



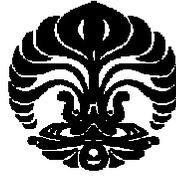
UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI STRUKTUR MOLEKUL
SERTA UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA SENYAWA KIMIA
DARI EKSTRAK *n*-HEKSANA RIMPANG DRINGO
(*Acorus calamus* Linn.)**

SKRIPSI

**EKA IRMAWATI ACHMAD
0606070661**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI STRUKTUR MOLEKUL
SERTA UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA SENYAWA KIMIA
DARI EKSTRAK *n*-HEKSANA RIMPANG DRINGO
(*Acorus calamus* Linn.)**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**EKA IRMAWATI ACHMAD
0606070661**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Eka Irmawati Achmad

NPM : 0606070661

Tanda Tangan :

Tanggal : 13 Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Eka Irmawati Achmad
NPM : 0606070661
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Isolasi dan Identifikasi Struktur Molekul serta Uji Aktivitas Antimikroba Senyawa Kimia dari Ekstrak *n*-Heksana Rimpang Dringo (*Acorus calamus* Linn.)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Atiek Soemiati, Apt. M.S ()

Pembimbing II : Dr. Sri Hartati, M.Si ()

Penguji I : DR. Katrin, M.S ()

Penguji II : Dr. Nelly Dhevita Leswara, M.Sc, Apt. ()

Penguji III : Dr. Herman Suryadi, M.S ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 13 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini, sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Studi Sarjana Farmasi di Universitas Indonesia.

Dengan segala kerendahan hati penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan ucapan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.S, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI, terima kasih atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk melaksanakan penelitian.
2. Ibu dan Bapak dosen pengajar dan seluruh karyawan di Departemen Farmasi FMIPA UI, terima kasih banyak atas semua ilmu yang diberikan dari awal penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi.
3. Prof. Dr. L. B. S. Kardono selaku Kepala Pusat Penelitian Kimia LIPI yang telah mengizinkan saya melakukan penelitian di Pusat Penelitian LIPI Kimia Serpong.
4. Dr. M. Hanafi selaku Kepala Bidang Kimia Bahan Alam Pangan dan Farmasi Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong.
5. Prof. Dr. Atiek Soemiati, Apt. M.S dan Dr. Sri Hartati, M.Si selaku pembimbing penelitian yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan memberikan petunjuk serta saran dalam menyelesaikan penelitian ini.
6. DR. Katrin, M.S selaku pembimbing akademik atas bimbingan dan bantuan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi.
7. Keluarga tercintaku: Mama, Bapak dan Uwi atas pengorbanan dan dorongan semangat serta doa yang tercurah sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
8. Ibu Endah dari Pusat Laboratorium Forensik Mabes Polri yang telah membantu dalam memperoleh data spektrum massa yang saya perlukan.
9. Pak Ahmad dan Bu Sofa yang telah membantu dalam memperoleh data spektrum NMR.

10. Pak Ghozali yang telah membantu dalam memperoleh data spektrum inframerah.
11. Teman-teman tersayang: Arikadia, Yoyon, Tuti, Dede, Sari, Dira, Chiro, Ani, Nisa, Uni, Kak Mutia, kak Tia, kak Dwitya, Sista, teman-teman laboratorium kimia kuantitatif, teman-teman laboratorium bioteknologi, Rainbow United Farmasi angkatan 2006, semuanya.
12. Teman-teman kosan Wisma Ambari: Anita, Resya, Nazi dan kak Memey.
13. Keluarga MICEL 2009, teruntuk BPH tersayang Yudha, Tyo, Kucel, Ekope, Vita, Mpay, Ines, Andi, Yogi, Dewi, Numa, Utha. Selalu dihati.
14. Teman-teman penelitian di Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong: Renny, Nurul, Chece, Rachma, Sheila, dan Amalia. Senang bertemu dengan temen-teman seperjuangan seperti kalian.
15. Ibu Lia, Ibu Mega, Bapak-bapak dan Ibu-ibu S2 Farmasi dan S2 Kimia UI: Ibu Triyem, Pak Najib, Pak Masrukhan, Pak Ketut, Mbak Selly, Pak Franky, Ibu Erna, Ibu Jamilah, yang telah banyak membantu saat penelitian di LIPI Kimia Serpong.
16. Mba Catur dan Mas Tri, laboran di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi FMIPA UI.
17. Serta untuk pihak lain yang tidak sempat disebutkan di sini, terima kasih atas bantuannya bagi penulis.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis
2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Eka Irmawati Achmad
NPM : 0606070661
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :
Isolasi dan Identifikasi Struktur Molekul serta Uji Aktivitas Antimikroba Senyawa Kimia dari Ekstrak *n*-Heksana Rimpang Dringo (*Acorus calamus* Linn.)

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 13 Juli 2010

Yang menyatakan

(Eka Irmawati Achmad)

ABSTRAK

Nama : Eka Irmawati Achmad
Program Studi : Farmasi
Judul : Isolasi dan Identifikasi Struktur Molekul serta Uji Aktivitas Antimikroba Senyawa Kimia dari Ekstrak *n*-Heksana Rimpang Dringo (*Acorus calamus* Linn.)

Dringo (*Acorus calamus* Linn.) adalah tanaman dari suku Acoraceae. Tanaman ini secara tradisional digunakan untuk mengobati demam dan bengkak. Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi senyawa kimia dari ekstrak *n*-heksana rimpang dringo dan mengetahui aktivitas antimikrobanya. Isolasi senyawa dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dan kromatotron. Analisis struktur senyawa dilakukan menggunakan data spektroskopi IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR dan massa. Uji aktivitas antimikroba dilakukan pada ekstrak *n*-heksana dan senyawa murni. Pengujian aktivitas antimikroba menggunakan metode difusi cakram dengan mengamati zona hambat. Hasil analisis spektroskopi senyawa murni adalah β -asaron {*cis*-1,2,4-trimetoksi-5-(1-propenil)-benzen}. Hasil uji antimikroba ekstrak *n*-heksana memperlihatkan adanya aktivitas terhadap bakteri *Streptococcus β haemolyticus grup A* dan jamur *Candida albicans* pada konsentrasi minimum 31,25 mg/mL, sedangkan terhadap *Salmonella typhosa* ATCC 14028 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah 62,5 mg/mL, serta terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633 adalah 125 mg/mL. Hasil uji antimikroba β -asaron memperlihatkan aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Streptococcus β haemolyticus grup A* pada konsentrasi minimum 12,5 mg/mL, sedangkan terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhosa* ATCC 14028 dan jamur *Candida albicans* adalah 25 mg/mL. Kedua zat uji, baik ekstrak *n*-heksana maupun isolat β -asaron tidak memiliki aktivitas terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kata kunci : *Acorus calamus*; antimikroba; β -asaron; kromatotron
xiii+70 halaman : 33 gambar; 4 tabel; 7 lampiran
Daftar acuan : 33 (1978-2010)

ABSTRACT

Name : Eka Irmawati Achmad
Program Study : Pharmacy
Title : Isolation and Identification The Molecular Structure and Antimicrobial Activity Assay of Chemical Compound from *n*-Hexane Extract of Dringo (*Acorus calamus* Linn.) Rhizome.

Dringo (*Acorus calamus* Linn.) family of Acoraceae. The rhizome of *Acorus calamus* is widely used for therapy fever and inflammation in traditionally folk medicine. This research was intended to isolate chemical compound from *n*-hexane extract of dringo rhizome and investigate antimicrobial activity. Isolation of compound carried out using column chromatography and chromatotron. Analysis structure of compound was established based on spectroscopic data of IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and Mass. Antimicrobial assay carried out on extract *n*-hexane and pure compound. Antimicrobial assay used the disk diffusion method by observing the inhibition zone. Result of spectroscopic analysis pure compound is β asarone {*cis*-1,2,4-trimethoxy-5-(1-propenyl)-benzene}. Antimicrobial activity assay of *n*-hexane extract showed against *Streptococcus β haemolyticus group A* and *Candida albicans* with minimum concentration value 31,25 mg/mL, meanwhile against to *Salmonella typhosa* ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 is 62,5 mg/mL, and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 is 125 mg/mL. The activity of β -asaron showed against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Streptococcus β haemolyticus group A* with minimum concentration value 12,5 mg/mL, meanwhile for *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhosa* ATCC 14028 and *Candida albicans* is 25 mg/mL. Both *n*-hexane extract and β -asaron have no activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Keywords : *Acorus calamus*; antimicrobial; β -asarone; chromatotron
xiii+70 pages : 33 figures; 4 tables; 7 appendices
Bibliography : 33 (1978-2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Dringo	4
2.1.1 Klasifikasi	4
2.1.2 Nama Lain	4
2.1.3 Morfologi	5
2.1.4 Ekologi dan Penyebaran	5
2.1.5 Kandungan Kimia	5
2.1.6 Khasiat	6
2.2 Ekstraksi	6
2.3 Kromatografi.....	7
2.3.1 Kromatografi Kolom.....	7
2.3.1.1 Penyerap (fase diam).....	7
2.3.1.2 Pelarut Pengelusi (fase gerak).....	7
2.3.1.3 Pembuatan Kolom	8
2.3.2 Kromatografi Lapis Tipis.....	8
2.3.3 Kromatotron	9
2.4. Spektroskopi.....	10
2.4.1 Spektroskopi Inframerah	10
2.4.2 Spektroskopi Magnetik Inti.....	10
2.4.2.1 Spektroskopi Magnetik Inti Proton (¹ H-NMR).....	10
2.4.2.2 Spektroskopi Magnetik Inti Karbon (¹³ C-NMR)...	11
2.4.3 Spektroskopi Massa	11
2.5 Antimikroba	11
2.5.1 Metode Uji Aktivitas Antimikroba	12
2.5.1.1 <i>Disk Diffusion Method</i> (Cara Difusi Cakram).....	12
2.5.1.2 <i>Agar Dilution Method</i> (Cara Pengenceran Agar)...	12

2.5.1.3 <i>Broth Dilution Method</i> (Cara Pengenceran Kaldu).....	13
2.5.2 Konsentrasi Hambat Minimum	13
2.5.3 Mikroba Uji	13
2.5.3.1 Bakteri Positif Pewarnaan Gram	13
2.5.3.2 Bakteri Negatif Pewarnaan Gram	15
2.5.3.3 Jamur Uji	16
BAB 3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	17
3.2 Bahan	17
3.2.1 Bahan Penelitian	17
3.2.2 Bahan Kimia	17
3.2.3 Mikroba Uji	17
3.2.4 Medium	18
3.3 Alat	18
3.4 Cara Kerja	18
3.4.1 Ekstraksi Rimpang Dringo (<i>Acorus calamus</i> Linn)	18
3.4.2 Isolasi Senyawa Kimia	19
3.4.3 Identifikasi Struktur Molekul Senyawa Kimia	20
3.4.4 Pengujian Aktivitas Antimikroba	20
3.4.4.1 Pengenceran Larutan Uji	20
3.4.4.2 Pembuatan Medium	21
3.4.4.3 Peremajaan Mikroba Uji	22
3.4.4.4 Identifikasi Mikroba Uji	22
3.4.4.5 Uji Aktivitas Antimikroba Cara Difusi Cakram	23
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
4.1 Ekstraksi Rimpang Dringo (<i>Acorus calamus</i> Linn).....	26
4.2 Isolasi Senyawa Kimia	26
4.3 Identifikasi Senyawa Kimia Hasil Isolasi.....	28
4.3.1 Analisis Spektrum Inframerah	28
4.3.2 Analisis Spektrum Resonansi Magnetik Proton	28
4.3.3 Analisis Spektrum Resonansi Magnetik Karbon	29
4.3.4 Analisis Spektrum Massa	29
4.4 Pengujian Aktivitas Antimikroba	30
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	35
DAFTAR ACUAN	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Tanaman dan Rimpang Dringo (<i>Acorus calamus</i> Linn).....	39
4.1. Ekstrak <i>n</i> -Heksana Rimpang Dringo	39
4.2. Kromatografi Kolom Ekstrak <i>n</i> -Heksana Rimpang Dringo	40
4.3. Pola KLT Fraksi Kromatografi Kolom di UV 254 nm	41
4.4. Penampakan Pita Kromatotron	42
4.5. Pola KLT Fraksi Kromatotron	42
4.6. KLT Dua Dimensi Fraksi Kromatotron	43
4.7. Isolat Murni	43
4.8. Spektrum Inframerah	44
4.9. Spektrum ¹ H-NMR Isolat Murni dengan Pelarut CDCl ₃	45
4.10. Spektrum ¹³ C-NMR Isolat Murni dengan Pelarut CDCl ₃	46
4.11. Spektrum Massa	47
4.12. Struktur <i>cis</i> -1,2,4-trimetoksi-5-(1-propenil)-benzen (β -asaron) ...	47
4.13. Pola Fragmentasi Spektrum Massa β -asaron	48
4.14a. Hasil Identifikasi Bakteri Gram Positif	49
4.14b. Hasil Identifikasi Bakteri Gram Negatif	50
4.14c. Hasil Identifikasi Jamur <i>Candida albicans</i>	51
4.15a. Hasil Uji Antimikroba Ekstrak <i>n</i> -Heksana terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	52
4.15b. Hasil Uji Antimikroba Ekstrak <i>n</i> -Heksana terhadap <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	52
4.15c. Hasil Uji Antimikroba Ekstrak <i>n</i> -Heksana terhadap <i>Salmonella typhosa</i> ATCC 14028	53
4.15d. Hasil Uji Antimikroba Ekstrak <i>n</i> -Heksana terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	53
4.15e. Hasil Uji Antimikroba Ekstrak <i>n</i> -Heksana terhadap <i>Streptococcus β haemolyticus grup A</i>	54
4.15f. Hasil Uji Antimikroba Ekstrak <i>n</i> -Heksana terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	54
4.15g. Hasil Uji Antimikroba Ekstrak <i>n</i> -Heksana terhadap <i>Candida albicans</i>	55
4.16a. Hasil Uji Antimikroba Isolat β asaron terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	56
4.16b. Hasil Uji Antimikroba Isolat β asaron terhadap <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	56
4.16c. Hasil Uji Antimikroba Isolat β asaron terhadap <i>Salmonella typhosa</i> ATCC 14028	57
4.16d. Hasil Uji Antimikroba Isolat β asaron terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	57
4.16e. Hasil Uji Antimikroba Isolat β asaron terhadap <i>Streptococcus β haemolyticus grup A</i>	58

4.16f. Hasil Uji Antimikroba Isolat β asaron terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	58
4.16g. Hasil Uji Antimikroba Isolat β asaron terhadap <i>Candida albicans</i> ..	59
4.17. Hasil Uji Antimikroba Ekstrak <i>n</i> -Heksana	60
4.18. Hasil Uji Antimikroba Isolat β -asaron	60

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Data Perbandingan Pergeseran Kimia (δ) $^1\text{H-NMR}$ β -asaron dari Jee Yeon Lee et al (2004) dan Isolat Murni dengan Pelarut CDCl_3	61
4.2. Data Perbandingan Pergeseran Kimia (δ) $^{13}\text{C-NMR}$ β -asaron dari Jee Yeon Lee et al (2004) dan Isolat Murni dengan Pelarut CDCl_3	61
4.3. Aktivitas Antimikroba Ekstrak <i>n</i> -Heksana Rimpang Dringo dengan Metode Difusi Cakram (hambatan dalam mm)	62
4.4. Aktivitas Antimikroba Isolat β -asaron Rimpang Dringo dengan Metode Difusi Cakram (hambatan dalam mm)	63

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Identifikasi Tanaman <i>Acorus calamus</i> Linn.....	64
2. Skema Kerja	65
3. Profil Kesamaan Spektrum Massa Dengan Data <i>Library</i>	66
4. Data <i>Library</i> Spektrum Massa	67
5. Bagan Pengenceran Larutan Uji Ekstrak <i>n</i> -Heksana	68
6. Bagan Pengenceran Larutan Uji Isolat β -asaron	69
7. Bagan Pengenceran Inokulum Mikroba Uji	70

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara tropis yang memiliki biodiversitas tinggi yang kaya akan flora dan fauna. Indonesia memiliki ribuan jenis tumbuhan, yang harus di lestarikan dan dimanfaatkan dengan baik. Sebagian besar tumbuhan tersebut dapat digunakan sebagai tanaman obat. Bentuk zat aktif berbagai obat modern saat ini, dahulunya berasal dari alam, contoh atropin, digitalis, dan antibiotik penisilin merupakan hasil alam, maka dapat diperkirakan bahwa obat dari alam yang digunakan secara tradisional mungkin saja mempunyai dasar kebenaran sehingga perlu pembuktian (Poeloengan et al, 2006).

Dringo (*Acorus calamus* Linn) adalah tanaman yang memiliki tinggi 55-80 cm yang tumbuh di daerah beriklim sedang (Materia Medika, 1978). Dringo telah digunakan di Asia sejak 2000 tahun silam dengan sejumlah kegunaan yang beragam. China menggunakan tanaman ini untuk mengurangi bengkak dan konstipasi. Di India, pengobatan Ayurveda menggunakan rimpangnya untuk mengobati demam, asma dan bronkhitis serta sedatif (Health, n.d). Dringo juga digunakan sebagai karminatif, spasmolitik dan diaforetik (Barnes, Anderson & Phillipson, 2007).

Spesies lain dari genus *Acorus* yang pernah diteliti yaitu *Acorus gramineus*. *A. gramineus* memiliki tinggi tanaman lebih rendah dan tumbuh menyamping dibandingkan *A. calamus*. Ekstrak metanol *A. gramineus* yang dipartisi dengan etil asetat memiliki senyawa dengan aktivitas antijamur berupa β -asaron (Jee Yeon Lee et al, 2004).

Penelitian terhadap kandungan kimia dan aktivitas biologi dari tanaman dringo (*Acorus calamus* Linn) telah dilakukan yaitu aktivitas antelmintik dari ekstrak etanol *A. calamus* yang tumbuh di Afrika Selatan (Mc Gaw, Jager, & van Staden, 2002), antifungi (Singh, Srivastava, & Choudhary, 2010), uji aktivitas antioksidan dengan metode *ferric thiocyanate* (FTC) yang dibandingkan dengan metode *thiobarbituric acid* (TBA) (Zahin, Aqil, & Ahmad, 2009), penghambatan

terhadap FeCl_3 yang menginduksi epileptogenesis pada tikus (Hazra, Ray, & Guha, 2007), antihepatotoksik dan antioksidan (Palani et al, 2009), dan antihiperlipidemia (Souza et al, 2007), antibakteri (Phongpaichit et al, 2005).

Dringo memiliki tiga macam spesies genetik yaitu tetraploid, triploid, dan diploid. Dringo tetraploid biasa tumbuh di kawasan Asia, triploid tumbuh di kawasan Eropa dan diploid tumbuh di kawasan Amerika Utara. Pada tetraploid, triploid dan diploid memiliki kandungan β -asaron masing-masing 96%, 5%, dan 0% (Barnes, Anderson & Phillipson, 2007). Spesies genetik (ploidi) dari *Acorus calamus* yang tumbuh di Indonesia belum ada referensi yang membahasnya, tetapi kecenderungan disamakan dengan *Acorus calamus* yang tumbuh di kawasan Asia, yakni tetraploid. Sampai saat ini belum ada penelitian tentang aktivitas biologi dari ekstrak *n*-heksana tanaman dringo.

Pada penelitian ini, dilakukan isolasi senyawa kimia dari ekstrak *n*-heksana rimpang dringo yang tumbuh di Indonesia dengan metode kromatografi kolom dan kromatografi sentrifugal serta pengujian aktivitas antimikroba terhadap senyawa murni yang telah diisolasi. Penentuan struktur molekul dilakukan dengan pengukuran spektroskopi, yaitu spektrofotometer inframerah (IR), resonansi magnetik inti proton ($^1\text{H-NMR}$), resonansi magnetik inti karbon ($^{13}\text{C-NMR}$), dan spektrometer massa (MS). Ekstrak *n*-heksana dan senyawa hasil isolasi diuji aktivitasnya terhadap mikroba dengan metode difusi cakram. Mikroba uji terdiri dari bakteri dan jamur, bakteri uji antara lain, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhosa* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Streptococcus β haemolyticus grup A* dan jamur uji yaitu *Candida albicans*.

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah kekayaan ilmu pengetahuan bagi peminat bahan alam dan manfaat bahan alam yang berkhasiat sebagai obat tradisional.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat murni dan mengidentifikasi struktur molekul isolat dari ekstrak *n*-heksana rimpang dringo (*Acorus calamus* Linn) serta mengetahui aktivitas antibakteri dan antijamur dari ekstrak *n*-heksana dan senyawa hasil isolasi tersebut.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Dringo

Tanaman dringo (*Acorus calamus*) merupakan tanaman rimpang yang berasal dari Asia dengan iklim sedang. Di Amerika tanaman ini dikenal dengan nama *Sweet Flag*. Tanaman ini tumbuh tersebar hampir di seluruh Indonesia (Gambar 2.1).

2.1.1 Klasifikasi

Berikut klasifikasi tanaman dringo:

Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Monocotyledoneae
Bangsa : Arales
Suku : Acoraceae
Marga : Acorus
Spesies : *Acorus calamus* Linn. (Barnes, Anderson & Phillipson, 2007; Padua, Bunyaphatsara & Lemmens, 1999; USDA, n.d)

2.1.2 Nama Lain

Jerenge, jeureunge (Aceh), jerango (Gayo), jerango (Batak-Karo), serango (Nias), jariango (Banjar), daring, jariango (Sunda), dlingo (Jawa), jharongo (Madura), jhariango (Kangean), areango (Bugis), kareango (Makasar), kalumunga, layambung, karim benga, karimenga, karumenga, koringa, kalumenga (Minahasa), deringo, jahangu, jangu (Bali), kaliraga (Flores), bila (Buru), ai wahu (Alifuru), dan daring (Ambon) (Materia Medika Indonesia vol.2, 1978; Vademekum Bahan Alam, 1989).

2.1.3 Morfologi

Tumbuhan dengan tinggi 55 cm sampai 80 cm, memiliki rimpang dengan garis tengah 7,5 mm sampai 15 mm. Daun berbentuk pita, tajam, agak lonjong ke ujung, panjang helai daun 80 cm, lebar 7 mm sampai 20 mm. Perbungaan berupa tongkol, berbentuk bukit memanjang pendek dan pada ujung tajam, panjang 3 cm sampai 4,5 cm dengan gagang bunga panjang 20 cm sampai 25 cm, daun mahkota bunga sempit, berbentuk bulat memanjang, tidak berambut, panjang 1 mm sampai 1,25 mm, tangkai sari panjang 2,74 mm, kepala sari 0,3 mm, putik tidak berambut, panjang 1,5 mm sampai 2,25 mm, lebar 2,25 mm sampai 4,75 mm, kepala putik rata, panjang 0,5 mm, bakal buah berjumlah 7 sampai 10 (Materia Medika Indonesia vol.2, 1978).

2.1.4 Ekologi dan Penyebaran

Tumbuhan ini berasal dari daerah Asia yang beriklim sedang termasuk daerah India dan mungkin disekitar Laut Hitam dan Kaspia, di tanah yang becek atau berawa. Tumbuh di India, Indonesia, Filipina dan Indocina. Di Indonesia terdapat pada beberapa pulau tertentu, tersebar dari tempat asal ke arah barat dan tenggara. Dringo dikenal sebagai tumbuhan rawa yang menyukai tanah berpasir. Di Jawa tumbuh disepanjang parit, kolam ikan, di telaga, di rawa pada ketinggian sampai 2.050 m di atas permukaan laut. Di Jawa kemungkinan tumbuhan berasal dari sisa tanamannya yang dibiarkan tumbuh secara liar (Materia Medika Indonesia vol.2, 1978). Daun dari tumbuhan ini memiliki toleransi jangka panjang terhadap ketiadaan oksigen (anoxia) yang biasanya dimiliki oleh spesies tanaman yang tumbuh di daerah kutub utara (Schlüter & Crawford, 2001).

2.1.5 Kandungan Kimia

Kandungan kimia rimpang dringo adalah minyak atsiri berupa sesquiterpen dan fenilpropan. Fenilpropan pada *Acorus calamus* diisolasi dari ekstrak kloroform (Raja, Vijayalakshmi, & Devalarao, 2009). Komponen utama

minyak atsiri berupa asaron, asarilaldehid, dan eugenol, selain itu zat pahit akorin, pati dan tannin (Materia Medika Indonesia vol.2, 1978). Dringo memiliki tiga macam spesies genetik yaitu tetraploid, triploid, dan diploid. Dringo tetraploid biasa tumbuh di kawasan Asia, triploid tumbuh di kawasan Eropa dan diploid tumbuh di kawasan Amerika Utara. Pada tetraploid, triploid dan diploid memiliki kandungan β -asaron masing-masing 96%, 5%, dan 0% (Barnes, Anderson & Phillipson, 2007). Akar dan rimpang dringo dilaporkan memiliki senyawa karyofilen, isoasaron, metil isoeugenol dan safrol (Devi S & Ganjewala, 2009).

2.1.6 Khasiat

Rimpang dringo sering digunakan untuk mengobati demam, mengurangi bengkak, konstipasi dan asma (A Sacred, n.d). Rimpang, akar dan minyak atsiri yang didestilasi dari tanaman dringo dilaporkan memiliki aktivitas biologis seperti antibakteri, antijamur, antelmintik dan insektisida (Mc Gaw, Jager, & van Staden, 2002; Devi S & Ganjewala, 2009). Rimpang dringo juga memiliki khasiat karminatif, spasmolitik dan diaforetik (Barnes, Anderson & Phillipson, 2007).

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut. Ekstraksi ini didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Tujuan dari ekstraksi adalah untuk menarik kandungan kimia yang terdapat dalam simplisia, sehingga metode ekstraksi yang digunakan akan tergantung pada jenis kandungan kimia yang ingin diperoleh. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, 2000).

2.3 Kromatografi

Kromatografi didefinisikan sebagai prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan didalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan adsorpsi, partisi, kelarutan, ukuran molekul atau kerapatan muatan ion (Farmakope Indonesia ed.4, 2000).

2.3.1 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan kromatografi cair dimana fase diam ditempatkan di dalam tabung kaca berbentuk silinder pada bagian bawah tertutup dengan katup atau keran dan fase gerak dibiarkan mengalir ke bawah karena adanya gaya berat (Gritter, Bobbit, & Schwarting, 1991).

2.3.1.1 Penyerap (fase diam)

Penyerap untuk kolom biasanya berukuran 63-250 μm . Sifat penyerap terutama bergantung pada pH dan tingkat keaktifannya. Penyerap yang biasa digunakan adalah silika gel, alumina, arang, selulosa, poliamida dan polistiren (Gritter, Bobbit, & Schwarting, 1991).

2.3.1.1 Pelarut Pengelusi (fase gerak)

Pemilihan pelarut pengelusi perlu dilakukan untuk mengetahui pelarut atau campuran pelarut mana yang dapat menghasilkan pemisahan yang diinginkan. Hal itu dapat dilakukan dengan tiga pendekatan, yaitu penelusuran pustaka, penerapan data KLT pada pemisahan dengan kolom dan pemakaian elusi landaian umum mulai dari pelarut yang tidak menggerakkan pelarut sampai pelarut yang lebih polar yang menggerakkan linarut (Gritter, Bobbit, & Schwarting, 1991).

2.3.1.2 Pembuatan Kolom

Pembuatan kolom ada 2 cara, yaitu:

a. Cara kering

Selapisan pasir diletakkan didalam kolom kemudian penyerap dimasukkan ke dalam tabung sedikit demi sedikit, permukaan diratakan dan dimampatkan sedikit. Setelah itu kertas saring diletakkan diatasnya dan ditambah lagi selapis pasir sehingga jika ditambahkan pelarut, permukaan penyerap tidak terganggu. Selanjutnya pelarut pengelusi dibiarkan mengalir ke bawah melalui penyerap dengan keran terbuka sampai permukaan pelarut tepat sedikit di atas bagian atas kolom (Gritter, Bobbit, & Schwarting, 1991).

b. Cara basah

Selapisan pasir silika dimasukkan kedalam kolom dan sepertiga tabung diisi dengan pelarut. Kemudian suspensi fase diam dimasukkan ke dalam pelarut di dalam tabung sedikit demi sedikit atau sekaligus sambil diketuk-ketuk pada semua sisi secara perlahan-lahan agar diperoleh lapisan yang seragam. Keran dapat dibuka atau ditutup selama penambahan asal permukaan pelarut tetap di atas permukaan penyerap (Gritter, Bobbit, & Schwarting, 1991).

2.3.2 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi (pembagian) atau gabungannya. Lempeng pemisah tipis yang terdiri dari butir penyerap dilapiskan pada lempeng kaca, logam dan lain-lain. Untuk mendapatkan kondisi jenuh bejana kromatografi, dinding bejana dilapisi dengan lembaran kertas saring, fase gerak dituang ke dalam bejana sehingga kertas saring basah dan dalam bejana terdapat

fase gerak setinggi 5-10 mm, bejana ditutup dan dibiarkan selama satu jam pada 20-25 °C (Harmita, 2006).

KLT sangat bermanfaat untuk analisis obat dan bahan lain dalam laboratorium karena hanya memerlukan peralatan sederhana, waktu cukup singkat dan jumlah zat yang diperiksa cukup kecil. Di samping itu tidak diperlukan ruang besar dan teknik pengerjaannya sederhana (Harmita, 2006).

2.3.3 Kromatotron

Proses isolasi menggunakan kromatotron berdasarkan adsorpsi dan partisi. Adsorpsi adalah senyawa kimia dapat terpisah-pisah disebabkan oleh daya serap adsorben terhadap tiap-tiap komponen kimia tidak sama. Sedangkan partisi adalah kelarutan tiap-tiap komponen kimia dalam cairan pengelusi (eluen) tidak sama dimana arah gerakan eluen disebabkan oleh gaya sentrifugal sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan kecepatan yang berbeda-beda yang menyebabkan terjadi pemisahan (Hostettmann, Hostettmann, & Marston, 1995).

Prinsip pengoperasian kromatotron yaitu sampel akan dipisahkan dengan larutan menggunakan suatu pelat yang memutar yang dilapisi dengan suatu lapisan tipis dari penyerap. Rotor terdapat dalam ruang yang tertutup dengan pelat kaca kuarsa. Penutup ini memungkinkan untuk mengamati bercak tanwarna tapi dapat menyerap sinar UV dengan memakai lampu UV. Elusi oleh bahan pelarut membentuk lingkaran pita dari komponen yang dipisahkan diputar pada 800 rpm mulai dari tepi rotor bersama-sama dengan bahan pelarut. Suatu sistem baru yang membawa eluat ke tabung keluaran tunggal. Fraksi eluat yang diperoleh dianalisis dengan KLT (Hostettmann, Hostettmann, & Marston, 1995).

Keuntungan penggunaan kromatotron antara lain, cara kerja sederhana, tidak perlu mengerok pita, pemakaian pelarut tidak boros, rotor yang sudah dilapisi dapat diregenerasi, penotolan cuplikan mudah, perolehan kembali senyawa yang dipisah lebih besar daripada KLT preparatif (Hostettmann, Hostettmann, & Marston, 1995).

2.4 Spektroskopi

Spektroskopi adalah ilmu yang mempelajari interaksi antara gelombang elektromagnetik dengan benda (Harmita, 2006). Metode spektroskopi berdasarkan pada penyerapan selektif dari radiasi elektromagnetik molekul organik (Williams & Fleming, 2002).

2.4.1 Spektroskopi Inframerah

Atom-atom di dalam suatu molekul tidak diam melainkan bervibrasi. Bila radiasi dilewatkan melalui suatu cuplikan, maka molekul-molekulnya dapat menyerap energi. Penyerapan energi pada berbagai frekuensi dapat dideteksi oleh spektrofotometer inframerah, yang memplot jumlah radiasi inframerah yang diteruskan melalui cuplikan sebagai fungsi frekuensi radiasi (Hendayana, 1994). Spektrofotometer inframerah merupakan salah satu metode analisis untuk mengetahui gugus fungsi apa saja yang terdapat dalam suatu molekul organik (Harmita, 2006).

2.4.2 Spektroskopi Magnetik Inti

Spektroskopi ini didasarkan pada pengukuran absorpsi radiasi elektromagnetik pada daerah frekuensi radio 4-600 MHz oleh partikel inti atom yang berputar di dalam medan magnet. Untuk menentukan struktur senyawa organik, cuplikan yang diperiksa harus murni. Tetra metil silane (TMS) dipakai sebagai standar pada spektroskopi ini karena mempunyai kerapatan elektron paling tinggi (Hendayana, 1994).

2.4.2.1 Spektroskopi Magnetik Inti Proton ($^1\text{H-NMR}$)

Pelarut yang dipakai untuk melarutkan cuplikan harus dipilih pelarut yang tak mempunyai proton. Spektroskopi ini paling banyak dipakai karena inti proton paling peka terhadap medan magnet dan paling melimpah di alam (Hendayana,

1994). Spektroskopi resonansi magnetik proton dapat menentukan banyaknya jenis lingkungan atom yang berbeda yang ada dalam molekul; berapa atom hidrogen pada masing-masing jenis lingkungan hidrogen, serta berapa banyaknya atom hidrogen yang ada pada atom karbon tetangga (Harmita, 2007).

2.4.2.2 Spektroskopi Magnetik Inti Karbon (^{13}C -NMR)

^{13}C -NMR memiliki daerah pergeseran kimia yang lebih besar dibandingkan dengan ^1H -NMR, sehingga waktu pengamatan ^{13}C -NMR 20 kali lebih lama dibandingkan ^1H -NMR (Harmita, 2007; Williams & Fleming, 2002). ^{13}C -NMR mempunyai keuntungan dibandingkan dengan ^1H -NMR dalam hal mendiagnosis bangun molekul senyawa organik, karena ^{13}C -NMR memberi informasi tentang “tulang punggung” (susunan atom C) molekul (Hendayana, 1994).

2.4.2.3 Spektroskopi Massa

Metode spektroskopi massa didasarkan pada perubahan komponen cuplikan menjadi ion-ion dan memisahkannya berdasarkan perbandingan massa terhadap muatan (m/e). Spektrum massa memberi informasi berat molekul yang berguna untuk mengidentifikasi rumus bangun molekul bersama spektrum IR dan NMR. Pada spektrum massa, berat molekul ditentukan pada puncak paling kanan (Hendayana, 1994).

2.5 Antimikroba

Antimikroba adalah suatu senyawa yang dapat membasmi mikroorganisme pada umumnya, khususnya pada mikroba yang patogen terhadap manusia (Ganiswara et al, 1995). Pada penelitian kali ini mikroorganisme yang digunakan adalah bakteri dan jamur.

Berdasarkan sifat toksisitas selektifnya, suatu antimikroba dapat digolongkan menjadi (Ganiswara et al, 1995):

- a. Bakteriostatik dan fungistatik, yaitu zat yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri atau jamur.
- b. Bakterisid dan fungisid, yaitu zat yang bersifat membunuh bakteri atau jamur.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok (Ganiswara et al, 1995):

- a. Antimikroba yang mengganggu metabolisme sel mikroba.
- b. Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel mikroba.
- c. Antimikroba yang mengganggu permeabilitas membran sel mikroba.
- d. Antimikroba yang menghambat sintesis protein mikroba.
- e. Antimikroba yang merusak asam nukleat sel mikroba.

2.5.1 Metode Uji Aktivitas Antimikroba

2.5.1.1 *Disk Diffusion Method* (Cara Difusi Cakram)

Biasa dikenal dengan metode zona inhibisi adalah metode yang sering dipakai untuk pengujian aktivitas antibakteri. Metode ini hanya membutuhkan jumlah zat uji yang kecil (10-30 μL). Prosedur dari metode ini berupa persiapan cawan petri yang berisi 15-25 mL agar, bakteri dengan konsentrasi 9×10^5 sel/mL disebar pada permukaan agar. Cakram kertas 6 mm berisi zat uji konsentrasi tertentu dan ditempatkan pada permukaan agar, cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Pengamatan dilakukan dengan mengamati adanya zona “jernih” (zona inhibisi) yang mengelilingi cakram kertas (Wilkinson, 2006).

2.5.1.2 *Agar Dilution Method* (Cara Pengenceran Agar)

Pada metode ini bahan uji dicampur dengan konsentrasi yang diinginkan dengan agar cair, kemudian bakteri ditanam pada permukaan agar. Cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Kesulitan dari metode ini adalah: penggunaan volume bahan uji yang lebih besar dari metode yang lain, mengacaukan aksi antibakteri dari zat yang mudah menguap, rumitnya

menghasilkan emulsi minyak esensial yang stabil dalam agar dan pembatasan konsentrasi maksimum yang dapat digunakan sebelum agar menjadi terlalu encer untuk memadat (Wilkinson, 2006).

2.5.1.3 *Broth Dilution Method* (Cara Pengenceran Kaldu)

Pada metode ini, suatu larutan zat uji diencerkan dalam media pertumbuhan kuman berupa kaldu. Pada uji disertakan kontrol kuman sebagai kontrol positif dan kontrol medium sebagai kontrol negatif. Pembacaan hasil yaitu tidak adanya pertumbuhan kuman ditandai dengan kejernihan yang setara dengan kontrol medium dan adanya pertumbuhan kuman ditandai dengan kekeruhan medium. Namun, metode ini sulit dilakukan jika jumlah bahan yang diuji sangat banyak (Wilkinson, 2006).

2.5.2 Konsentrasi Hambat Minimum

Konsentrasi hambat minimum adalah konsentrasi terendah dari suatu zat yang masih dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Tujuan penentuan konsentrasi hambat minimum adalah untuk mengetahui kadar minimal dari suatu zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Radji et al, 2006).

2.5.3 Mikroba Uji

2.5.3.1 Bakteri Positif Pewarnaan Gram

a. *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Bacillus subtilis adalah kuman batang berspora (endospora) yang bersifat aerobik Gram positif. Klasifikasi bakteri ini yaitu:

Famili : Bacillaceae
Genus : Bacillus
Spesies : *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis berupa batang kecil dengan ukuran 0,3-2,2 x 1,2-7,0 μm dan tumbuh secara aerob. Bakteri ini dapat menyebabkan meningitis, endokarditis, infeksi mata dan lain-lain (Syaruchrahman et al, 1993).

b. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Staphylococcus aureus adalah kuman berbentuk kokus tidak berspora Gram positif. Klasifikasi bakteri ini yaitu:

Famili : Micrococcaceae
 Genus : Staphylococcus
 Spesies : *Staphylococcus aureus*

Kuman ini berbentuk sferis dengan diameter 0,8-1,0 mikron. Bakteri ini tumbuh optimum pada suhu 35°C dan pH 7,4. Infeksi oleh kuman ini sering menimbulkan penyakit pada manusia. Setiap jaringan atau alat tubuh dapat diinfeksi olehnya dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu peradangan, nekrosis, dan pembentukan abses. Umumnya kuman ini menimbulkan penyakit yang bersifat sporadik bukan epidemik (Syaruchrahman et al, 1993).

c. *Streptococcus β haemolyticus* grup A

Streptococcus β haemolyticus adalah kuman berbentuk kokus Gram positif. Klasifikasi bakteri ini yaitu:

Famili : Streptococaceae
 Genus : Streptococcus
 Spesies : *Streptococcus β haemolyticus*

Suhu pertumbuhan optimum adalah 37°C dengan pH 7,4-7,6. Berupa bakteri yang sering membentuk rantai panjang yang terdiri dari 8 kokus atau lebih dan dapat menimbulkan hemolisis tipe β . Dalam agar darah yang diinkubasi 37°C setelah 18-24 jam akan membentuk koloni kecil keabu-abuan, berbentuk bulat, pada permukaan medium koloni tampak seperti setitik cairan (Syaruchrahman et al, 1993).

2.5.3.2 Bakteri Negatif Pewarnaan Gram

a. *Escherichia coli* ATCC 25922

Escherichia coli adalah kuman berbentuk batang pendek (kokobasil) Gram negatif. Klasifikasi bakteri ini yaitu:

Famili : Enterobacteriaceae

Genus : Escherichiae

Spesies : *Escherichia coli*

Escherichia coli berukuran 0,4-0,7 μm x 1-4 μm . Merupakan kuman oportunistik yang banyak ditemukan di dalam usus manusia sebagai flora normal. Kuman ini dapat menyebabkan infeksi primer pada usus misalnya diare pada anak dan *travelers diarrhea*, juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain di luar usus (Syaruchrahman et al, 1993).

b. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Pseudomonas aeruginosa adalah kuman berbentuk batang Gram negatif.

Klasifikasi bakteri ini yaitu:

Famili : Pseudomonadaceae

Genus : Pseudomonas

Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa berukuran 0,5-1,0 x 3-4 μm . Suhu pertumbuhan optimum adalah 35°C, tetapi dapat juga tumbuh pada suhu 41°C. *P. aeruginosa* adalah satu-satunya spesies yang menghasilkan piosianin yaitu suatu pigmen warna hijau yang larut dalam kloroform dan fluoresen yaitu suatu pigmen yang larut dalam air. Kuman ini merupakan penyebab 10-20% infeksi nosokomial. Sering diisolasi dari penderita dengan neoplastik, luka dan luka bakar yang berat. Kuman ini juga dapat menyebabkan infeksi pada saluran pernapasan bagian bawah, saluran kemih, mata dan lain-lain (Syaruchrahman et al, 1993).

c. *Salmonella typhosa* ATCC 14028

Salmonella typhosa adalah kuman berbentuk batang tidak berspora Gram negatif. Klasifikasi bakteri ini yaitu:

Famili : Enterobacteriaceae
 Genus : Salmonella
 Spesies : *Salmonella typhosa*

Salmonella typhosa berukuran 1-3,5 μm x 0,5-0,8 μm dan mempunyai flagel peritrikh. Kuman ini tumbuh pada suasana aerob dan anaerob fakultatif pada suhu 15-41 °C dan pH pertumbuhan 6-8. Kuman ini menghasilkan sedikit gas H₂S. Salmonellosis adalah istilah yang menunjukkan adanya infeksi oleh kuman Salmonella. Kuman ini dapat menyebabkan gastroenteritis, demam tifoid, bakteremia dan septikemia (Syaruchrahman et al, 1993).

2.5.3.3 Jamur Uji

a. *Candida albicans*

Candida albicans merupakan jamur yang banyak menghasilkan pseudomiselium, klamidospora dan terkadang terbentuk pula miselium sejati. Klamidosporanya besar, berdinding tebal dan bulat. Koloni yang terbentuk licin seperti pasta dan berbau khamir. Jamur ini menyebabkan infeksi di selaput lendir saluran pencernaan, sariawan, endokarditis, moniliasis paru-paru dan vaginitis (Pelczar, 1986).

Famili : Saccharomycetaceae
 Genus : Candida
 Spesies : *Candida albicans*

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Pusat Penelitian Kimia LIPI Komplek Puspiptek Serpong dan Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI selama bulan Februari hingga Mei 2010.

3.2 Bahan

3.2.1 Bahan Penelitian

Rimpang dringo (*Acorus calamus* Linn) (Gambar 3.1) diperoleh dari Perkebunan Herbal Solo.

3.2.2 Bahan Kimia

n-Heksana, Etil asetat, Silika Gel 60 F, Aquadest steril, Larutan DMSO, NaCl fisiologis steril, Etanol 96%, Etanol 70%, Larutan Karbol Kristal Ungu, Larutan Lugol, Larutan fukhsin, *Lactofenol Cotton Blue* (LFCB).

3.2.3 Mikroba Uji

Bacillus subtilis ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhosa* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus β haemolyticus grup A*, dan *Candida albicans*. Mikroba uji didapat dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI.

3.2.4 Medium

Medium pertumbuhan bakteri yaitu *Nutrient Agar* (Difco), *Mueller Hinton Agar* (Oxoid) dan *Blood Agar* (Oxoid). Medium pertumbuhan jamur adalah *Potato Dextrose Agar* (Difco).

3.3 Alat

Rotary evaporator (Buchi R-215), *Laminair Air Flow* (ESCO), Erlenmeyer (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), inkubator (Mettler), autoklaf (Hirayama-Japan), timbangan analitik (Acculab), api bunsen, *vortex mixer* (Barnstead), mikroskop cahaya (Euromex-Holland), *hot plate* (Corning), cakram kertas (Schleicher&Schuell- German), *micropipet* (Socorex), mat pipet (pyrex), *Pipeting aid* (Gilson), oven (Mettler), cawan petri, kromatotron, kromatografi kolom, Peralatan KLT, Spektrofotometer IR (FTIR Shimadzu Prestige 21), Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (Jeol JNM-ECA 500 MHz), Spektrofotometer Massa (Agilent 73).

3.4 Cara Kerja

Isolasi dan identifikasi struktur molekul serta uji antimikroba senyawa kimia dari ekstrak *n*-heksana rimpang dringo (*Acorus calamus* Linn.) dilakukan melalui tahapan penelitian meliputi, ekstraksi rimpang dringo, isolasi senyawa kimia, identifikasi struktur molekul senyawa kimia hasil isolasi dan pengujian aktivitas antimikroba.

3.4.1 Ekstraksi Rimpang Dringo (*Acorus calamus* Linn.)

Rimpang dringo didapat dari Perkebunan Herbal Solo. Rimpang dringo berwarna coklat keabu-abuan dengan banyak serabut halus. Rimpang tersebut dikeringkan dan dihaluskan dengan penggiling simplisia selama 10 detik hingga menjadi serbuk, kemudian serbuk disaring dengan ayakan B₄₀.

Ekstraksi rimpang dringo dilakukan dengan cara maserasi dengan menggunakan *n*-heksana. Ekstraksi dilakukan pada 670 g serbuk rimpang dringo dengan pelarut berupa *n*-heksana sebanyak 3 liter. Maserasi dilakukan selama 24 jam dengan pengocokan beberapa kali. Maserasi diulang sebanyak 3 kali. Hasil maserasi disaring dengan kertas saring dan filtratnya dipisahkan. Selanjutnya filtrat dipekatkan dengan menggunakan penguap putar vakum. Filtrat yang dipekatkan ditimbang dan selanjutnya disebut ekstrak *n*-heksana. Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{ekstrak pekat yang didapat (gram)}}{\text{serbuk yang diekstraksi (gram)}} \times 100\%$$

3.4.2 Isolasi Senyawa Kimia

Isolasi senyawa kimia dari ekstrak *n*-heksana dimulai dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Dari hasil pengamatan KLT tersebut didapat pelarut yang digunakan pada kromatografi kolom. Sebagai penampak bercak digunakan asam sulfat pekat 10% dalam metanol dan dipanaskan di atas plat panas.

Kemudian ekstrak *n*-heksana difraksinasi dengan kromatografi kolom dengan fase diam berupa silika gel dan pemilihan fase gerak didasarkan pada orientasi yang telah dilakukan sebelumnya menggunakan KLT. Kolom dibuat dengan cara basah. Tabung diisi setengahnya dengan silika gel lalu silika gel dikeluarkan dan ditimbang. Sepertiga tinggi silika gel yang dimasukkan tadi diisi dengan pelarut, sumbat bagian bawah kolom dengan kapas agar silika gel tidak mencemari tampungan fraksi. Silika gel dibuat lumpuran dengan bagian lain dari pelarut dan lumpuran ini dituangkan ke dalam pelarut di dalam tabung. Selama proses pengendapan, tabung digetarkan dengan penggetar khusus kolom pada semua sisi secara memutar agar diperoleh kerapatan kolom yang seragam. Ekstrak yang akan dipisahkan tersebut diletakkan di atas permukaan silika gel secara merata dan di atas ekstrak tersebut diletakkan kapas. Setelah itu eluen dialirkan dan fraksi-fraksi yang diperoleh ditampung. Pada semua fraksi yang diperoleh dilakukan KLT dan fraksi-fraksi yang memiliki pola kromatogram yang sama

disatukan sehingga diperoleh fraksi yang lebih sedikit kemudian dilakukan pemurnian dengan kromatotron.

Pemurnian menggunakan kromatotron dimulai dengan mengaktifkan lempeng kromatotron yang berupa silika gel dengan menempatkan lempeng dalam oven dengan suhu 50°C selama 30 menit. Sebelum dilakukan pengelusan pada sampel, lempeng harus dielusi terlebih dahulu dengan eluen berupa *n*-heksana hingga tetesan pertama keluar. Setelah tetesan pertama keluar, tutup kran eluen dan tunggu selama 15 menit sebelum sampel dimasukkan. Sampel fraksi yang digunakan maksimal 750 mg. Sampel dilarutkan dalam aseton, biarkan lempeng silika kering. Setelah lempeng kering, sampel dimasukkan secara hati-hati. Kemudian kran eluen dibuka dan pengelusan dengan *n*-heksana dimulai. Tampung cairan yang keluar sesuai dengan bercak yang tampak dengan bantuan UV manual. Hasil tampungan diuapkan dengan penguap putar vakum dan dilakukan identifikasi KLT. Fraksi kromatotron dengan bercak sama disatukan. Fraksi kromatotron yang memiliki bercak tunggal dilakukan pengidentifikasian spektroskopi.

3.4.3 Identifikasi Struktur Molekul Senyawa Kimia

Senyawa hasil isolasi diidentifikasi dengan menggunakan alat spektroskopi meliputi spektroskopi inframerah, resonansi magnetik inti proton, resonansi magnetik inti karbon dan massa.

3.4.4 Pengujian Aktivitas Antimikroba

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan pada ekstrak *n*-heksana dan senyawa hasil isolasi terhadap mikroba uji.

3.4.4.1 Pengenceran Larutan Uji

Untuk pengenceran ekstrak *n*-heksana, dilakukan penimbangan 500 mg ekstrak *n*-heksana dalam labu ukur 1,0 mL dan ditambahkan DMSO sampai tanda

batas, diperoleh konsentrasi larutan uji adalah 500 mg/mL. Larutan tersebut kemudian dilakukan penyaringan dengan penyaring bakteri, hasil saringan ditempatkan dalam tabung reaksi steril. Siapkan 5 tabung reaksi steril, masukkan masing-masing 0,5 mL DMSO. Pipet 0,5 mL larutan 500 mg/mL, masukkan dalam tabung reaksi steril yang berisi 0,5 mL DMSO kemudian divortex, didapat larutan dengan konsentrasi 250 mg/mL. Lakukan pengenceran kelipatan dua hingga didapat konsentrasi 15,125 mg/mL.

Untuk pengenceran senyawa hasil isolasi dilakukan penimbangan 100 mg isolat dalam labu ukur 1,0 mL dan ditambahkan DMSO hingga tanda batas, didapat konsentrasi larutan uji adalah 100 mg/mL. Larutan tersebut kemudian dilakukan penyaringan dengan penyaring bakteri, hasil saringan ditempatkan dalam tabung reaksi steril. Siapkan 5 tabung reaksi steril, masukkan masing-masing 0,5 mL DMSO. Pipet 0,5 mL larutan 100 mg/mL, masukkan dalam tabung reaksi steril yang berisi 0,5 mL DMSO kemudian divortex, didapat larutan dengan konsentrasi 50 mg/mL. Lakukan pengenceran kelipatan dua hingga didapat konsentrasi 3,125 mg/mL.

3.4.4.2 Pembuatan Medium

a. *Nutrient Agar* (NA)

Bubuk NA sebanyak 23 g dilarutkan dalam 1 L aquades. Bahan diaduk hingga homogen dan dididihkan selama 1 menit agar serbuk larut sempurna. Medium lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium yang telah steril didiamkan hingga suhu mencapai $\pm 45^{\circ}\text{C}$.

b. *Blood Agar* (BA)

Bubuk BA *base* sebanyak 40 g dilarutkan dalam 1 L aquades. Campur hingga homogen dan panaskan secara hati-hati, kemudian dididihkan selama 1 menit. Medium lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15

menit. Dinginkan hingga 45-50°C dan tambahkan 5% darah domba steril, homogenkan.

c. *Mueller Hinton Agar (MHA)*

Bubuk MHA sebanyak 38 g dilarutkan dalam 1 L aquades. Bahan diaduk hingga homogen dan dididihkan selama 1 menit agar serbuk larut sempurna. Medium lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium yang telah steril didiamkan hingga suhu mencapai $\pm 45^{\circ}\text{C}$.

d. *Potato Dextrose Agar (PDA)*

Bubuk PDA sebanyak 39 g dilarutkan dalam 1 L aquades. Bahan diaduk hingga homogen dan dididihkan selama 1 menit agar serbuk larut sempurna. Medium lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium yang telah steril didiamkan hingga suhu mencapai $\pm 45^{\circ}\text{C}$.

3.4.4.3 Peremajaan Mikroba Uji

Peremajaan pada bakteri dilakukan dengan cara menuangkan medium pada tabung reaksi, letakkan miring 30° menggunakan rak tabung miring, kemudian biarkan medium mengering. Kemudian ambil 1 ose bakteri dari biakan kultur, gores agar miring. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Peremajaan pada jamur *Candida albicans* dilakukan dengan cara yang sama seperti bakteri tetapi medium yang dipakai adalah PDA dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu ruangan.

3.4.4.4 Identifikasi Mikroba Uji

Identifikasi bakteri uji dengan pewarnaan Gram. Preparat olesan bakteri disiapkan dengan meneteskan satu tetes NaCl fisiologis steril diatas kaca objek kemudian bakteri berumur 24 jam diambil dengan ose bulat steril dan

disuspensikan dalam NaCl fisiologis steril. Kaca objek dipanaskan diatas api agar bakteri melekat. Karbol kristal ungu ditetaskan dan dibiarkan selama 5 menit. Setelah 5 menit, preparat dicuci dengan air. Lalu cairan Lugol ditetaskan dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian preparat dicuci dengan air. Preparat kemudian dicelupkan ke dalam *chamber* berisi etanol 96% dan digoyang-goyangkan hingga zat warna bersih lalu dicuci dengan air. Preparat kemudian ditetesi dengan air fukhsin, dibiarkan selama 1-2 menit, lalu dicuci dengan air dan dikeringkan. Teteskan minyak imersi pada preparat sebelum diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x (Radji et al, 2006).

Identifikasi jamur uji dilakukan dengan mengamati pertumbuhan dan morfologi koloni. Kaca objek dan kaca penutup dibersihkan dengan alkohol 70%. Satu tetes *lactofenol cotton blue* (LFCB) ditetaskan di atas kaca objek, sedikit miselium yang sudah bersporulasi diletakkan di atas LFCB dan diurai secara hati-hati dengan ose tajam. Kaca penutup diletakkan hati-hati diatas preparat lalu kelebihan LFCB diserap dengan kertas saring. Preparat diperiksa menggunakan mikroskop (Gandjar, 2000).

3.4.4.5 Uji Aktivitas Antimikroba Cara Difusi Cakram

a. Pembuatan *Base Layer*

Untuk bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Esherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhosa* ATCC 14028 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tuangkan 15 mL NA hangat ke dalam cawan petri steril, ratakan agar dengan cara memutar cawan, biarkan membeku. Untuk *Streptococcus β haemolyticus grup A* tuangkan 15 mL BA hangat ke dalam cawan petri steril, ratakan agar dengan cara memutar cawan, biarkan membeku.

Untuk jamur *Candida albicans* tuangkan 15 mL PDA hangat ke dalam cawan petri steril, ratakan agar dengan cara memutar cawan kemudian biarkan agar membeku.

b. Pembuatan Inokulum Mikroba

Bakteri berumur 24 jam dari peremajaan agar miring diambil dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 2 mL larutan NaCl fisiologis steril hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan Mc Farland III (9×10^8 kuman/mL). Lakukan pengenceran hingga diperoleh konsentrasi 9×10^5 kuman/mL (Radji et al, 2006).

Jamur berumur 72 jam dari peremajaan agar miring diambil dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 2,0 mL larutan NaCl fisiologis steril hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan Mc Farland III (9×10^8 kuman/mL). Lakukan pengenceran hingga diperoleh konsentrasi 9×10^4 kuman/mL (Gandjar, 2000).

c. Pembuatan *Seed Layer*

Campur hangat-hangat 4,0 mL MHA cair dan 1 mL inokulum bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhosa* ATCC 14028 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan konsentrasi 9×10^5 kuman/mL, kemudian dihomogenkan dengan *vortex*. Untuk bakteri *Streptococcus β haemolyticus grup A* campurkan hangat-hangat 4,0 mL BA cair dan 1 mL inokulum bakteri dengan konsentrasi 9×10^5 kuman/mL, kemudian dihomogenkan dengan *vortex*. Tuangkan ke atas *base layer* berupa NA dan BA dan ratakan agar dengan cara memutar cawan kemudian biarkan agar membeku.

Campur hangat-hangat 4,0 mL PDA cair dan 1,0 mL inokulum jamur dengan konsentrasi 9×10^4 kuman/mL, kemudian dihomogenkan dengan *vortex*. Tuangkan ke atas *base layer* berupa PDA dan ratakan dengan cara memutar cawan.

d. Uji Aktivitas Antimikroba

Pada cakram kertas steril berdiameter 6 mm dimasukkan 20 μL zat uji berupa ekstrak *n*-heksana dan senyawa hasil isolasi sesuai konsentrasi yang ditentukan. Dengan memasukkan larutan uji sebanyak 20 μL , konsentrasi ekstrak *n*-heksana dalam cakram menjadi 0,3125 mg hingga 10 mg, sedangkan konsentrasi hasil isolasi dalam cakram menjadi 0,0625 mg hingga 2 mg. Tempatkan cakram yang telah berisi zat uji di atas *seed layer* yang telah membeku. Digunakan kontrol positif berupa Amoxicillin 25 μg untuk pengujian antibakteri dan Nistatin 2.000 IU untuk pengujian antijamur. Hasil dapat dilihat setelah mikroba diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C untuk bakteri dan selama 72 jam pada suhu ruangan untuk jamur. Adanya aktivitas antibakteri ditandai dengan adanya zona jernih di sekitar cakram. Pengukuran zona jernih dilakukan di atas alas berwarna hitam menggunakan jangka sorong.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Rimpang Dringo (*Acorus calamus* Linn.)

Digunakan *n*-heksana yang bersifat non polar sebagai pelarut pada proses maserasi karena tujuan dari ekstraksi adalah untuk menarik kandungan kimia yang terdapat dalam simplisia sehingga, pelarut yang digunakan akan tergantung pada jenis kandungan kimia yang ingin diperoleh, dalam penelitian kali ini senyawa yang ingin diisolasi adalah senyawa non polar dari tanaman dringo. Penghalusan bahan dimaksudkan agar proses ekstraksi dapat berlangsung baik. Bentuk simplisia yang lebih kecil akan memperluas permukaan sehingga pelarut *n*-heksana lebih mudah masuk ke dalam sel-sel rimpang untuk menarik komponen-komponen kimia didalamnya. Ekstrak *n*-heksana yang didapatkan berupa cairan berwarna kuning kecoklatan (Gambar 4.1). Maserasi diulang sebanyak dua kali. Hasil maserasi kedua dan ketiga ternyata memiliki warna yang lebih muda daripada warna hasil maserasi awal. Hal ini dikarenakan jumlah dari komponen kimia yang ditarik sudah mengalami pengurangan. Berat ekstrak yang didapatkan dari 670 g simplisia adalah 35 g. Sehingga rendemen yang dihasilkan adalah 5,22%.

4.2 Isolasi Senyawa Kimia

Isolasi senyawa dimulai dengan menggunakan kromatografi kolom. Digunakan fase diam berupa silika gel dan fase gerak berupa gradien pelarut *n*-heksana-etil asetat. Silika gel digunakan sebagai fase diam karena merupakan fase diam yang paling sering dipakai dan pemisahannya dapat diatur dengan penggunaan pelarut pengelusi berdasarkan jenis senyawa yang ingin dielusi. Pelarut yang digunakan adalah *n*-heksana dan etil asetat secara gradien dengan peningkatan polaritas. Kolom yang digunakan memiliki diameter kolom 4 cm dan tinggi 35 cm (Gambar 4.2). Digunakan kolom lambat agar pemisahan yang terjadi lebih sempurna. Silika gel yang dipakai sebagai fase diam dituang hingga

setengah kolom kemudian ditimbang. Silika gel yang dipakai sebanyak 675 g. Jumlah ekstrak *n*-heksana yang difraksinasi dengan kromatografi kolom adalah 23 g. Fraksi yang menetes masing-masing ditampung dalam botol kaca sebanyak 100 mL. Fraksi-fraksi tersebut kemudian diuapkan dengan penguap putar vakum untuk menghilangkan pelarutnya. Dari setiap fraksi yang ditampung, dilakukan pengujian KLT untuk melihat komposisi senyawanya dengan pelarut *n*-heksana-etil asetat 5%.

Dari hasil gabungan berdasarkan kesamaan bercak pada KLT, diperoleh fraksi-fraksi:

Fraksi 6-8 (A)

Fraksi 9-10 (B)

Fraksi 11-20 (C)

Fraksi 21-30 (D)

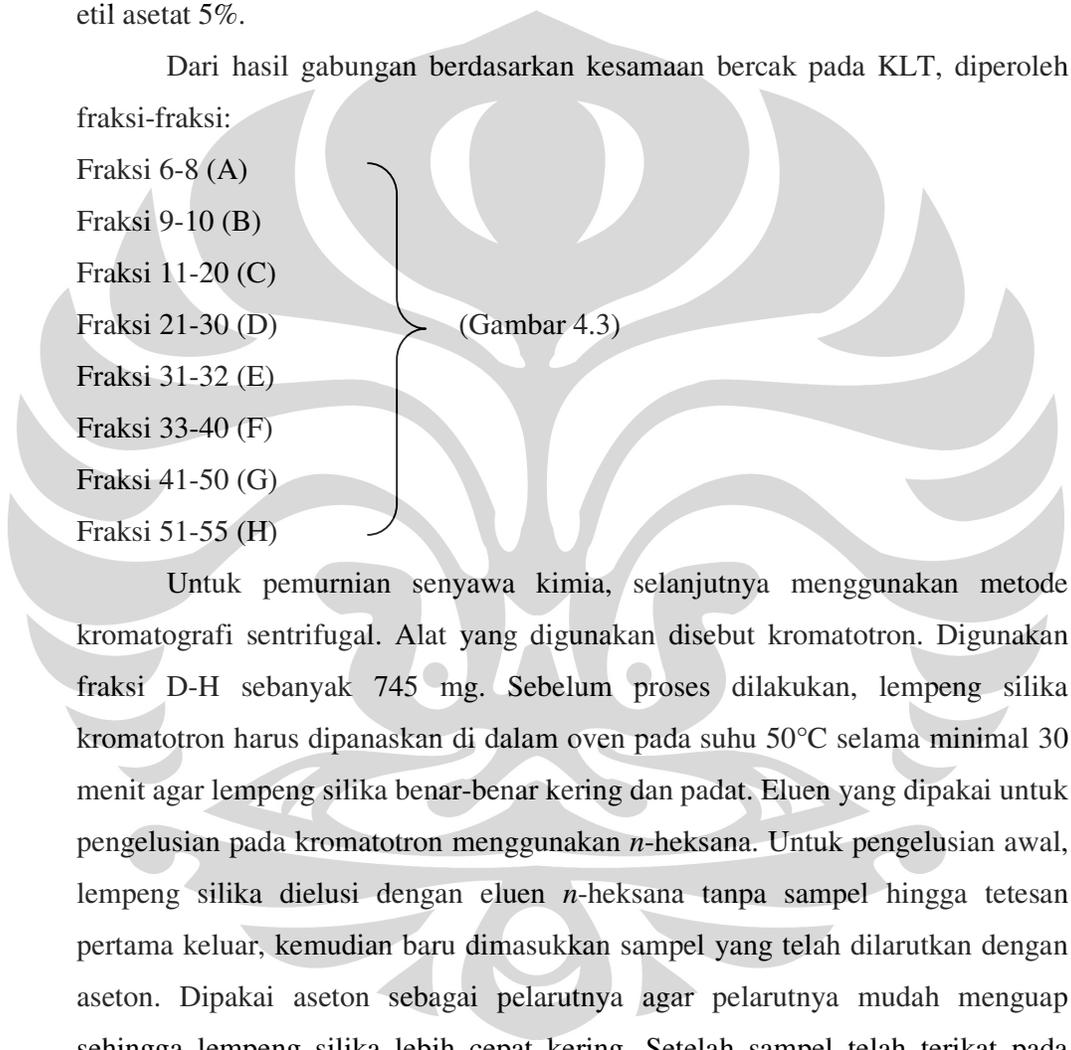
Fraksi 31-32 (E)

Fraksi 33-40 (F)

Fraksi 41-50 (G)

Fraksi 51-55 (H)

(Gambar 4.3)



Untuk pemurnian senyawa kimia, selanjutnya menggunakan metode kromatografi sentrifugal. Alat yang digunakan disebut kromatotron. Digunakan fraksi D-H sebanyak 745 mg. Sebelum proses dilakukan, lempeng silika kromatotron harus dipanaskan di dalam oven pada suhu 50°C selama minimal 30 menit agar lempeng silika benar-benar kering dan padat. Eluen yang dipakai untuk pengelusian pada kromatotron menggunakan *n*-heksana. Untuk pengelusian awal, lempeng silika dielusikan dengan eluen *n*-heksana tanpa sampel hingga tetesan pertama keluar, kemudian baru dimasukkan sampel yang telah dilarutkan dengan aseton. Dipakai aseton sebagai pelarutnya agar pelarutnya mudah menguap sehingga lempeng silika lebih cepat kering. Setelah sampel telah terikat pada lempeng silika dan lempeng kering, kran eluen dibuka kembali dan pengelusian dimulai. Cairan yang keluar ditampung sesuai bercak yang berbentuk pita melingkar (Gambar 4.4). Terbentuknya pita melingkar terjadi karena kromatotron memiliki cara kerja berdasarkan adsorpsi dan partisi. Adsorpsi yaitu pemisahan yang disebabkan oleh daya serap adsorben yang berbeda dari komponen kimia.

Partisi yaitu dengan penerapan gaya sentrifugal pada kromatotron, menyebabkan arah gerak eluen dengan komponen kimia yang terlarut di dalamnya bergerak dengan kecepatan yang berbeda-beda sehingga terjadi pemisahan (Hostettmann, Hostettmann, & Marston, 1995). Pita yang terbentuk dilihat secara kontinyu dengan menggunakan sinar UV 254 nm. Fraksi-fraksi hasil pemisahan dengan kromatotron didapat sebanyak 61 fraksi. Fraksi murni dengan pengujian KLT yang menghasilkan bercak tunggal (Gambar 4.5). Pembuktian bercak tunggal juga dilakukan dengan KLT dua dimensi dengan eluen 1 adalah *n*-heksana-etil asetat 10%, dan eluen 2 adalah *n*-heksana-aseton 10% (Gambar 4.6). Pelarut pada isolat murni diuapkan dengan penguap putar vakum dan didapatkan isolat murni berupa minyak berwarna kuning sebanyak 410 mg (Gambar 4.7).

4.3 Identifikasi Senyawa Kimia Hasil Isolasi

4.3.1 Analisis Spektrum Inframerah

Analisis senyawa isolasi dengan spektrofotometer inframerah (Gambar 4.8), menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang (ν cm^{-1}) 2933, 2850 dan 2831 cm^{-1} menunjukkan vibrasi ulur dari ikatan C-H jenuh. Pita serapan pada 858 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C=C (*cis*). Pita serapan pada 1606 dan 1465 cm^{-1} merupakan vibrasi dari C=C dengan adanya sistem cincin aromatis yang terlihat pada pita serapan 1510 cm^{-1} . Pita serapan pada 1035 dan 1211 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-O.

4.3.2 Analisis Spektrum Resonansi Magnetik Proton

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa hasil isolasi dengan pelarut berupa CDCl_3 (Gambar 4.9) memperlihatkan sinyal δ pada 1,84 ppm (dd) ($J = 7,3$ dan $1,83$ Hz), menunjukkan adanya gugus metil ($-\text{CH}_3$) yang bertetangga dengan dua proton yang berbeda, terjadinya puncak *doublet* karena adanya *coupling* dengan proton tetangga ($n+1$). Adanya sinyal-sinyal berbentuk singlet pada 3,80; 3,83 dan 3,89 ppm menunjukkan adanya 3 gugus metoksi ($-\text{OCH}_3$). Sinyal pada 5,77 ppm (dq)

($J= 11,65$ dan $7,3$ Hz) dan $6,48$ ppm (dd) ($J= 11,65$ dan $1,83$ Hz) terjadi puncak *doublet* dan *quintet* karena adanya *coupling* dengan proton tetangga berupa metin (CH) dan metil (CH₃). Sinyal pada $6,53$ ppm (s) dan $6,83$ ppm (s) menunjukkan adanya 2 proton pada cincin benzen (Tabel 4.1).

4.3.3 Analisis Spektrum Resonansi Magnetik Karbon

Spektrum ¹³C-NMR senyawa hasil isolasi dengan pelarut berupa CDCl₃ (Gambar 4.10) memperlihatkan sinyal δ pada $151,65$ ppm (C-4), $148,68$ ppm (C-2) dan $142,51$ ppm (C-1) menunjukkan adanya karbon kuartener yang mengikat –O-CH₃, sedangkan sinyal δ pada $125,99$ ppm (C-1') dan $124,94$ ppm (C-2') menunjukkan karbon metin, kemudian sinyal δ pada $118,17$ ppm (C-5), $114,22$ ppm (C-6), $97,64$ ppm (C-3) menunjukkan adanya karbon kuartener. Sinyal pada $56,77$, $56,60$ dan $56,24$ ppm menunjukkan adanya 3 gugus metoksi. Gugus metil ditunjukkan dengan adanya sinyal pada $14,84$ ppm (C-3') (Tabel 4.2).

4.3.4 Analisis Spektrum Massa

Spektrum massa senyawa hasil isolasi (Gambar 4.11) memperlihatkan adanya puncak ion molekular pada $m/e = 280$ (M⁺) yang menunjukkan bahwa senyawa isolasi mempunyai rumus molekul C₁₂H₁₆O₃. Dengan fragmentasi yaitu pada m/e 53, 69, 80, 91, 105, 119, 137, 150, 165, 177, 193 dan 280. Dari data tersebut. Hasil spektroskopi massa dibandingkan dengan data pada *library* pada alat pengolah data spektroskopi massa (Lampiran 3 dan Lampiran 4).

Berdasarkan data-data pengukuran spektroskopi dan dibandingkan dengan data spektrum NMR β -asaron (Jee Yeon Lee, 2004), senyawa hasil isolasi memiliki rumus molekul C₁₂H₁₆O₃ dengan rumus kimia *cis*-1,2,4-trimetoksi-5-(1-propenil)-benzen yang identik dengan β -asaron (Gambar 4.12). Pola fragmentasi massa senyawa β -asaron diperlihatkan pada Gambar 4.13. Senyawa β -asaron sudah pernah diisolasi oleh peneliti lain dari ekstrak etil asetat daun dan rimpang *Acorus calamus* yang tumbuh di India (Devi S & Ganjewala, 2009), ekstrak etanol

daun dan rimpang *Acorus calamus* yang tumbuh di Afrika Selatan (Mc Gaw, Jager, & van Staden, 2002), dan dari ekstrak metanol rimpang *Acorus gramineus* yang tumbuh di Korea (Jee Yeon Lee, 2004).

4.4 Pengujian Aktivitas Antimikroba

Sebelum dilakukan pengujian aktivitas antimikroba, pada mikroba uji dilakukan identifikasi terlebih dahulu untuk menghindari kontaminasi. Identifikasi terhadap bakteri dilakukan dengan pewarnaan Gram dan identifikasi terhadap jamur dilakukan dengan LFCB (*Lactofenol cotton blue*). Pada identifikasi bakteri, larutan karbol kristal ungu akan diadsorbsi ke dalam dinding sel bakteri, dengan penambahan larutan lugol akan terbentuk kompleks yang mewarnai dinding sel bakteri. Pembilasan dengan etanol 96% akan meluruhkan warna ungu pada bakteri Gram negatif. Sedangkan pada bakteri Gram positif kompleks karbol Kristal ungu dan lugol akan memberikan warna ungu. Air fukhsin (Safranin) akan mewarnai dinding sel bakteri Gram negatif.

Perbedaan tersebut karena bakteri Gram positif memiliki dinding sel dengan jumlah peptidoglikan yang besar. Peptidoglikan inilah yang dapat mengikat kompleks karbol kristal violet-lugol dengan kuat. Sementara pada dinding sel bakteri Gram negatif komposisi dinding selnya hanya memiliki sedikit peptidoglikan yang terletak pada *periplasmic gel* diantara membran plasma dan membran terluar (Campbell & Reece, 2002). Dari hasil pengamatan, didapatkan bahwa *Bacillus subtilis* ATCC 6633 berbentuk batang berwarna ungu kemerahan ada yang membentuk rantai dan ada yang tidak, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 berbentuk bulat berwarna ungu kemerahan yang bergerombol menyerupai buah anggur dan *Streptococcus β haemolyticus grup A* berbentuk bulat berwarna ungu dan membentuk rantai, ketiganya merupakan bakteri Gram positif (Gambar 4.14a) sedangkan *Escherichia coli* ATCC 25922 berbentuk batang pendek berwarna merah, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 berbentuk batang pendek berwarna merah dengan pigmen piosianin yang berwarna hijau pada media peremajaan dan *Salmonella typhosa* ATCC 14028 berbentuk batang halus berwarna merah merupakan bakteri Gram negatif (Gambar 4.14b). Identifikasi

terhadap jamur *Candida albicans* dengan *Lactofenol cotton blue* memberikan bahwa *Candida albicans* adalah jamur yang memiliki banyak klamidospora berbentuk bulat (Gambar 4.14c). *Lactofenol cotton blue* memiliki kandungan berupa *lactofenol* dan *cotton blue*. *Lactofenol* bekerja mendeaktivasi enzim litik pada dinding sel jamur sehingga saat diwarnai dengan *cotton blue* tidak terjadi lisis pada dinding sel jamur. *Cotton blue* adalah pewarna berbentuk asap yang akan mewarnai dinding sel jamur menjadi biru jika jamur tidak memiliki pigmen, namun jika dinding sel jamur memiliki pigmen maka di bawah mikroskop dinding sel jamur akan berwarna coklat .

Metode difusi cakram digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri terhadap ekstrak *n*-heksana dan isolat β -asaron. Digunakan metode tersebut karena penggunaan zat uji lebih sedikit dibandingkan metode pengenceran agar atau pengenceran kaldu. Mikroba uji yang digunakan merupakan mikroba yang berbeda jenisnya dengan yang telah diteliti oleh peneliti sebelumnya berdasarkan literatur yang didapat.

Uji aktivitas antimikroba ekstrak *n*-heksana dengan metode difusi cakram memperlihatkan adanya aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada konsentrasi minimum 125 mg/mL, *Salmonella typhosa* ATCC 14028 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada konsentrasi minimum 62,5 mg/mL, serta *Streptococcus β haemolyticus grup A* dan jamur *Candida albicans* 31,25 mg/mL. Uji aktivitas antimikroba isolat β -asaron dengan metode difusi cakram memperlihatkan adanya aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Streptococcus β haemolyticus grup A* pada konsentrasi minimum 12,5 mg/mL, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhosa* ATCC 14028 dan jamur *Candida albicans* pada konsentrasi minimum 25 mg/mL. Hasil pengujian aktivitas antimikroba dapat dilihat pada Tabel 4.3, Tabel 4.4, Gambar 4.15 (a-g), Gambar 4.16 (a-g), Gambar 4.17 dan Gambar 4.18.

Aktivitas antimikroba ekstrak *n*-heksana pada bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dengan konsentrasi hambat minimum 125 mg/mL memiliki aktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Mc Gaw, Jager, & van Staden (2002) yang menggunakan larutan uji berupa ekstrak etanol dengan bakteri

Bacillus subtilis ATCC 6051 dengan metode uji mikroplat yaitu 100 mg/mL. Pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 baik ekstrak *n*-heksana maupun isolat β -asaron tidak memperlihatkan adanya aktivitas antimikroba. Ketiadaan aktivitas antimikroba pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 juga dilaporkan oleh Phongpaichit et al (2005) dengan metode uji aktivitas antimikroba yang berbeda, yaitu metode dilusi agar. Penggunaan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kembali pada penelitian ini, padahal pada penelitian sebelumnya memberikan hasil negatif pada pengujian aktivitas antimikroba karena *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 memang memiliki tingkat resistensi yang tinggi terhadap banyak antimikroba, sehingga ingin dilihat aktivitas dari zat uji terhadap bakteri ini.

Aktivitas antimikroba isolat β -asaron pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan kadar hambat minimum 12,5 mg/mL memperlihatkan aktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan Devi S & Ganjewala (2009) dengan metode *agar well diffusion* pada bakteri *Escherichia coli* MTCC 901 yang memiliki kadar hambat minimum 8 mg/mL. Hasil pengujian antimikroba isolat β -asaron terhadap *Candida albicans* adalah 25 mg/mL lebih rendah dibandingkan hasil penelitian Phongpaichit et al (2005) dengan kadar hambat minimum 10 mg/mL, Phongpaichit et al melakukan pengukuran lanjutan menggunakan SEM (Scanning Electron Microscopy) yang mampu memperlihatkan secara detail penghambatan terhadap jamur uji. Perbedaan hasil yang didapat, dikarenakan jenis bakteri dan metode yang digunakan berbeda.

Dari hasil uji aktivitas antimikroba yang dilakukan, ekstrak *n*-heksana mempunyai aktivitas antimikroba yang lebih rendah dibandingkan dengan isolat β -asaron. Hal ini diperlihatkan dengan konsentrasi larutan uji yang dipakai dan aktivitas antimikroba yang terjadi.

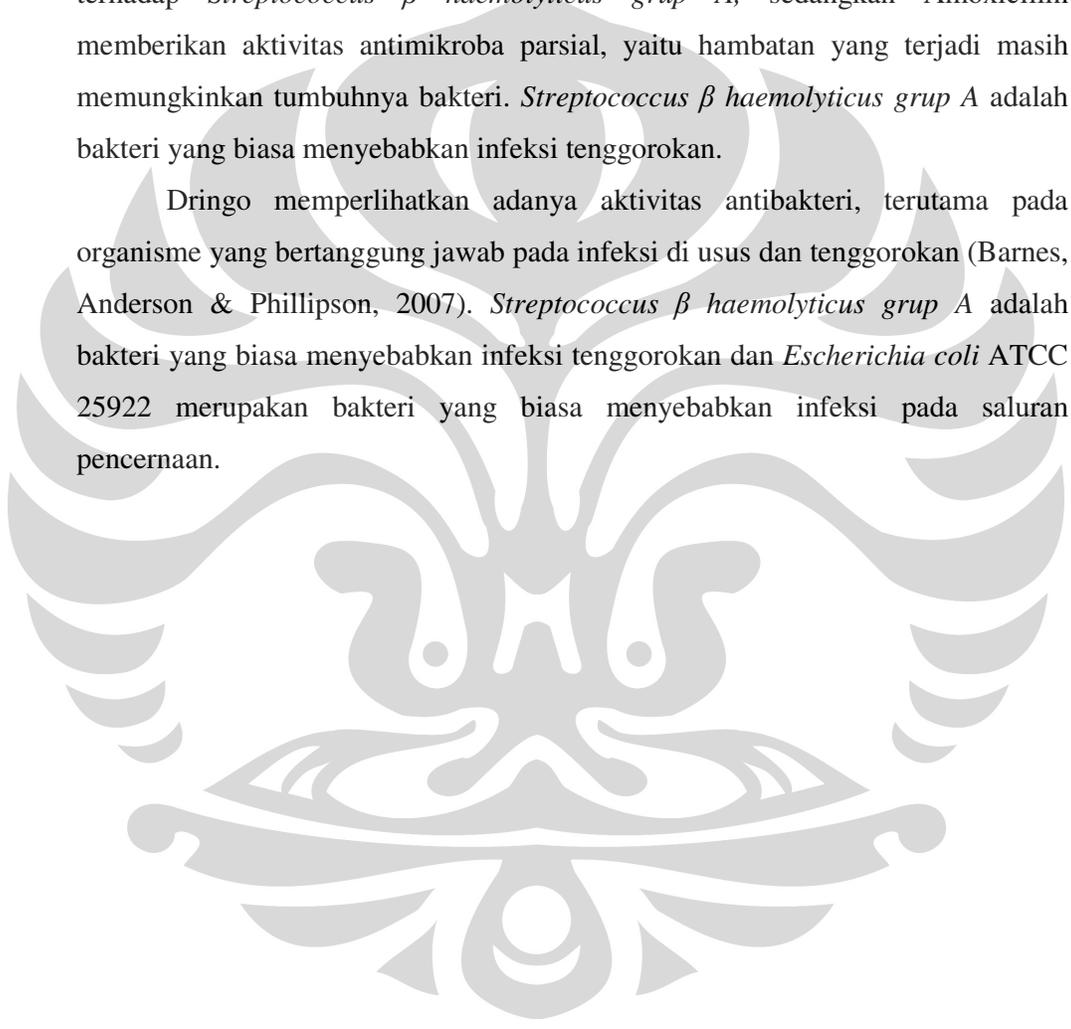
Ekstrak *n*-heksana memiliki aktivitas tertinggi pada jamur *Candida albicans* dengan diameter zona jernih 7 mm dan bakteri *Streptococcus β haemolyticus grup A* dengan diameter zona jernih 6,8 mm pada konsentrasi 31,25 mg/mL.

Isolat β -asaron memiliki aktivitas tertinggi pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan diameter zona jernih 6,9 mm dan *Streptococcus β*

haemolyticus grup A dengan diameter zona jernih 7,4 mm pada konsentrasi minimum 12,5 mg/mL. Sedangkan aktivitasnya pada *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhosa* ATCC 14028, *Streptococcus β haemolyticus grup A* dan jamur *Candida albicans* memberikan aktivitas yang sama yaitu pada konsentrasi minimum 25 mg/mL.

Ekstrak *n*-heksana dan isolat β -asaron memberikan aktivitas antimikroba terhadap *Streptococcus β haemolyticus grup A*, sedangkan Amoxicillin memberikan aktivitas antimikroba parsial, yaitu hambatan yang terjadi masih memungkinkan tumbuhnya bakteri. *Streptococcus β haemolyticus grup A* adalah bakteri yang biasa menyebabkan infeksi tenggorokan.

Dringo memperlihatkan adanya aktivitas antibakteri, terutama pada organisme yang bertanggung jawab pada infeksi di usus dan tenggorokan (Barnes, Anderson & Phillipson, 2007). *Streptococcus β haemolyticus grup A* adalah bakteri yang biasa menyebabkan infeksi tenggorokan dan *Escherichia coli* ATCC 25922 merupakan bakteri yang biasa menyebabkan infeksi pada saluran pencernaan.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diuraikan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Senyawa hasil isolasi berupa minyak berwarna kuning, mempunyai rumus molekul $C_{12}H_{16}O_3$ dengan rumus kimia *cis*-1,2,4-trimetoksi-5-(1-propenil)-benzen dengan nama lain adalah β -asaron.
2. Uji aktivitas antimikroba ekstrak *n*-heksana memperlihatkan adanya aktivitas terhadap bakteri *Streptococcus β haemolyticus grup A* dan jamur *Candida albicans* pada konsentrasi minimum 31,25 mg/mL, *Salmonella typhosa* ATCC 14028 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada konsentrasi minimum 62,5 mg/mL, serta *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada konsentrasi minimum 125 mg/mL. Ekstrak *n*-heksana tidak memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
3. Uji aktivitas antimikroba isolat β -asaron memperlihatkan adanya aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Streptococcus β haemolyticus grup A* pada konsentrasi minimum 12,5 mg/mL, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhosa* ATCC 14028 dan jamur *Candida albicans* pada konsentrasi minimum 25 mg/mL. Isolat β -asaron tidak memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

5.2 Saran

Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap bagian lain dari tanaman dringo (*Acorus calamus* Linn.) untuk mendapatkan senyawa yang baru, khususnya yang mempunyai aktivitas biologis.



DAFTAR ACUAN

- Acorus calamus L: A Sacred Medicinal Plant of the Native Cree. (n.d). Mei 10, 2010.
http://health.utah.gov/diabetes/pdf/telehlth/cesspooch_acorus_calamusL.pdf
- Barnes, J., Anderson, L.A., & Phillipson, J. D. (2007). *Herbal Medicines* (3rd ed.). London: Pharmaceutical Press.
- Campbell, N.A., & Reece, J.B. (2002). *Biology*. (6th ed). San Fransisco: Pearson Education Inc.
- Devi S, A., & Ganjewala, D. (2009). Antimicrobial activity of *Acorus calamus* (L.) rhizome and leaf extract. *Acta Biologica Szegediensis*, 53, 45-49.
- Farmakope Indonesia*. (Ed. Ke-4). (2000). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Ganiswara, S G., et al. (1995). *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Gandjar, I. (2000). *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M., & Schwarting A.E. (1991). *Pengantar Kromatografi. Terjemahan dari Introduction to Chromatography* (Padwawinata K & Soediro I, Penerjemah.). Bandung: ITB Press.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi Universitas Indonesia.
- Harmita. (2007). *Buku Elusidasi Struktur*. Depok: Departemen Farmasi Universitas Indonesia.
- Hazra, H., Ray, K., & Guha, D. (2007). Inhibitory role of *Acorus calamus* in ferric chloride-induced epileptogenesis in rat. *Human & Experimental Toxicology*, 26, 947-953.
- Hendayana, S., et al. (1994). *Kimia Analitik Instrumen*. Semarang: IKIP Semarang Press.

- Hostettmann, K., Hostettmann, M., & Marston, A. (1995). *Cara Kromatografi Preparatif: Penggunaan Pada Isolasi Bahan Alam*. Bandung: Penerbit ITB Bandung.
- Jee Yeon Lee., et al. (2004). Antifungal activity of β -asarone from rhizome of *Acorus gramineus*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 776-780.
- Materia Medika Indonesia*. (Vol. 2). (1978). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Mc Gaw, L.J., Jager, A.K., & van Staden, J. (2002). Isolation of β -asarone, an antibacterial and anthelmintic compound, from *Acorus calamus* in South Africa. *South African Journal of Botany*, 68, 31-35.
- Palani, S., et al. (2009). Therapeutic efficacy of antihepatotoxic and antioxidant activities of *Acorus calamus* on acetaminophen-induced toxicity in rat. *International Journal of Integrative Biology*, 7, 39-44.
- Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. (2000). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Pelczar, M S. (1986). *Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid II*. Jakarta: UI Press.
- Phongpaichit, S., et al. (2005). Antimicrobial activities of the crude methanol extract of *Acorus calamus* Linn. *Songklanakarin J. Sci. Technol. Thai Herbs*, 27, 517-523.
- Poeloengan, M., et al. (2006). Aktivitas antimikroba dan fitokimia dari beberapa tanaman obat. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*, 974-978.
- Padua, L. S., Bunyapraphatsara., & Lemmens, R. H. M. J. (1999). *Prosea: Plant Resources of South East Asia 12 (1) Medicinal and Poisonous Plants 1*. Netherlands: Backhuys Publisher.
- Radji, M., et al. (2004). *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Farmasi*. Depok: Departemen Farmasi Universitas Indonesia.
- Raja, A. E., Vijayalakshmi, M., & Devalarao, G. (2009). *Acorus calamus* Linn. : Chemistry and Biology. *Research J Pharm. and Tech.*2, 2, 256-261.

- Schüter, U., & Crawford, R. M. M. (2001). Long-term anoxia tolerance in leaves of *Acorus calamus* L. and *Iris pseudacorus* L. *Journal of Experimental Botany*, 52, 2213-2225.
- Singh, S., Srivastava, R., & Choudary, S. (2010). Antifungal and HPLC analysis of crude extracts of *Acorus calamus*, *Tinospora cordifolia* and *Celestrus paniculatus*. *Journal of Agricultural Technology*, 6, 149-158.
- Souza, T. D., et al. (2007). Efficacy study of bioactive fraction (F-3) of *Acorus calamus* in hyperlipidemia. *Indian J Pharmacology*, 39, 196-200.
- Syaruchrahman, A., et al. (1993). *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. *Plants Database: Plants profile Acorus calamus* L. 25 Mei 2010. <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=ACCA4>
- Vademekum Bahan Obat Alam*. (1989). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Wilkinson, J. M. (2006). *Modern Phytomedicine: Methods for Testing The Antimicrobial Activity of Ekstraks*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Williams, D. H. (2002). *Spectroscopic methods in organic chemistry*. (3rd ed). United Kingdom: Mc Graw Hill Book company.
- Zahin, M., Aqil, F., & Ahmad, I. (2009). The *in-vitro* antioxidant activity and total phenolic content of four Indian medicinal plants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1, 88-95.



GAMBAR



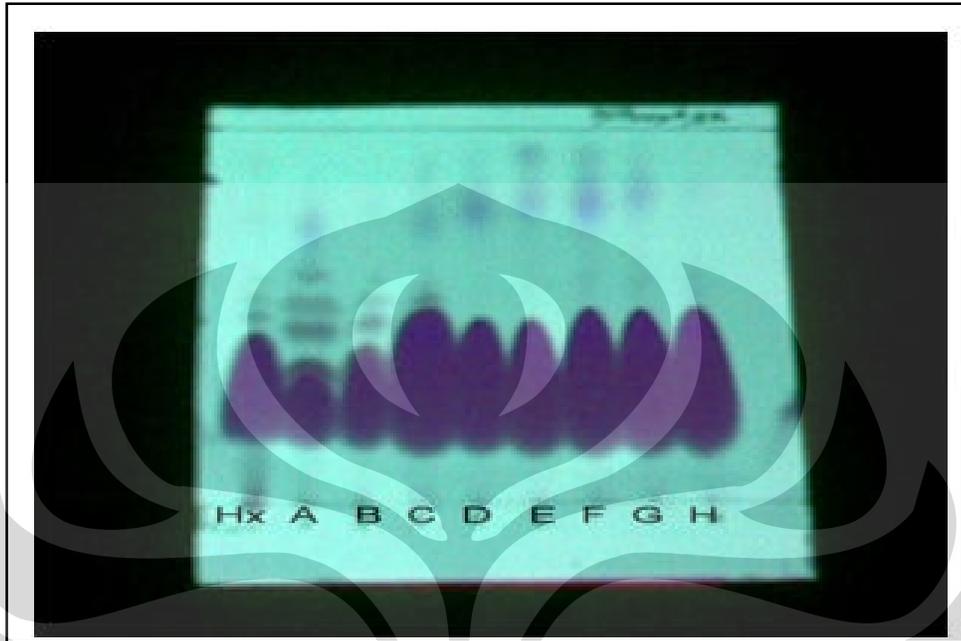
Gambar 2.1. Tanaman dan rimpang dringo (*Acorus calamus* Linn)



Gambar 4.1. Ekstrak *n*-heksana rimpang dringo



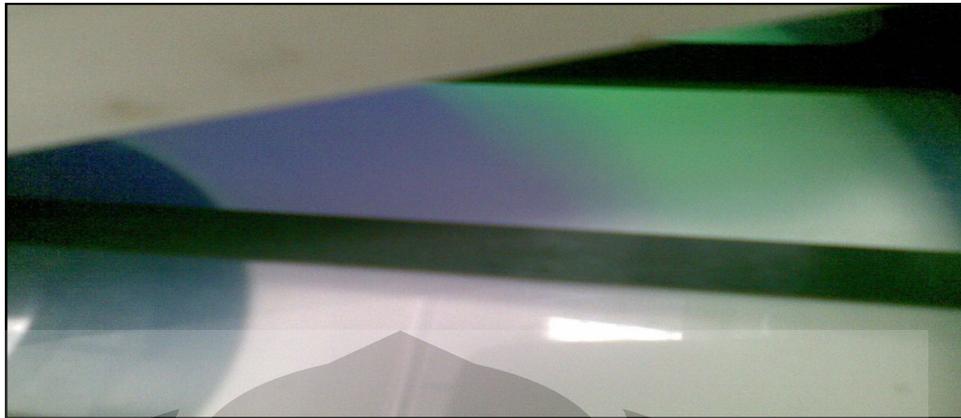
Gambar 4.2. Kromatografi kolom ekstrak *n*-heksana rimpang dringo



Keterangan:

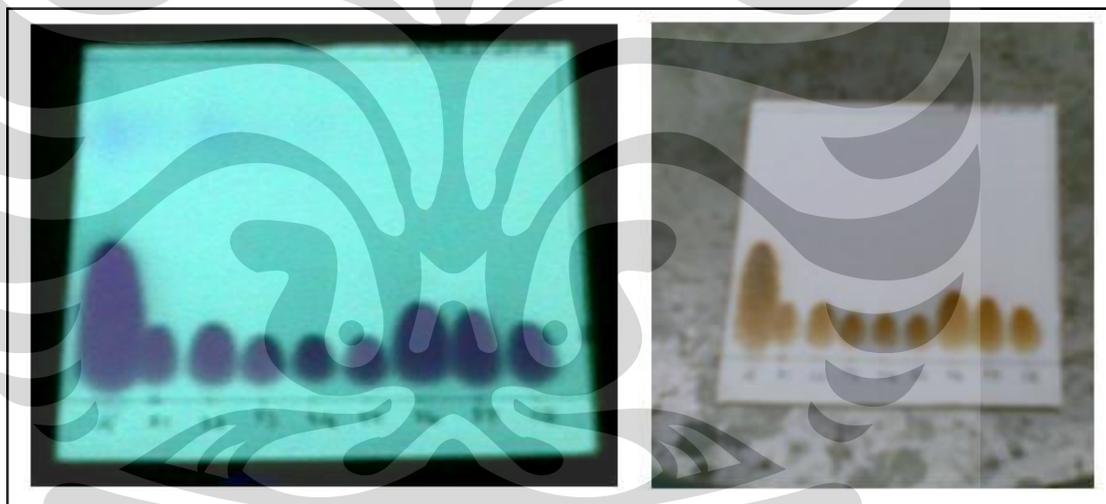
Jarak elusi	: 4 cm
Eluen	: <i>n</i> -Heksana-Etil asetat 5%
Bercak Hx	: Ekstrak <i>n</i> -heksana
Bercak A	: Fraksi 6-8
Bercak B	: Fraksi 9-10
Bercak C	: Fraksi 11-20
Bercak D	: Fraksi 21-30
Bercak E	: Fraksi 31-32
Bercak F	: Fraksi 33-40
Bercak G	: Fraksi 41-50
Bercak H	: Fraksi 51-55

Gambar 4.3. Pola KLT fraksi kromatografi kolom di UV 254 nm



Keterangan :
Pita senyawa yang ingin diisolasi berwarna ungu

Gambar 4.4. Penampakan pita kromatotron



Gambar 4.5a.

Gambar 4.5b.

Keterangan:

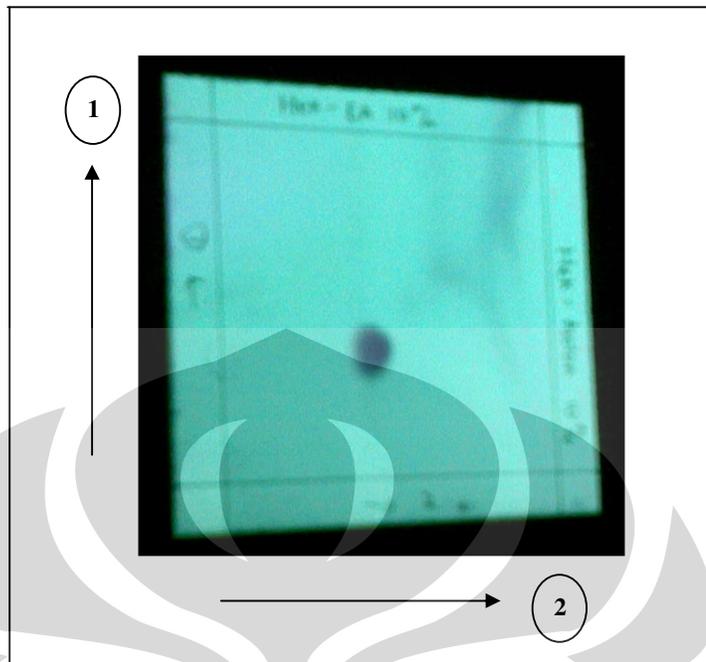
Gambar 4.5a. KLT Satu Bercak Fraksi Kromatotron dengan Pengamatan di Bawah Sinar UV 254 nm

Gambar 4.5b. KLT Satu Bercak Fraksi Kromatotron dengan Penyemprotan H_2SO_4 10% dalam metanol

Jarak Elusi : 4 cm

Eluen : *n*-Heksana-Etil Asetat 5%

Gambar 4.5. Pola KLT fraksi kromatotron



Keterangan:

Arah Pengelusian:

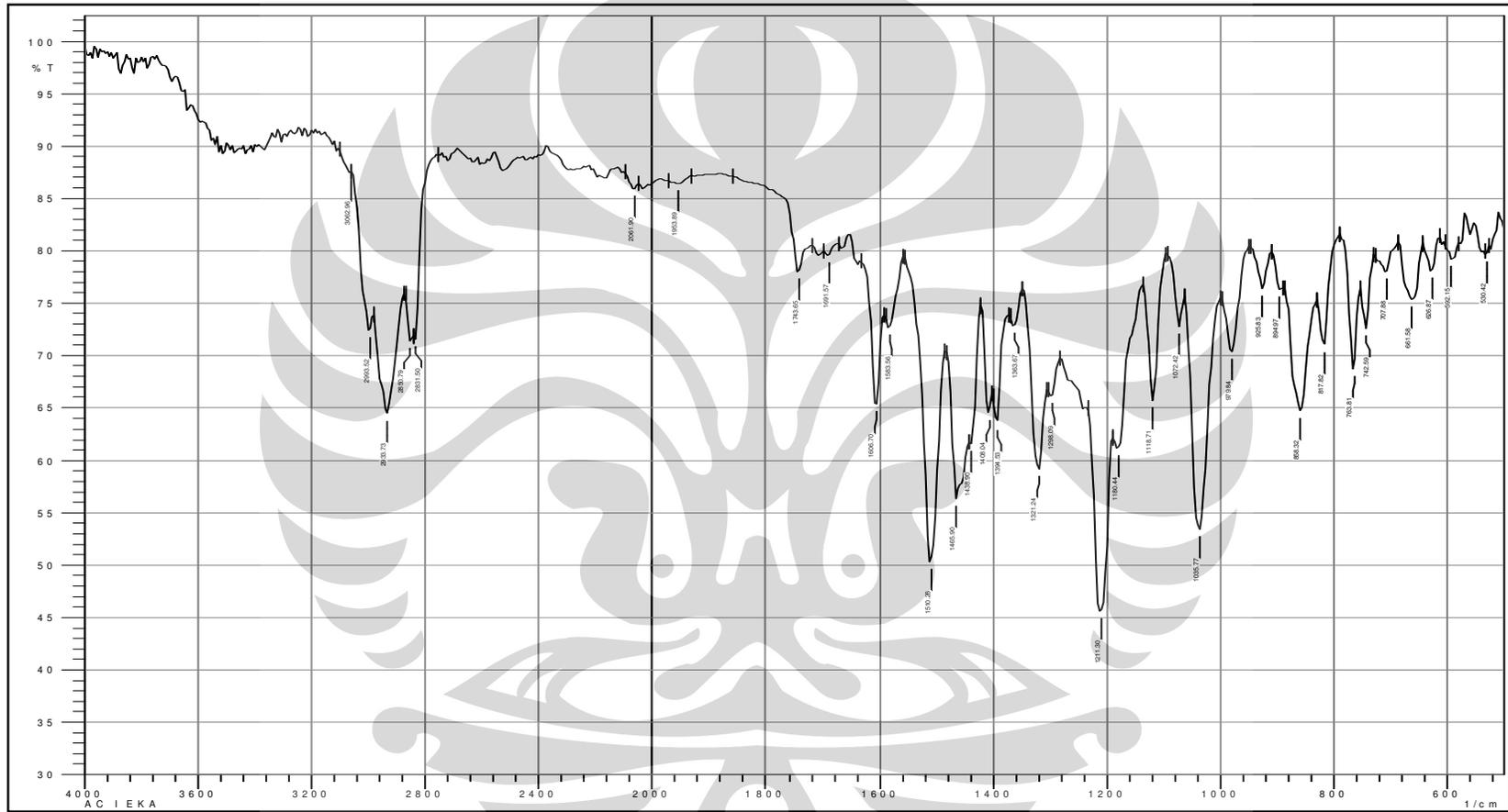
\uparrow *n*-heksana – etil asetat 10%

\rightarrow *n*-heksana – aseton 10%

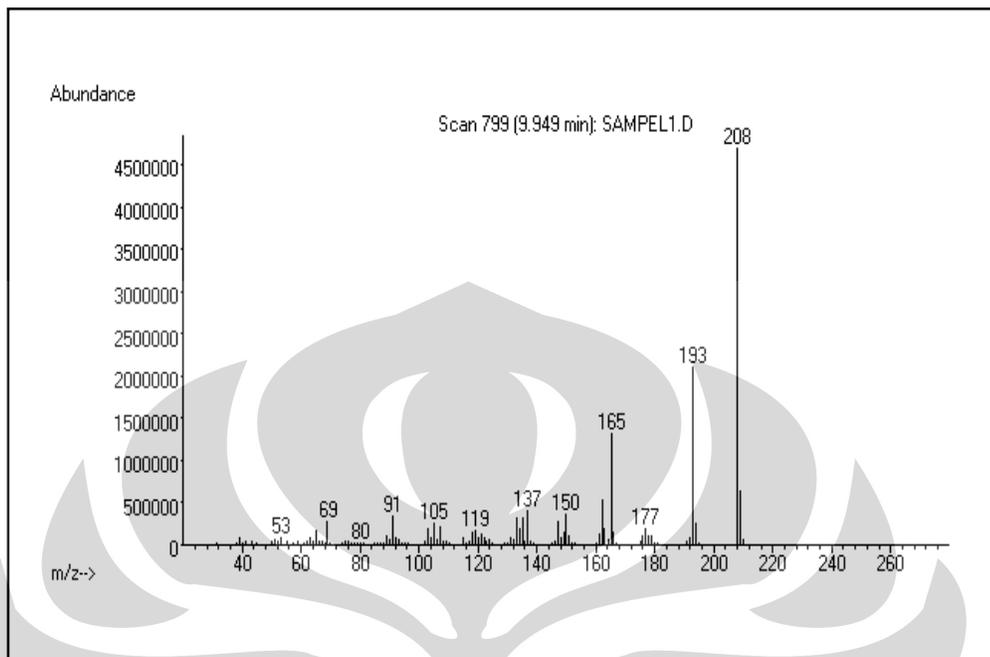
Gambar 4.6. KLT dua dimensi fraksi murni kromatotron



Gambar 4.7. Isolat murni

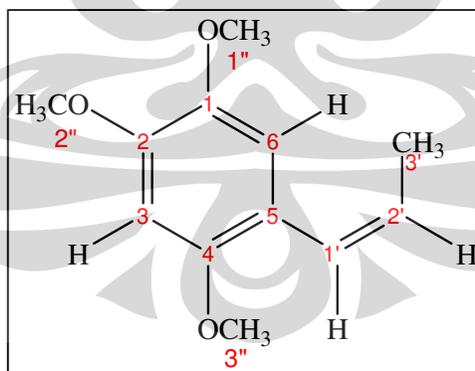


Gambar 4.8. Spektrum Inframerah



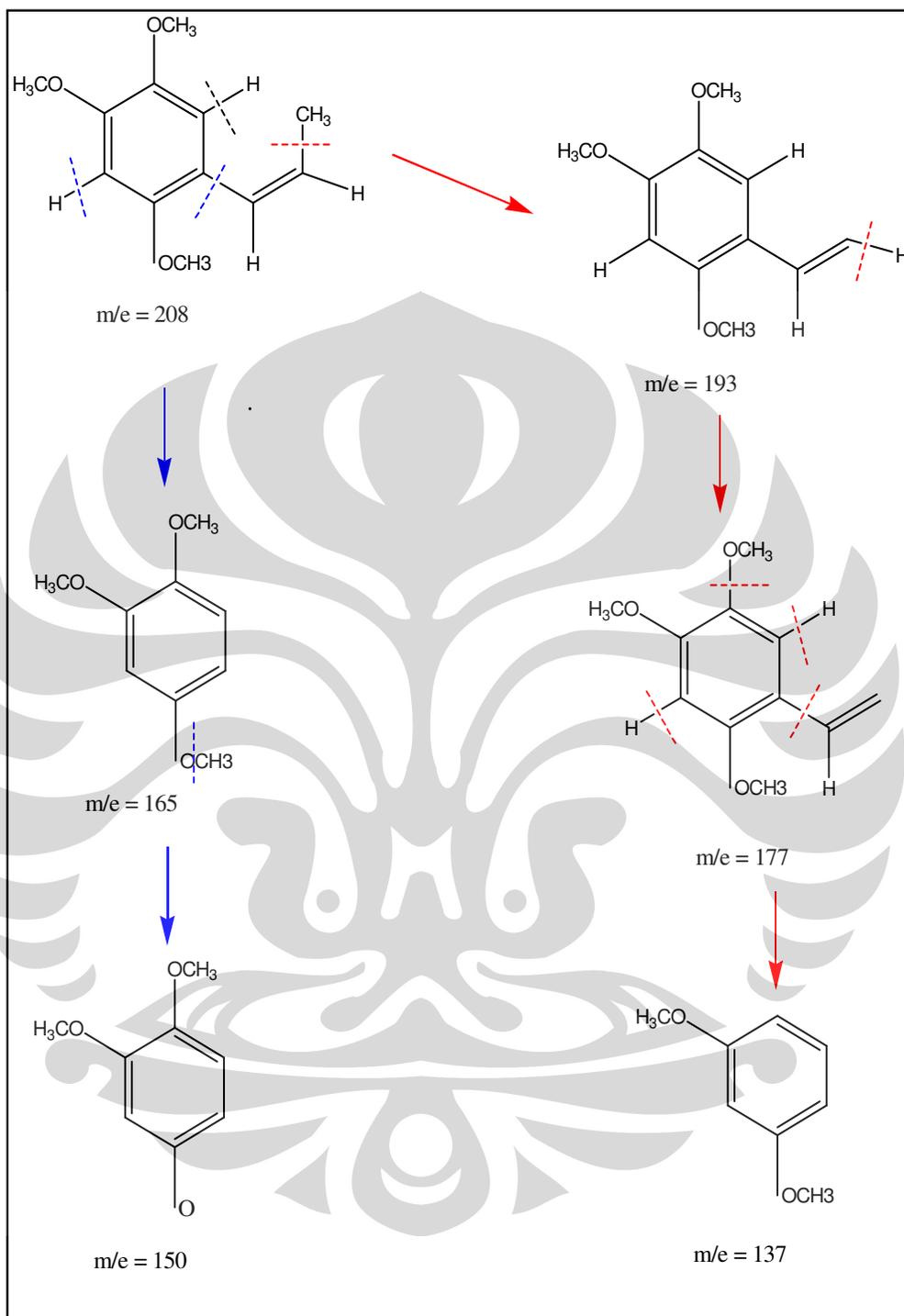
[Sumber: Agilent 73]

Gambar 4.11. Spektrum massa



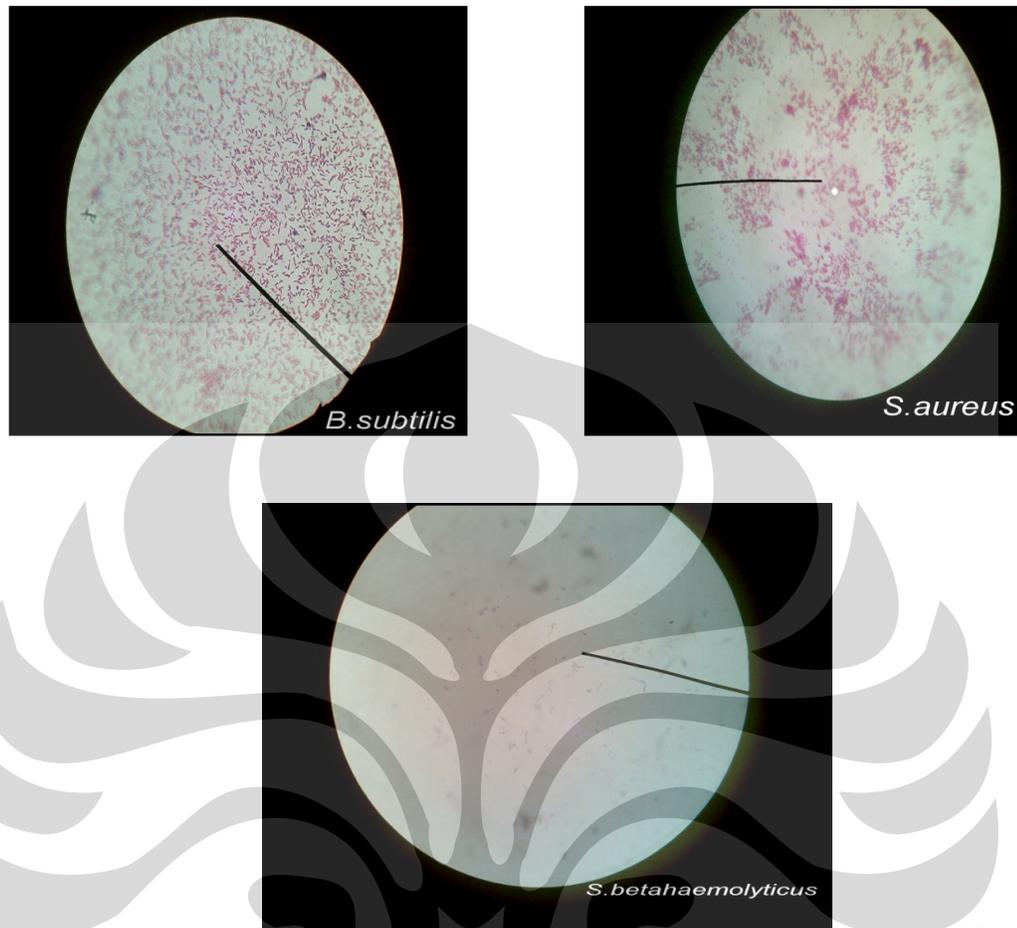
[Sumber: Jee Yeon Lee, 2004 dengan aplikasi Chem Draw]

Gambar 4.12. Struktur *cis*-1,2,4-trimetoksi-5-(1-propenil)-benzen atau (β -asaron) “ telah diolah kembali ”



[Sumber: Jee Yeon Lee, 2004 dengan aplikasi Chem Draw]

**Gambar 4.13. Pola fragmentasi spektrum massa isolat β -asarone
“ telah diolah kembali “**



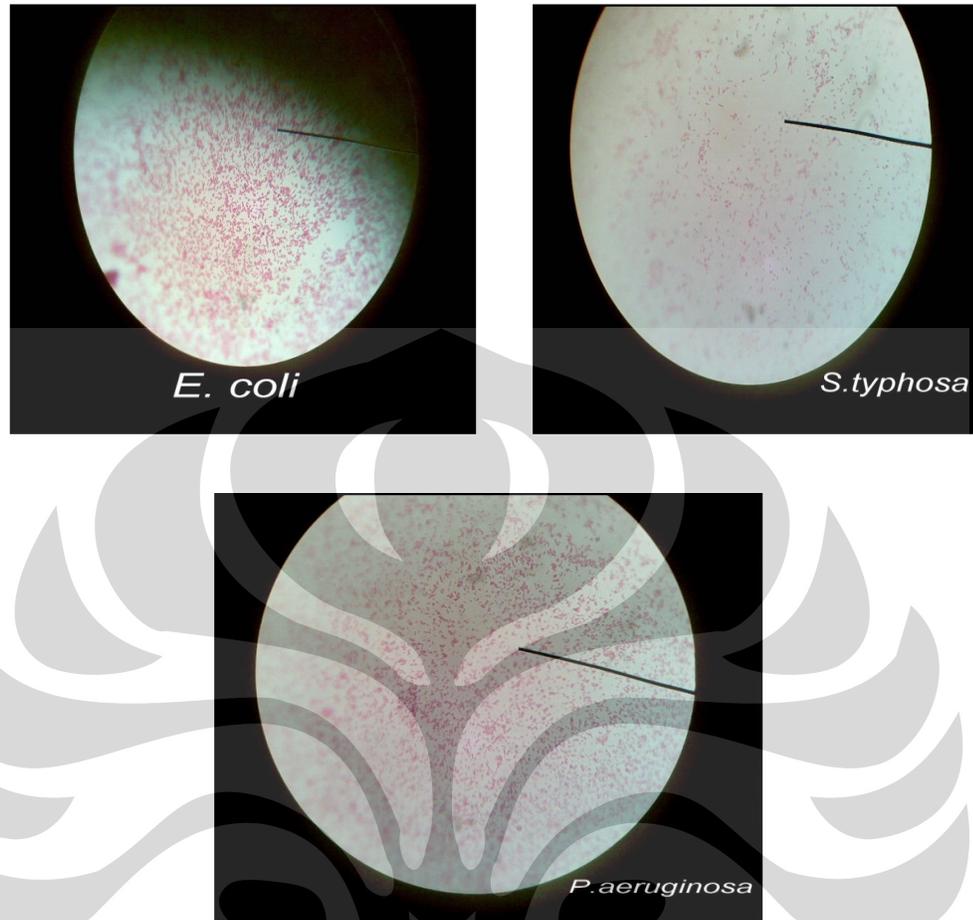
Keterangan:

Bacillus subtilis ATCC 6633 berbentuk batang berwarna ungu kemerahan, ada yang membentuk rantai dan ada yang tidak.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 berbentuk bulat bergerombol seperti buah anggur berwarna ungu kemerahan.

Streptococcus β haemolyticus grup A berbentuk bulat berantai berwarna ungu.

Gambar 4.14a. Hasil identifikasi bakteri gram positif



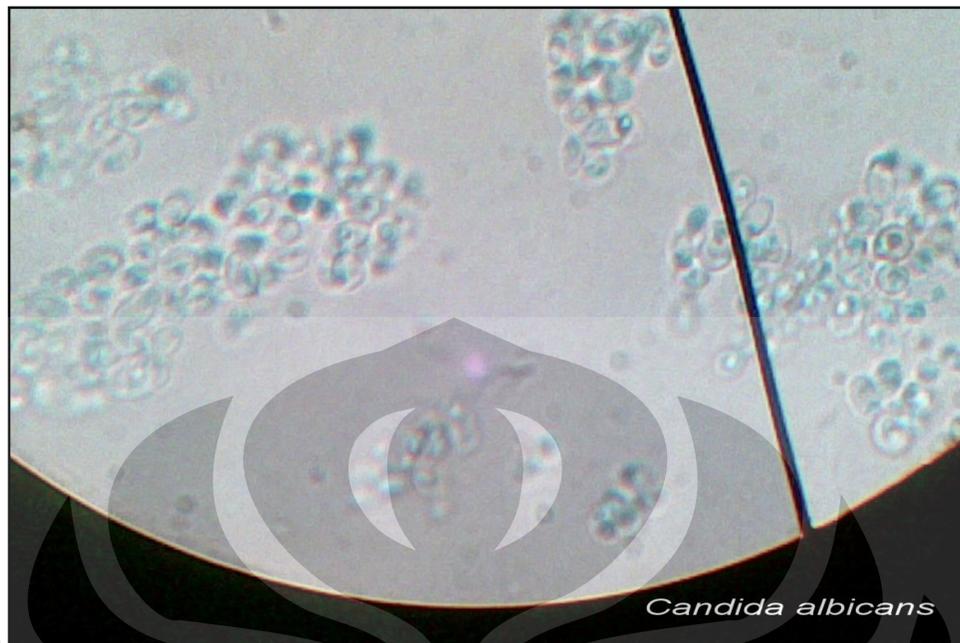
Keterangan:

Escherichia coli ATCC 25922 berbentuk batang pendek berwarna merah.

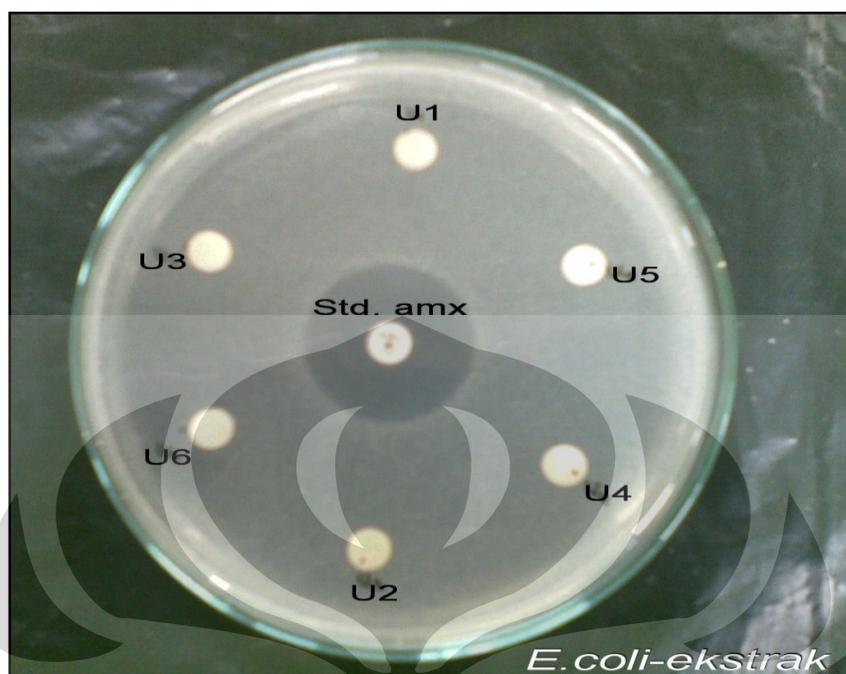
Salmonella typhosa ATCC 14028 berbentuk batang halus berwarna merah

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 berbentuk batang pendek berwarna merah.

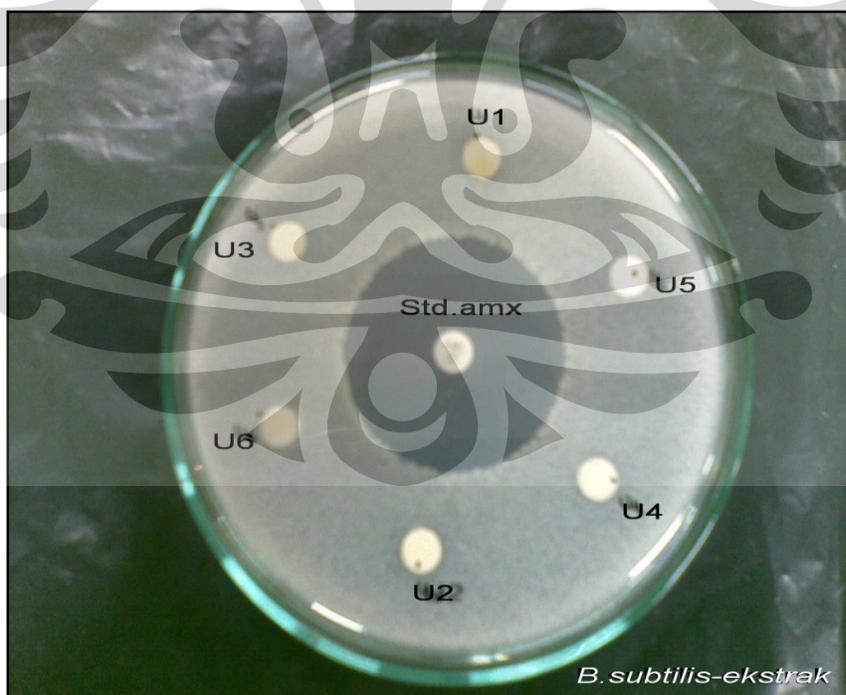
Gambar 4.14b. Hasil identifikasi bakteri gram negatif



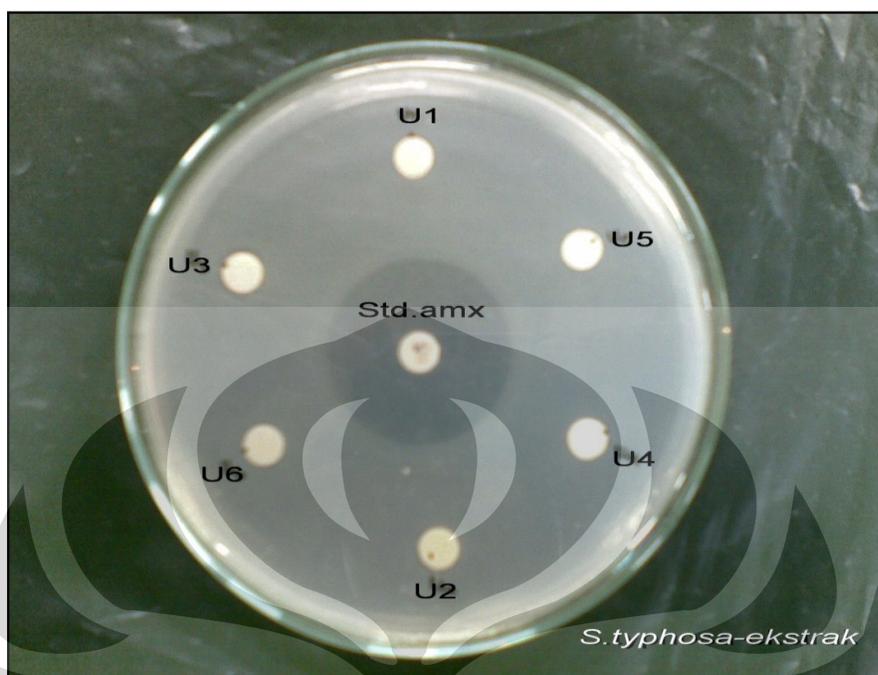
Gambar 4.14c. Hasil identifikasi jamur *Candida albicans*



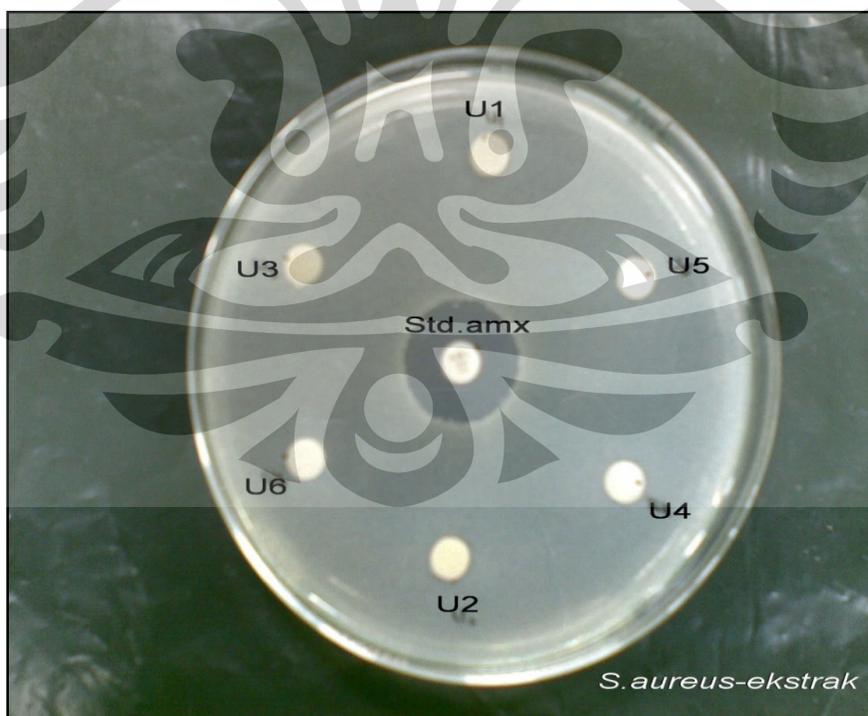
Gambar 4.15a. Hasil uji antimikroba ekstrak *n*-heksana terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922



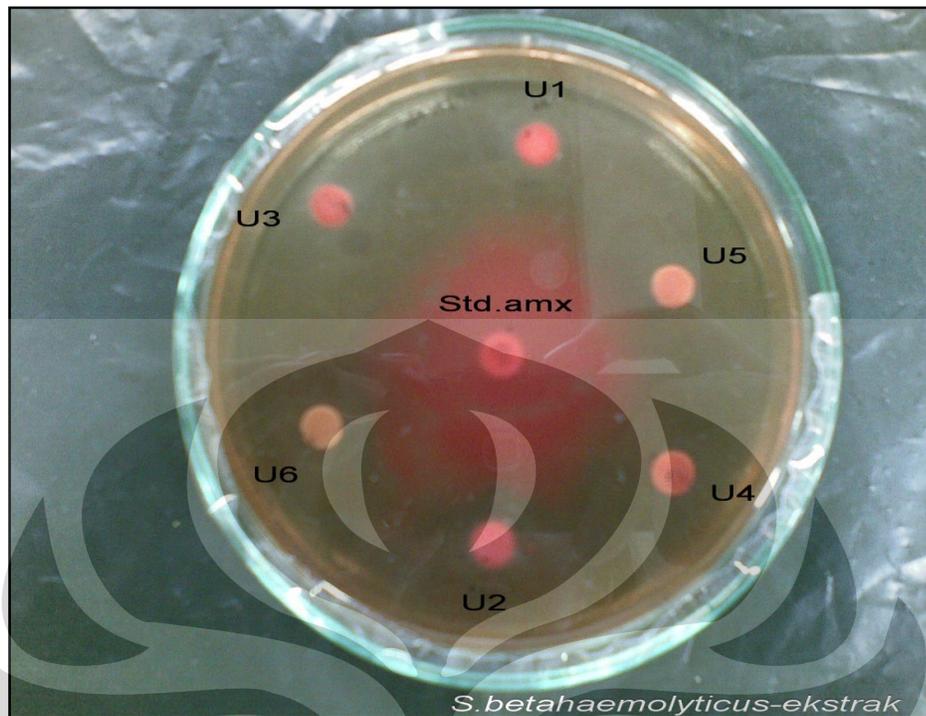
Gambar 4.15b. Hasil uji antimikroba ekstrak *n*-heksana terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633



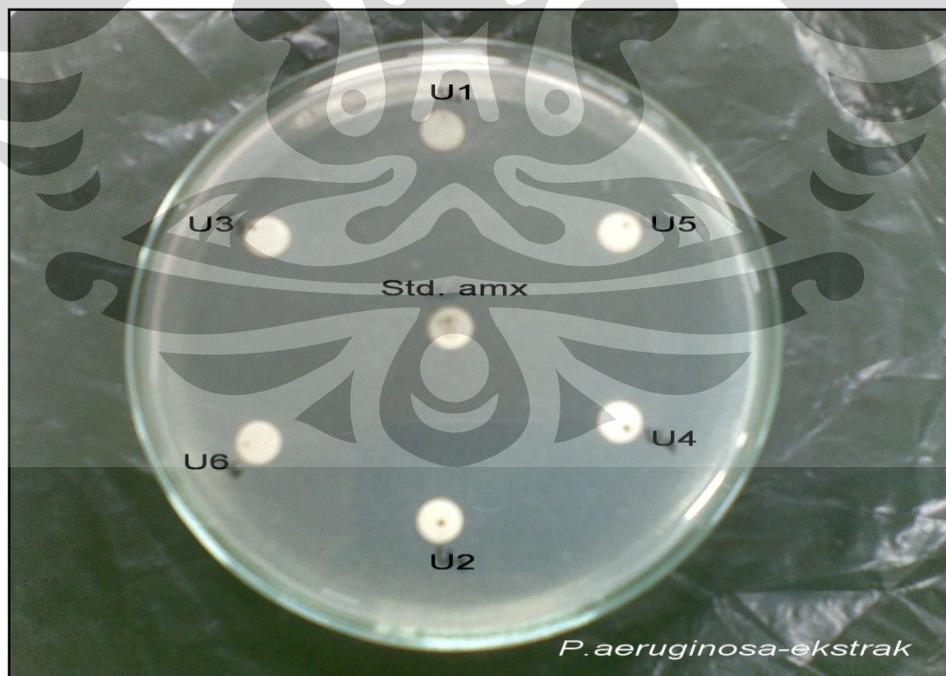
Gambar 4.15c. Hasil uji antimikroba ekstrak *n*-heksana terhadap *Salmonella typhosa* ATCC 14028



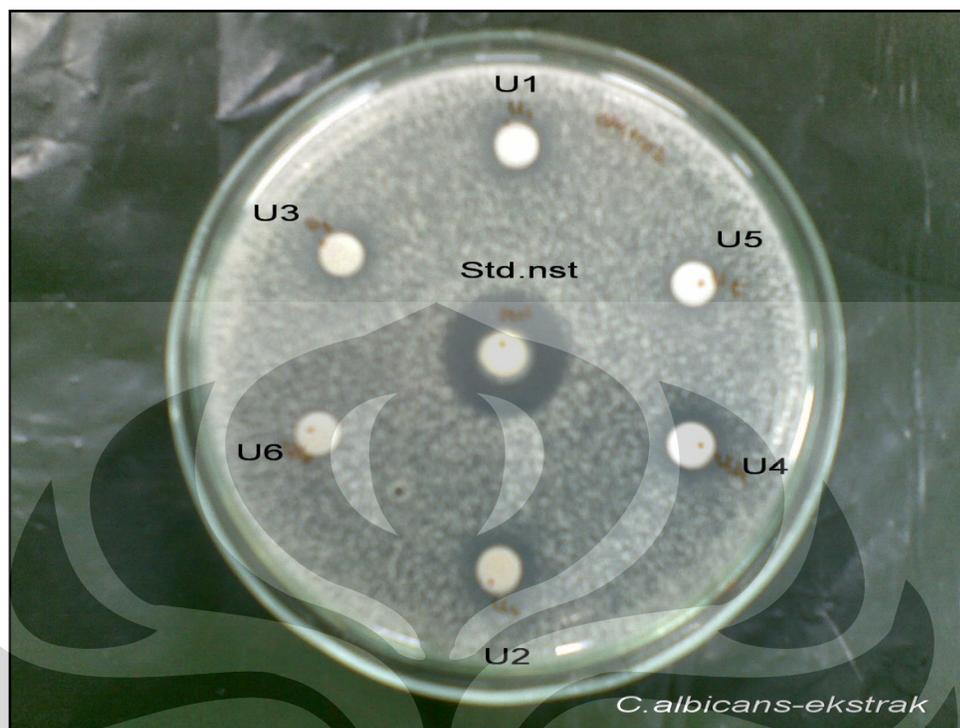
Gambar 4.15d. Hasil uji antimikroba ekstrak *n*-heksana terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



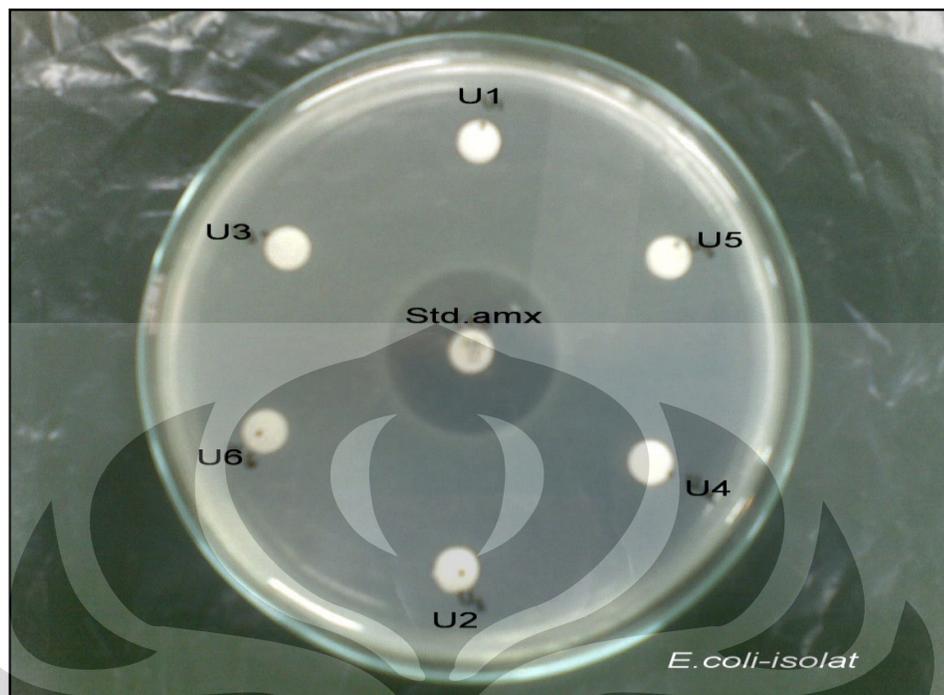
Gambar 4.15e. Hasil uji antimikroba ekstrak *n*-heksana terhadap *Streptococcus beta haemolyticus* grup A



Gambar 4.15f. Hasil uji antimikroba ekstrak *n*-heksana terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



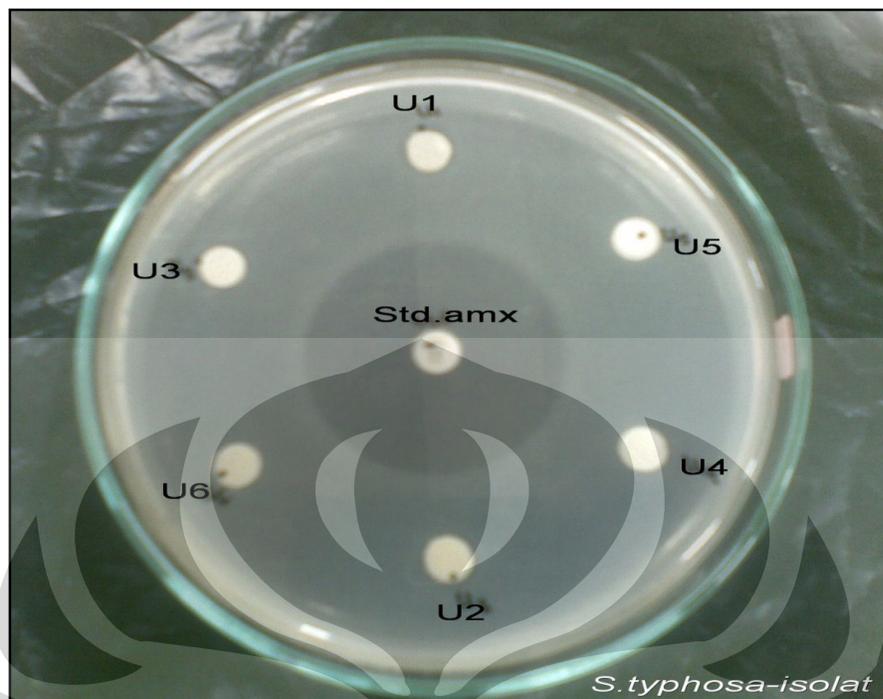
Gambar 4.15g. Hasil uji antimikroba ekstrak *n*-heksana terhadap *Candida albicans*



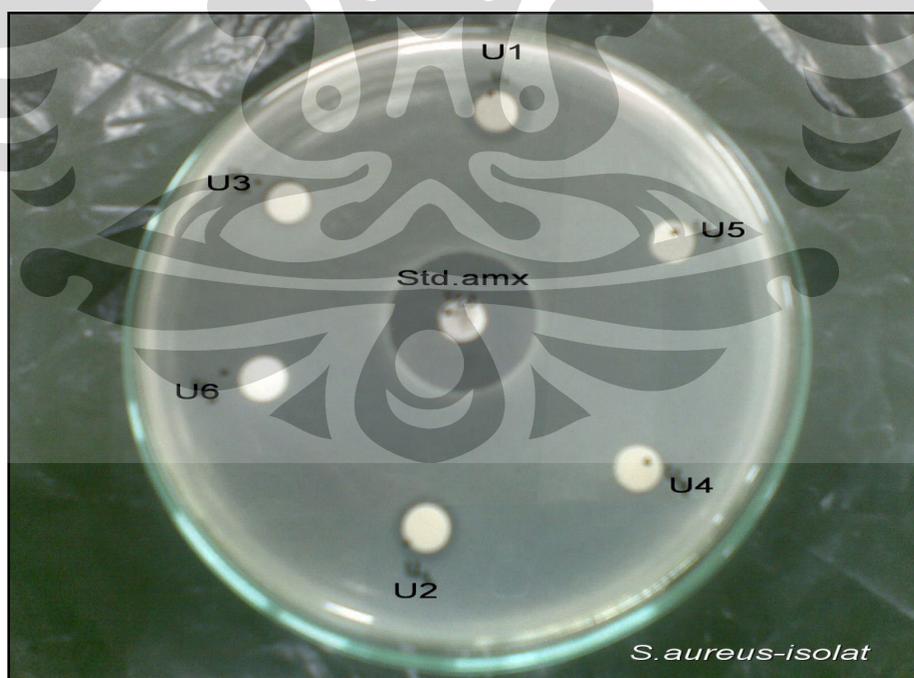
Gambar 4.16a. Hasil uji antimikroba isolat β asaron terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922



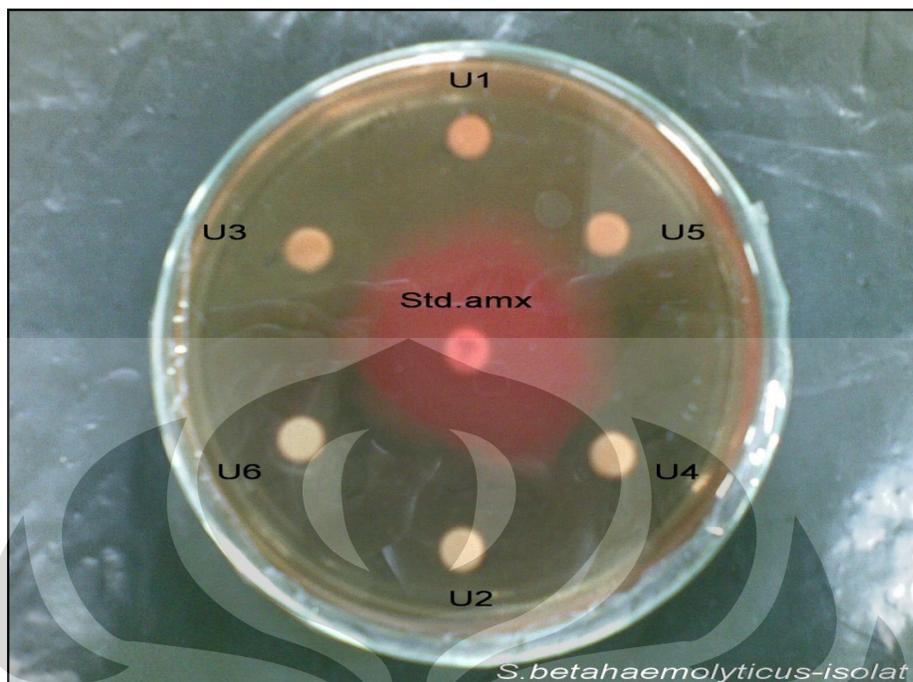
Gambar 4.16b. Hasil uji antimikroba isolat β asaron terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633



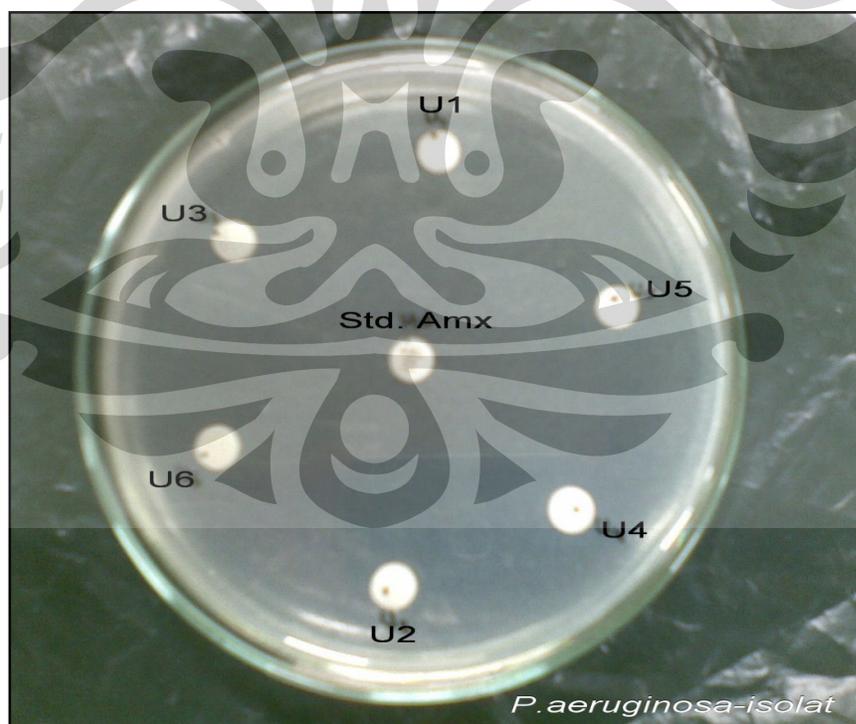
Gambar 4.16c. Hasil uji antimikroba isolat β asaron terhadap *Salmonella typhosa* ATCC 14028



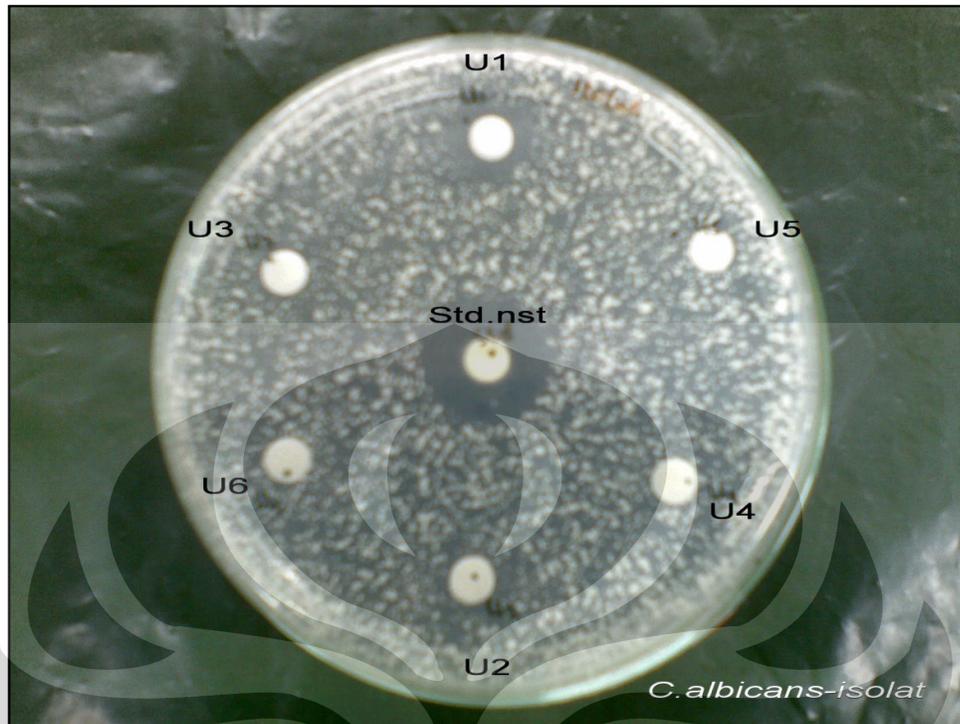
Gambar 4.16d. Hasil uji antimikroba isolat β asaron terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



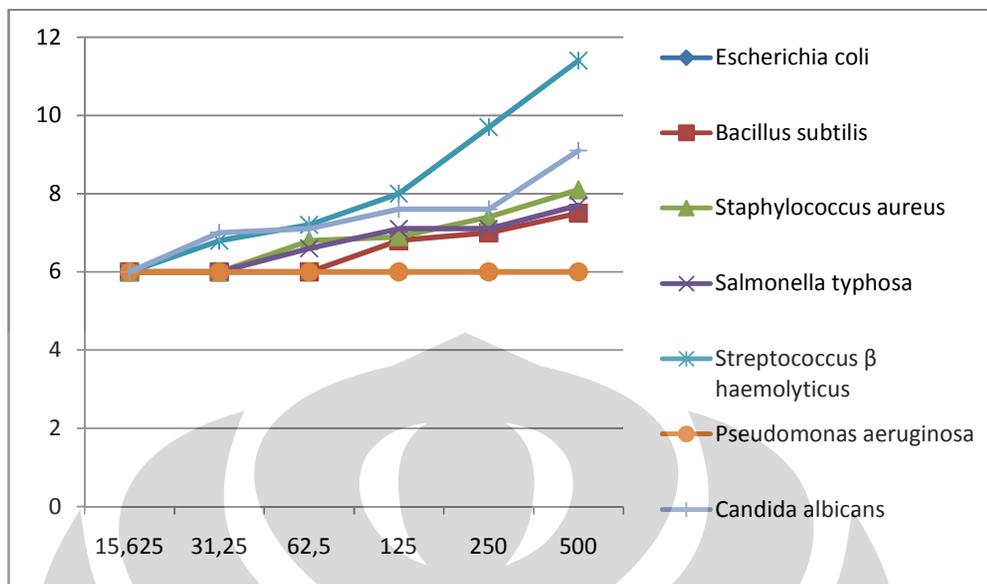
Gambar 4.16e. Hasil uji antimikroba isolat β asaron terhadap *Streptococcus β haemolyticus grup A*



Gambar 4.16f. Hasil uji antimikroba isolat β asaron terhadap *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*



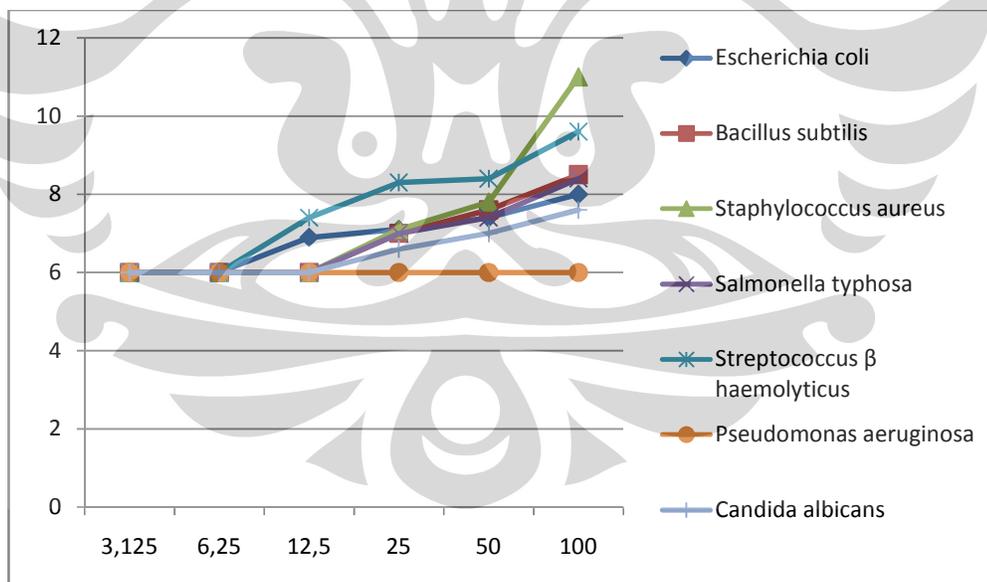
Gambar 4.16g. Hasil uji antimikroba isolat β asaron terhadap *Candida albicans*



Keterangan: Sumbu X = konsentrasi larutan uji

Sumbu Y = hambatan dalam mm

Gambar 4.17. Hasil uji antimikroba ekstrak *n*-heksana



Keterangan: Sumbu X = konsentrasi larutan uji

Sumbu Y = hambatan dalam mm

Gambar 4.18. Hasil uji antimikroba isolat β -asaron



TABEL

Tabel 4.1. Data perbandingan pergeseran kimia (δ) $^1\text{H-NMR}$ β -asaron dari Jee Yeon Lee et al (2004) dan isolat murni dengan pelarut CDCl_3

Posisi C	$^1\text{H-NMR}$ (β -asaron) (dalam ppm)	$^1\text{H-NMR}$ (isolat) (dalam ppm)
1		
2		
3	6,52 (1H, s)	6,53 (1H, s)
4		
5		
6	6,86 (1H, s)	6,83 (1H, s)
1'	6,42 (1H, dd, $J=12; 2,0$)	6,48 (1H, dd, $J=11,65; 1,83$)
2'	5,68 (1H, dq, $J=12; 7,0$)	5,77 (1H, dq, $J=11,65; 7,3$)
3'	1,80 (3H, dd, $J=7,0; 2,0$)	1,84 (3H, dd, $J=7,3; 1,83$)
1''	3,77 (3H, s)	3,80 (3H, s)
2''	3,85 (3H, s)	3,89 (3H, s)
3''	3,78 (3H, s)	3,83 (3H, s)

Tabel 4.2. Data perbandingan pergeseran kimia (δ) $^{13}\text{C-NMR}$ β -asaron dari Jee Yeon Lee et al (2004) dan isolat murni dengan pelarut CDCl_3

Posisi C	$^{13}\text{C-NMR}$ (β -asaron) (dalam ppm)	$^{13}\text{C-NMR}$ (isolat) (dalam ppm)
1	143,7	142,51
2	150,4	148,86
3	99,4	97,64
4	153,4	151,65
5	119,6	118,17
6	116,5	114,22
1'	126,1 (C-1')	125,99 (C-1')
2'	126,0 (C-2')	124,94 (C-2')
3'	14,9 (C-3')	14,84 (C-3')
1''	56,9 ($\text{CH}_3\text{-O}$)	56,77 ($\text{CH}_3\text{-O}$)
2''	56,7 ($\text{CH}_3\text{-O}$)	56,60 ($\text{CH}_3\text{-O}$)
3''	56,6 ($\text{CH}_3\text{-O}$)	56,24 ($\text{CH}_3\text{-O}$)

Tabel 4.3. Aktivitas antimikroba ekstrak *n*-heksana rimpang dringo dengan metode difusi cakram (hambatan dalam mm)

	Konsentrasi ekstrak dalam mg/mL						standar
	500	250	125	62,5	31,25	15,625	
Bakteri							
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	24,7*
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	7,5	7,0	6,8	6,0	6,0	6,0	36,5*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8,1	7,4	6,9	6,8	6,0	6,0	17,6*
<i>Salmonella typhosa</i> ATCC 14028	7,7	7,1	7,1	6,6	6,0	6,0	30*
<i>Streptococcus β haemolyticus</i> grup A	11,4	9,7	8,0	7,2	6,8	6,0	6,0*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0*
Jamur							
<i>Candida albicans</i>	9,1	7,6	7,6	7,1	7,0	6,0	16**

Keterangan:

* = Amoxicillin 25 µg

** = Nistatin 2.000 IU

Hambatan 6,0 mm = tidak ada aktivitas

Tabel 4.4. Aktivitas antimikroba isolat β -asaron rimpang dringo dengan metode difusi cakram (hambatan dalam mm)

	Konsentrasi isolat dalam mg/mL						standar
	100	50	25	12,5	6,25	3,125	
Bakteri							
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8,0	7,4	7,1	6,9	6,0	6,0	25*
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	8,5	7,6	7,0	6,0	6,0	6,0	40*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11,0	7,8	7,1	6,0	6,0	6,0	20*
<i>Salmonella typhosa</i> ATCC 14028	8,4	7,4	7,0	6,0	6,0	6,0	34,2*
<i>Streptococcus β haemolyticus</i> grup A	9,6	8,4	8,3	7,4	6,0	6,0	6,0*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0*
Jamur							
<i>Candida albicans</i>	7,6	7,0	6,6	6,0	6,0	6,0	16,6**

Keterangan:

* = Amoxicillin 25 μ g

** = Nistatin 2.000 IU

Hambatan 6,0 mm = tidak ada aktivitas



Lampiran 1
Hasil Identifikasi Tanaman *Acorus calamus* Linn.



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 21 Juni 2010

Nomor : 806/IPH.1.02/If.8/VI/2010
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth,
Bpk./Ibu/Sdr(i). Eka Irmawati Achmad
NPM : 0606070661
Mhs. Univ. Indonesia
Fak. MIPA
Kampus UI Depok

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Dringo	<i>Acorus calamus</i> L.	Acoraceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,



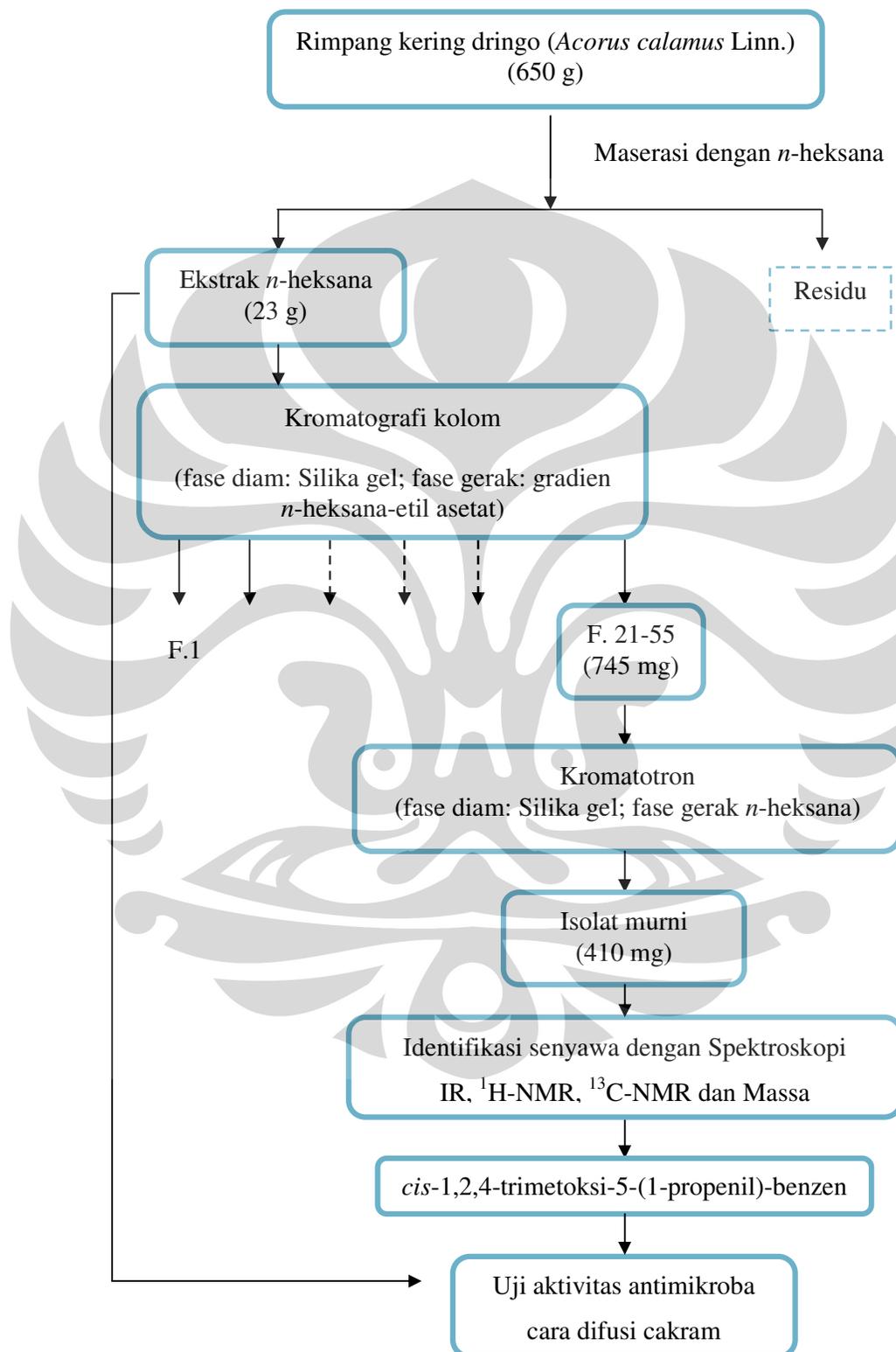
Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
NIP. 195111041975011001

D:\Ident 2010\Eka Irmawati Achmad.doc\JJA-SP

Page 1 of 1

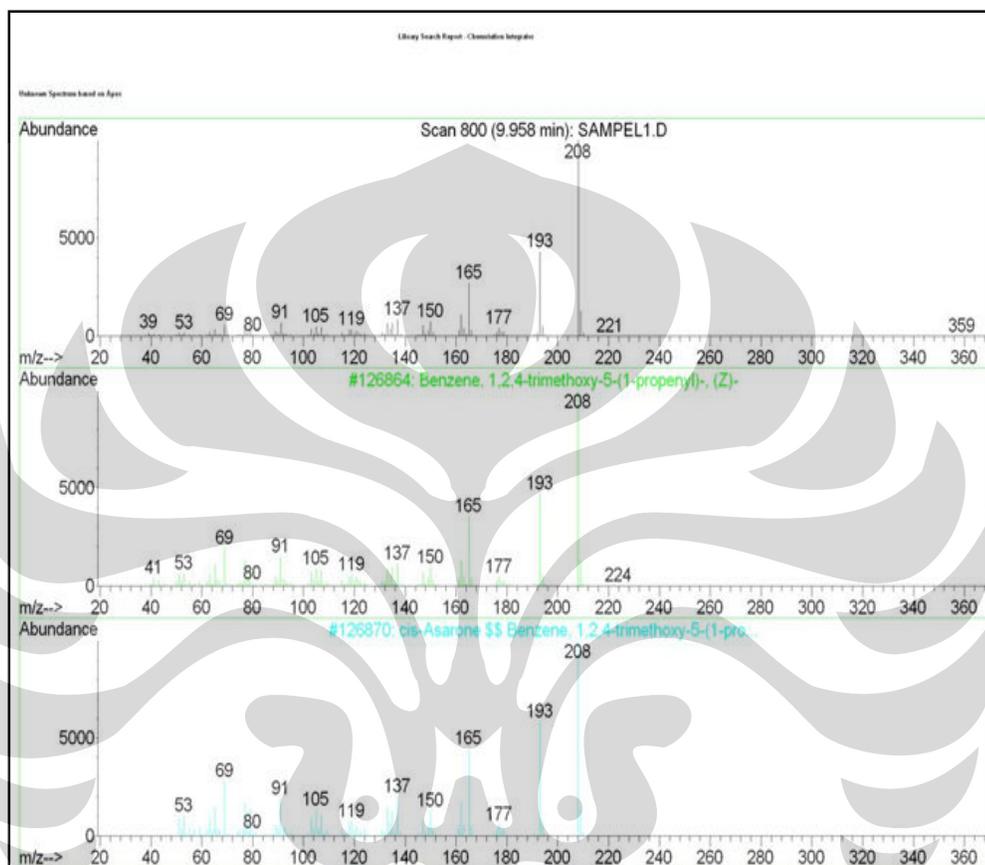
Lampiran 2

Skema Kerja



Lampiran 3

Profil Kesamaan Spektrum Massa Dengan Data *Library*



Lampiran 4

Data Library Spektrum Massa

Library Search Report

Data Path : C:\MSDCHEM\1\data\
 Data File : SAMPEL1.D
 Acq On : 27 May 2010 12:33
 Operator : EKA IRMAWATI ACHMAD
 Sample : BETA ASARON
 Misc : S1 UI
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

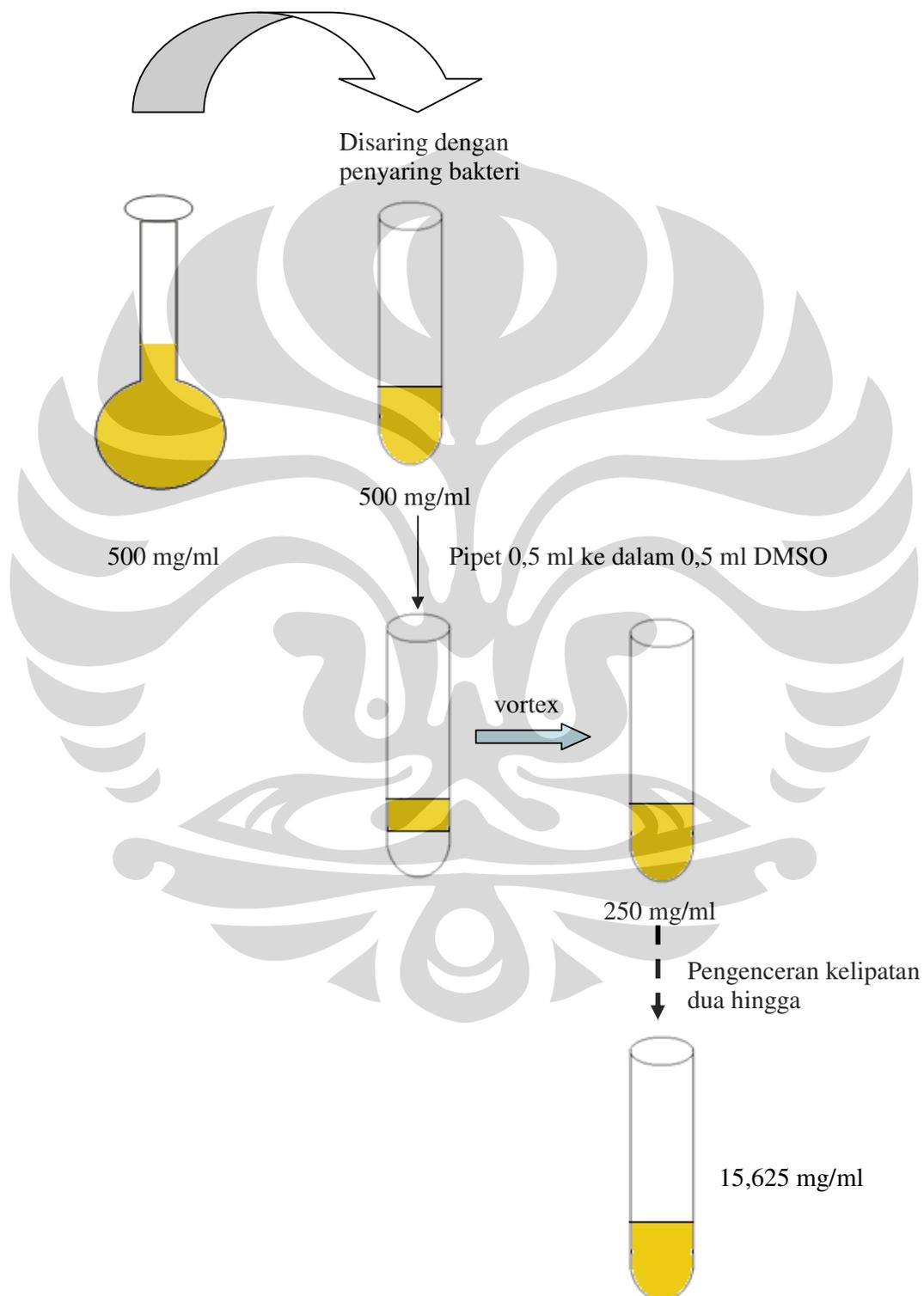
Search Libraries: C:\Database\wiley7n.1 Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - EKARANGER1.E

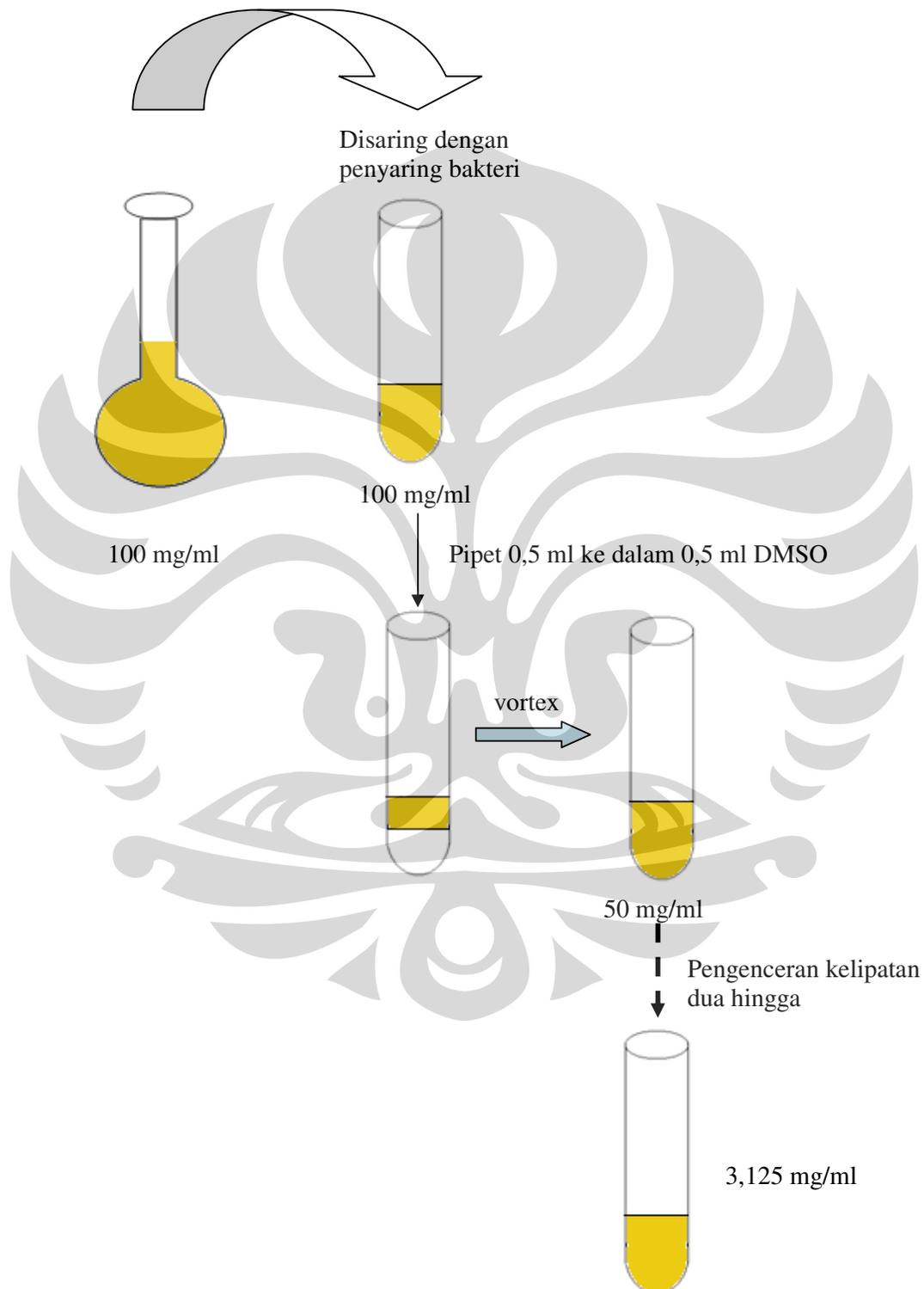
Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	9.96	83.51	C:\Database\wiley7n.1 Benzene, 1,2,4-trimethoxy-5-(1-propenyl)-, (Z)- cis-Asarone \$\$ Benzene, 1,2,4-trimethoxy-5-(1-propenyl)-, (Z)- (CAS) \$\$ cis-.beta.-Asarone \$\$ (Z)-Asarone \$\$.beta.-Asarone \$\$ Benzene, 1,2,4-trimethoxy-5-propenyl-, (Z)- \$\$ cis-Isoasarone \$\$ cis-Isoelemicin \$\$ TRANS-2,4,5-TRIMETHOXYPROPENYLBENZENE \$\$ (Z) Asarone \$\$ 2,4,5-Trimethoxypropenylbenzene \$\$ trans-2,4,5-Trimethoxypropenylbenzene \$\$ Benzene, 1,2,4-trimethoxy-5-(1-propenyl)-, (E)- \$ \$ Benzene, 1,2,4-trimethoxy-5-propenyl-, (E)- \$\$ Asaron \$\$ Asarone, trans- \$\$.alpha.-Asarone \$\$ trans-Asarone \$\$ Asaru	126864	005273-86-9	99
				126870	005273-86-9	97
				126876	002883-98-9	97

DEFAULT.M Thu May 27 21:28:07 2010

Lampiran 5

Bagan Pengenceran Larutan Uji Ekstrak *n*-heksana

Lampiran 6

Bagan Pengenceran Larutan Uji Isolat β -asaron

Lampiran 7

Bagan Pengenceran Inokulum Mikroba Uji

