot tunggal pada plat silika.

3.3.4.3. Kromatografi kolom gravitasi (KKG)

Fraksi-fraksi hasil KCV yang telah digabungkan menghasilkan jumlah yang lebih sedikit dibandingkan sebelumnya. Fraksi-fraksi tersebut akan difraksinasi lebih lanjut menggunakan Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG). Pada KKG digunakan adsorben (fase diam) berupa silika gel Merck (35-70 Mesh) yang dilarutkan dalam pelarut untuk proses pengelusian hingga berbentuk bubur (*slurry*). Bubur atau *slurry* tersebut dimasukkan ke dalam kolom dan diatur hingga rapat (tidak memiliki rongga) dan rata. Sampel yang telah diimpregnasi pada silika gel selanjutnya dimasukkan ke dalam wadah kolom yang berisi bubur (*slurry*). Usahakan kolom tidak kering/kehabisan pelarut saat memasukkan sampel agar tidak mempengaruhi kerapatan fase diam, sehingga proses elusi tidak akan terganggu.

3.3.5. Analisis kemurnian

Hasil KKG yang diperoleh di analisis kemurniannya menggunakan metode KLT dan uji titik leleh. Pada uji kemurnian dengan metode KLT digunakan berbagai campuran fase gerak (eluen) seperti *n*-heksana, kloroform, etil asetat dan metanol serta digunakan tiga variasi nilai *R_f*. Pada uji KLT kemurnian suatu senyawa ditunjukkan dengan timbulnya noda tunggal pada plat silika. Uji kemurnian dengan metode titik leleh menggunakan alat pengukur titik leleh. Alat tersebut harus dibersihkan terlebih dahulu agar tidak terdapat pengotor yang dapat mempengaruhi temperatur titik leleh kristal yang sebenarnya. Kristal yang berukuran besar digerus hingga berbentuk serbuk lalu dimasukkan ke dalam pipet kapiler. Pipet kapiler tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam alat pengukur titik leleh yang telah dihidupkan. Titik leleh kristal dapat diamati dengan bantuan kaca pembesar yang terdapat pada alat pengukur. Titik leleh kristal dapat diukur dari suhu pada saat kristal pertama kali meleleh sampai semua kristal meleleh. Pengukuran ini dilakukan sebanyak tiga kali, jika menunjukkan hasil pengukuran yang sama, maka senyawa yang diperoleh sudah murni.

3.3.6. Analisis struktur

Kristal murni yang telah diperoleh kemudian dianalisis strukturnya dengan alat spektrofotometer UV-Vis, inframerah (IR), dan NMR. Hasil pengukuran dengan beberapa alat spektrofotometer tersebut selanjutnya dibandingkan dengan literatur untuk mengetahui nama dan struktur dari kristal murni tersebut.

3.3.6.1. Spektrofotometer UV-Vis

Sampel berupa kristal murni sebanyak 0,001 gram dilarutkan ke dalam 10 mL metanol. Larutan ini digunakan sebagai persediaan untuk beberapa kali pengukuran yang dibagi menjadi beberapa bagian. Satu bagian diambil untuk mengukur serapan maksimum sampel dalam metanol. Bagian-bagian yang lain ditambahkan beberapa pereaksi geser seperti natrium hidroksida (NaOH) 2 M (0,8

gram NaOH dilarutkan dalam 10 mL akuades), HCl pekat 5 mL dalam 10 mL akuades, AlCl_3 5% (0,25 gram AlCl_3 dilarutkan dalam 5 mL Metanol), padatan natrium asetat (NaOAc), dan asam borat (H_3BO_3). Selanjutnya, masing-masing bagian yang telah ditambahkan pereaksi geser tersebut diukur serapan maksimumnya.

3.3.6.2. Spektrofotometer Inframerah (IR)

Sampel kristal hasil isolasi yang akan dianalisis menggunakan spektrofotometer inframerah terlebih dahulu dibebaskan dari air. Kristal yang telah bebas dari air kemudian digerus bersama-sama dengan padatan halida organik berupa KBr. Alasan KBr digunakan karena KBr tidak menghasilkan serapan pada IR sehingga yang teramati langsung adalah serapan dari sampel. Gerasan kristal murni dengan KBr dibuat menjadi *pellet* transparan dengan alat penekan hidrolik. Apabila pellet yang dihasilkan masih buram dan tidak jernih, maka proses pembuatan pellet diulang kembali. Pellet transparan selanjutnya dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer IR dan diukur puncak serapannya (Sulistiyani dan Huda, 2017).

3.3.6.3. Spektrofotometer NMR

Sampel berupa kristal murni yang akan dianalisis dilarutkan ke dalam pelarut inert yang tidak mengandung proton. Pada penelitian ini digunakan pelarut untuk analisis NMR berupa CDCl_3 . Sampel tersebut selanjutnya ditempatkan dalam medan magnet, sehingga akan terjadi interaksi antara medan magnet luar dan magnet inti yang menyebabkan timbulnya energi. Energi tersebut akan terkuantisasi ke dalam bentuk spektrum oleh inti karena inti merupakan materi mikroskopik (Gauglitz and Vo-Dinh, 2003). Hasil pengukuran dengan spektrofotometri NMR berupa spektrum $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, dan HMBC.

3.3.7. Pengujian bioaktivitas antibakteri

Pada uji bioaktivitas terlebih dahulu dilakukan sterilisasi alat, yaitu semua alat gelas dibungkus menggunakan kertas dan disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit kemudian alat disimpan dalam LAF, sedangkan untuk jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara dibakar di atas api langsung. Sebanyak 4,2 gram *Nutrient Agar* (NA) dilarutkan dalam 150 mL aquades, kemudian dipanaskan selama 15 menit sampai homogen dan larutan media agar menjadi bening. Selanjutnya, media agar dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 15 mL/tabung reaksi dan 5 mL/tabung reaksi. Media agar yang telah dimasukkan ke dalam tabung reaksi dibungkus menggunakan kertas lalu disterilkan pada suhu 121 °C selama 15 menit (Lay dan Hastowo, 1992).

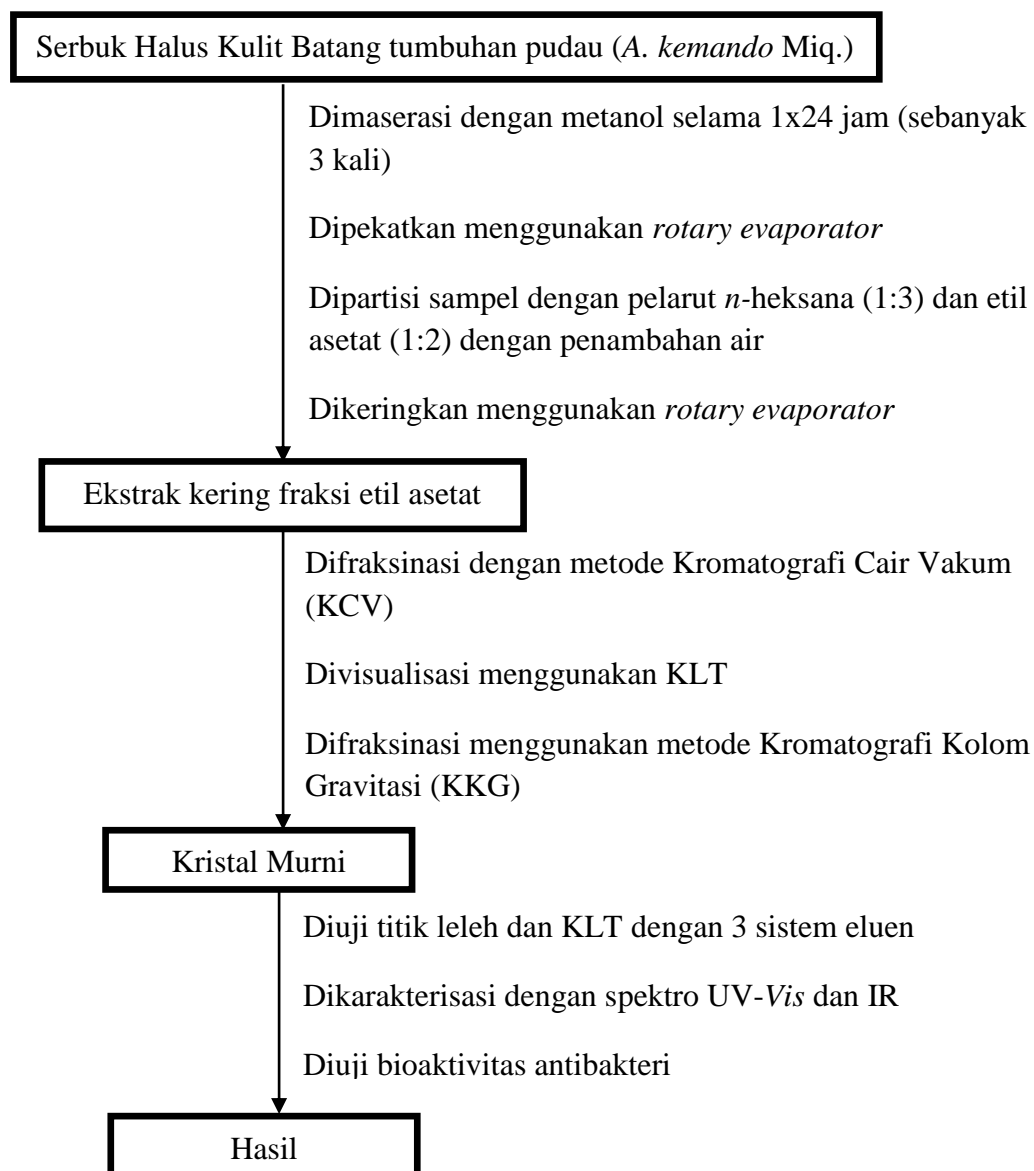
Senyawa hasil isolasi dibuat variasi tiga konsentrasi: 0,5; 0,4; dan 0,3 mg/*disk*. Sebanyak 1,5 mg sampel dilarutkan dalam 150 µL metanol pro analisis, kemudian diambil 50, 40, dan 30 µL untuk ditotolkan ke dalam *paper disk*. Pada uji bioaktivitas antibakteri, *amoxycillin* digunakan sebagai kontrol positif terhadap *B. subtilis*, sedangkan *chloramphenicol* digunakan sebagai kontrol positif terhadap *E. coli*. Masing-masing kontrol positif dibuat tiga variasi konsentrasi: 0,15; 0,10; dan 0,05 mg/*disk*. Padatan kontrol positif sebanyak 1,5 mg dilarutkan dalam 500 µL metanol pro analisis, kemudian diambil 50; 33,3; dan 16,7 µL untuk ditotolkan ke dalam *paper disk*.

Pengujian bioaktivitas antibakteri dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) agar tidak terjadi kontaminasi terhadap sampel uji. Media agar 15 mL/tabung reaksi dituangkan ke dalam cawan petri dan ditunggu hingga media memadat. Setelah itu, satu ose biakan bakteri *E. coli* dan bakteri *B. subtilis* dibiakkan dalam 1 mL aquades steril, dihomogenkan, dan dituangkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 5 mL media agar steril. Media agar berisi suspensi bakteri dituang ke dalam cawan yang berisi media agar padat. Selanjutnya *paper disk* yang berisi sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif (metanol) dimasukkan ke dalam media yang telah dibuat. Cawan petri ditutup dengan *plastic wrap*, kemudian

dimasukkan ke dalam inkubator selama 1x24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur dalam satuan milimeter (mm) menggunakan mistar berskala (Vandepitte dkk., 2005).

3.3.8. Diagram penelitian

Ikhtisar yang diperoleh dari prosedur penelitian yang telah diuraikan di atas dapat dilihat dalam diagram penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Diagram penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan pembahasan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi senyawa flavonoid yang merupakan senyawa artoheterofilin C dari kulit batang tumbuhan pudau (*A. kemando* Miq.) sebanyak 10 mg dan memiliki sifat fisik berupa serbuk berwarna kuning dengan titik leleh 247–249 °C.
2. Senyawa artoheterofilin C hasil isolasi pada konsentrasi 0,3 mg/disk telah menunjukkan aktivitas antibakteri dengan kategori sedang terhadap bakteri *E.coli* dan *B. subtilis*.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, terdapat beberapa saran untuk penelitian selanjutnya yaitu :

1. Penelitian lebih lanjut terhadap fraksi lain sampel kulit batang tumbuhan pudau (*A. kemando* Miq.) perlu dilakukan sehingga dapat diperoleh informasi lebih luas mengenai senyawa flavonoid yang terkandung di dalamnya.

2. Melakukan pengulangan pada uji bioaktivitas antibakteri senyawa artoheterofilin C yang diisolasi dari kulit batang tumbuhan pudau (*A. kemando* Miq.).
3. Melakukan uji aktivitas biologis lainnya seperti uji antikanker atau antidiabetes agar lebih mengetahui aktivitas biologis dari senyawa artoheterofilin C yang diisolasi dari kulit batang tumbuhan pudau (*A. kemando* Miq.).

DAFTAR PUSTAKA

- Abramson, S. and Singh, A.K. 2000. *Treatment of the Alcohol Intoxication: Ethylene Glycol, Methanol and Isopropanol*. Lippincott Williams and Wilkins. USA.
- Achmad, S.A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam, Materi 4: Ilmu Kimia Flavonoid*. Karunia Universitas Terbuka. Jakarta.
- Agusta, A. 2009. *Biologi dan Kimia Jamur Endofit*. Penerbit ITB. Bandung.
- Ansel, H.C. 2008. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi, Edisi IV*. UI Press. Jakarta.
- Ariza, L.D. 2020. Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Bagian Kulit Cabang Tumbuhan Puda (*Artocarpus kemando* Miq.). (Skripsi). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Lampung.
- Ashari, S. 1995. *Hortikultura Aspek Budidaya*. UI Press. Jakarta.
- Bebarta, V.S., Heard, k., and Dart, R.C. 2006. Inhalational abuse of methanol products: elevated methanol and formate levels without vision loss. *Am. J. Emerg. Med.* **24**(6): 725-728.
- Borisha, I. 2017. Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Fraksi Semi Polar Kulit Akar Tumbuhan Puda (*Artocarpus kemando* Miq.). (Skripsi). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Lampung.
- Braithwaite, A. and Smith, F.J. 1995. *Chromatographic Methods*. Kluwer Academic Publishers. London.

- Breitmaier, E. 2002. *Structure Eludation by NMR in Organic Chemistry. A Practial Guide. Third Revised Edition.* John Willey and Sons Ltd. England.
- Christian, G.D. 1994. *Analytical Chemistry, Fifth Edition.* John Wiler and Sons. USA.
- Dachriyanus. 2004. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi.* LPTIK Universitas Andalas. Padang.
- Darmawanti, A.A.S.K., Bawa, I.G.A.G., dan Suirta, I.W. 2015. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid pada Daun Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lmk.) dan Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kimia.* **9**(2): 203-210.
- Davis, W.W. and Stout, T.R. 1971. Disc Plate Method Of Microbiological Antibiotic Assay. *J. Microbiol.* **22**(4): 659-665.
- Day, R.A. dan Underwood, A.L. 1981. *Analisa Kimia Kuantitatif Edisi Keempat.* Erlangga. Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV.* Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Derome, E. 1995. *Modern NMR Techniques for Chemistry Research.* Pergamon Press. Oxford.
- Dwidjoseputro, D. 1985. *Dasar-dasar Mikrobiologi.* Djambatan. Jakarta.
- Ee, G.C.L., Teo, S.H., Go, R., Lim, C.K., Lim, Y.M., and Bong, C.F.J. 2012. Free Radical Scavenging Effect of *Artocarpus kemando* and *Artocarpus odoratissimus* : Structure-Activity Relationship of Flavonoid Derivatives. *Asian J. Chem.* **24**(1): 231-234.
- Ee, G.C.L., Teo, S.H., Kwong, H.C., Tahir, M.I.M., and Silong, S. 2010. 12-Acetyl-6-hydroxyl-3,3,9,9-tetra-methylfurol[3,4-b]pyranol[3,2-h]-xanthene-7,11 (3H,9H)-dione. *Acta Cryst.* **66**: 03331-03332.
- Ee, G.C.L., Teo, S.H., Rahmani, M., Lim, C.K., Lim, Y.M., and Go, R. 2011. Artomandin, A New Xanthone from *Artocarpus kemando* (Moraceae). *J. Nat. Prod.* **25**(10): 995-1003.

- Elfidasari, D., Saraswati, A.M., Nufadianti, G., Samiah, R., dan Setiowati, V. 2011. Perbandingan Kualitas Es di Lingkungan Universitas Al Azhar Indonesia dengan Restoran *Fast Food* di Daerah Senayan dengan Indikator Jumlah *Escherichia coli* Terlarut. *SST*. **1**(1): 18-23.
- Epker, J.L. and Bakker, J. 2010. Accidental Methanol Ingestion: Case report. *BMC Emergency Medicine*. **10**(3): 1-6.
- Ersam, T. 2004. Keunggulan Biodiversitas Hutan Tropika Indonesia Dalam Merekayasa Model Molekul Alami. *Prosiding Seminar Nasional Kimia VI*. ITS. Surabaya. Hlm. 4.
- Fajariah, N.I. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae* serta Biografiya. (Skripsi). Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Fatimah, N. 2017. Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Kayu Akar Tumbuhan Puda (*Artocarpus kemando* Miq.). (Skripsi). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Lampung.
- Fessenden, R.J. dan Fessenden, J.S. 1986. *Kimia Organik*. Alih Bahasa Hadyana Pujaatmaka. Erlangga. Jakarta.
- Gauglitz, G. and Vo-Dinh, T. 2003. *Handbook of Spectroscopy*. Willey-VCH. Weinheim.
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M., dan Schwarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Alih Bahasa K. Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung.
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri Jilid I*. Alih Bahasa Ketaren. UI Press. Jakarta.
- Hafid, A.F., Aoki, U.C., Permanasari, A.A., Adianti, M., Tumewu, L., Widyawaruyanti, A., Wahyuningsih, S.P.A., Wahyuni, T.S., Lusida, M.I., Soetjipto, and Hotta, H. 2017. Antiviral Activity of the Dichloromethane Extracts from *Artocarpus heterophyllus* Leaves againts Hepatitis C Virus. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. **7**(7): 633-639.

- Hafid, A.F., Ariantari, N.P., Tumewu, L., Hidayati, A.R., and Widyawaruyanti, A. 2012. The Active Marker Compound Identification of *Artocarpus champeden* spreng Stembark Extract, Morachalcone A as Antimalarial. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**(5): 246-249.
- Hakim, A. 2009. A Prenylated Flavone from the Heartwood of *Artocarpus scortechinii* King (Moraceae). *Indo. J. Chem.* **9**(1): 146-150.
- Hakim, A. 2010. Diversity of Secondary Metabolites from Genus *Artocarpus* (Moraceae). *Bioscience.* **2**(3): 146-156.
- Hannif, S.M. dan Kusचितawaty, S. 2011. Faktor Risiko Diare Akut Pada Balita. *BKM.* **27**(1): 10-17.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan.* ITB Press. Bandung.
- Hardjono, S. 1985. *Kromatografi.* Liberty. Yogyakarta.
- Harijuliatri, R. 2019. Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Kulit Akar Tumbuhan Puda (*Artocarpus kemando* Miq.). (Skripsi). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Lampung.
- Hashim, N., Mawardi, R., Shireen, S.S., Ee, G.C.L., Sukari, M.A., Ali, A.M., and Go, R. 2011. Dipeptide and xanthenes from *Artocarpus kemando* Miq. *J. Med. Plants Res.* **5**(17): 4224-4230.
- Hermawan, A. 2007. Pengaruh Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan Metode Difusi Disk. (Skripsi). Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hernawan. 2008. Isolasi Senyawa Flavonoid dari Kulit Batang *Artocarpus rigida*. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Heyne, K. 1987. *Useful Plants of Indonesia volume II.* Yayasan Sarana Wana Jaya. Badan Litbang Kehutanan. Jakarta.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T., and William, S.T. 2000. *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edition.* William and Wilkin. USA.

- Hostettman, K., Hostettman, M., dan Manson, A. 1995. *Cara Kromatografi Preparatif Penggunaan pada Senyawa Bahan Alam*. Alih Bahasa K. Padmawinata. ITB Press. Bandung.
- Jawetz, E., Melnick, J.L., dan Adelbergs, E.A. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Salemba Medika. Jakarta.
- Jawetz, E. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 20*. EGC. Jakarta.
- Jenie, U.A., Kardono, L.B.S., Hanafi, M., Rumampuk, R.J., dan Darmawan, A. 2014. *Teknik Modern NMR: Teori dan Aplikasi dalam Eludasi Struktur Molekul Organik*. Lipi Press. Jakarta.
- Johnson, L.E. dan Stevenson, R. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Alih Bahasa Kosasih Padmawinata. ITB Press. Bandung.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2011. *Buku Pedoman Pengendalian Penyakit Diare. Direktorat Jenderal Pengendalian dan Penyehatan Lingkungan*. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Khopkar, S.M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Alih Bahasa A. Saptorahardjo. UI Press. Jakarta.
- Lay, B.W. dan Hastowo, S. 1992. *Mikrobiologi*. IPB. Bogor.
- Leite, V.G., Mansano, V.F., and Teixeira, S.P. 2018. Floral Development of Moraceae Species with Emphasis on the Perianth and Androecium. *Flora*. **240**: 116-132.
- Lestari, T. 2009. Dampak Konversi Lahan Pertanian Bagi Taraf Hidup Petani. (Skripsi). IPB. Bogor.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms, Ninth Edition*. Prentice-Hall. London.
- Mafazah, L. 2013. Ketersediaan Sarana Sanitasi Dasar, Personal *Hygiene* Ibu dan Kejadian Diare. *Kemas*. **8**(2): 176-182.
- Mahon, C.R. and Manuselis, J.R. 1995. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. WB. Saunder Company. USA.

- Mamonto, S.I., Runtuwene, M.R.J., dan Wehantouw, F. 2014. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Biji Buah Pinang Yaki (*Areca Vestitaria Giseke*) yang di Ekstrak secara Soklet. *Pharmacon*. **3**(3): 263-272.
- Mandia, S.M., Purnamasari, H., Kurniawan, E., Magdaulih, R., Helvetia, B., Suveltri, R., Anugrah, dan Dewi, A.S. 2010. *Studi Flora Jenis-jenis Tumbuhan di Jorong Lubuk Selasih, Kanagarian Batang Barus, Kecamatan Aro Suka, Kabupaten Solok, Sumatera Barat*. Universitas Andalas. Padang.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Alih Bahasa Kosasih Padmawinata. ITB. Bandung.
- McKetta, J.J. and Cuningham, W.A. 1977. *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Munawaroh, S. dan Handayani, P.A. 2010. *Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix D.C.*) dengan Pelarut Etanol dan N-heksana*. UNNES. Semarang.
- Neldawati, Ratnawulan, dan Gusnedi. 2013. Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pillar of Physics*. **2**: 76-83.
- Nguyen, K.V., Do, N.T.T., Nguyen, T.V., Pham, C.V., Doan, P.M., Nguyen, A.Q., Nguyen, C.K.T., Larsson, M., Escalante, S., Olowokure, B., Laxminarayan, R., Gelband, H., Horby, P., Ngo, H.B.T., Hoang, M.T., Farrar, J., Hien, T.T., and Wertheim, H.F. 2013. Antibiotic Use and Resistance in Emerging Economies: A Situation Analysis for Viet Nam. *BMC Public Health*. **13**: 1-10.
- Nomer, N.M.G.R., Duniaji, A.S., dan Nocianitri, K.A. 2019. Kandungan Senyawa Flavonoid dan Antosianin Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*) serta Aktivitas Antibakteri Terhadap *Vibrio cholence*. *Jurnal Itepa*. **2**(2): 216-225.
- Nuntawong, N., Eiamchai, P., Somrang, W., and Denchitcharoen, S. 2017. Detection of Methamphetamine/Amphetamine in Human Urine Based on Surface-enhanced Raman Spectroscopy and Acidulation Treatments. *Sensor Actuat B-Chem*. **239**: 139-146.

- Octiviani, R., Zaharah, T.A., dan Ardiningsih, P. 2019. Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Metanol Kulit Kayu Batang Sukun (*Artocarpus altilis* Park) yang tersalut Kitosan-Tripolipospat. *JKK*. **8**(2): 34-40.
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi (Jilid 2)*. UI Press. Jakarta.
- Purwoko, T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Bumi Aksara. Jakarta.
- Rahim, A., Lintong, M., Suharto, dan Josodiwondo, S. 1994. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran Ed. Revisi*. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Rajalakshmi, D. and Narasimhan, S. 1985. *Food Antioxidants: Sources and Methods of Evaluation*. Marcel Dekker Inc. Hongkong.
- Raydian, A.U., Kurniawaty, E., and Ramtika. 2017. Antidiabetic Effects of *Artocarpus atlitis* Leaves. *Medula*. **7**(4): 118-122.
- Raymond, C. 2006. *Kimia Dasar Edisi Ketiga Jilid 1*. Erlangga. Jakarta.
- Rezki, D., Ahmad, F., dan Gusnidar. 2007. Ekstraksi Bahan Humat dari Batubara (*Subbituminus*) dengan Menggunakan 10 Jenis Pelarut. *J. Solumn*. **4**(2): 73-80.
- Risdian, C., Mozef, T., dan Lotulung, P.D.N. 2014. Isolasi Siklomunol dari Daun Sukun *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg serta Aktivitasnya sebagai Antikanker. *JKTI*. **16**(2): 82-86.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Penerbit ITB. Bandung.
- Saifudin, A. 2014. *Senyawa Metabolite Sekunder (Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian)*. Deepublish. Yogyakarta.
- Sanders, J.K.M. and Hunter, B.K. 1993. *Modern NMR Spectroscopy*. Oxford University Press. Oxford.
- Santoso, P. dan Suhartati, T. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Flavonoid dari Kulit Akar Tumbuhan Sukun *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg. *J. Sci. Appl. Tech*. **2**(1): 54-61.

- Sarker, S.D., Latif, Z., and Gray, A. 2006. *Methods in Biotechnology: Natural Product Isolation Twenty Edition*. Humana Press. New Jersey.
- Sastrohamidjojo, H. 1985. *Kromatografi Edisi I Cetakan I*. Liberty. Yogyakarta.
- Situmorang, M. 2010. *Kimia Analitik Lanjut dan Instrumentasi*. FMIPA Universitas Negeri Medan. Medan.
- Smith-Keary, P.F. 1988. *Genetic Elements in Escherichia coli*. Macmillan Molecular Biology Series. London.
- Soesanto, L. 2008. *Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Alih Bahasa Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. ITB Press. Bandung.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. 1997. *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian Edisi Keempat*. Liberty. Yogyakarta.
- Suhartati, T., Yandri, A.S., Suwandi, J.F., and Hadi, S. 2010. In vitro and in vivo antiplasmodial activity of oxyresveratol and artonine isolated from two *Artocarpus* plants in Indonesia. *Orient J. Chem.* **26**(3): 825-830.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrofotometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Anugrah Utama Raharja. Lampung.
- Sulistiyani, M. dan Huda, N. 2017. Optimasi Pengukuran Spektrum Vibrasi Sampel Protein Menggunakan Spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (FT-IR). *Indo. J. Chem. Sci.* **6**(2): 173-180.
- Sulistyo. 1971. *Farmakologi dan Terapi*. Penerbit EKG. Yogyakarta.
- Supardi dan Sukamto. 1999. *Mikrobiologi, Pengelolaan dan Keamanan Pangan*. Alumni. Jakarta.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., and Case, C.L. 2002. *Microbiology an Introduction 8th Edition*. Pearson. New York.

- Vandepitte, J., Engbaek, K., Rohmar, P., Pint, P., dan Heuck, C.G. 2005. *Prosedur Laboratorium Dasar untuk Bakteriologis Klinis, Edisi 2*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Verhejj, E.W.M. and Coronel, R.E. 1992. *Plant Resources of South Asia No. 2 Edible Fruits and Nuts*. Prosea Foundation. Bogor.
- Wanto, E.P. dan Romli, R.M. 1977. *Alat-alat Industri Kimia I*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Jakarta.
- Wu, Z.Y., Monro, A.K., Milne, R.I., Wang, H., Yi, T.S., Liu, J., and Liu, D.Z. 2013. Molecular phylogeny of the nettle family (Urticaceae) inferred from multipl loci of three genomes and extensive generic sampling. *Mol. Phylogenet. Evol.* **69**: 814-827.
- Yudhapratama, E. 2010. *Penentuan Keberadaan Zat Aditif pada Plastik Kemasan Melalui Perlakuan Pemanasan pada Spektrofotometer IR*. UPI. Bandung.
- Yulia, H. 2019. *Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Kayu Cabang Tumbuhan Puda (Artocarpus kemando Miq.)*. (Skripsi). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Lampung.
- Zakaria, Soekamto, N.H., Syah, Y.M., dan Firdaus. 2017. Aktivitas Antibakteri dari Fraksi *Artocarpus integer* (Thunb.) Merr. dengan Metode Difusi Agar. *JIHP*. **12**(2): 1-6.
- Zheng, Z.P., Chen, S., Wang, S., Wang, X.C., Cheng, K.W., Wu, J.J., Yang, D., and Wang, M. 2009. Chemical Components and Tyrosinase Inhibitors from the Twings of *Artocarpus heterophyllus*. *J. Agric. Food Chem.* **57**(15): 6649-6655.