BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Ekstraksi

Pada penelitian ini, proses ekstraksi diawali dengan penimbangan simplisia semanggi gunung yang menghasilkan total berat simplisia sebanyak 652,410 gram. Simplisia yang sudah ditimbang tersebut dimasukkan dalam wadah atau toples untuk diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% sebagai larutan penyari. Perbandingan simplisia dan larutan penyari yang digunakan adalah 1:5. Total pelarut yang digunakan adalah sebanyak 3,262 liter. Simplisia yang sudah dicampur dengan larutan penyari tersebut diaduk dengan interval 5 menit dalam 1 jam pertama, untuk kemudian direndam selama 24 jam. Kemudian dilakukan proses remaserasi masing-masing sebanyak dua kali. Remaserasi dilakukan dengan menyaring ekstrak yang diperoleh dan menampung filtrat pada wadah berbeda. Kemudian larutan penyari diganti dengan yang baru dan dilakukan perendaman kembali. Dari hasil maserasi yang dilakukan, diperoleh ekstrak cair yang berwarna hijau kehitaman. Ekstrak cair tersebut kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40^0C dengan kecepatan 70 rpm, dan diuapkan sisa pelarut dengan oven suhu 40^0C sehingga diperoleh ekstrak kental berwarna hijau kehitaman. Ekstrak kental yang diperoleh adalah sebanyak 91,041 gram. Persentase rendemen ekstrak dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\%\ Rendemen = \frac{\text{berat ekstrak pekat (gram)}}{\text{berat simplisia (gram)}} \text{ x } 100\% \quad \text{.....(5.1)}$$

$$= \frac{91{,}041\ gram}{652{,}410\ gram}\ x\ 100\%$$

$$= 13{,}955\ \%$$

5.2 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dalam penelitian ini dilakukan terhadap senyawa tanin, flavonoid, saponin, glikosida jantung terpenoid, steroid, glikosida, dan alkaloid. Hasil skrining fitokimia pada ekstrak etanol semanggi gunung dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Semanggi Gunung

No	Kandungan Kimia	Metode Pengujian	Interpretasi	Hasil Skrining	Keterangan
1	Tanin	**Pendahuluan** (Mojab, 2003)**:** +Gelatin +Gelatin dan NaCl **Penegasan** (Mojab, 2003)**:** +$FeCl_3$	Reaksi pendahuluan menunjukkan hasil positif jika terbentuk endapan. Hasil dikonfirmasi dengan $FeCl_3$ dan menunjukkan adanya endapan berwarna biru, biru kehitaman, hijau, atau biru kehijauan bila reaksi positif.	Perubahan warna menjadi biru kehitaman	+
2	Flavonoid	**Bagian pertama** (Ayoola *et al*, 2008): +Amonia dan H_2SO_4 **Bagian kedua** (Ayoola *et al*, 2008): +Larutan Al **Bagian ketiga** (Ayoola *et al*, 2008): +Etil asetat dan amonia	Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna kuning.	Menunjukkan warna kuning	+
3	Glikosida	**Pendahuluan** (Nisar, 2011): +HCl, NaOH **Penegasan** (Nisar, 2011): +Fehling A dan Fehling B	Reaksi positif ditandai dengan endapan merah.	Terbentuk warna hijau dengan endapan merah	+

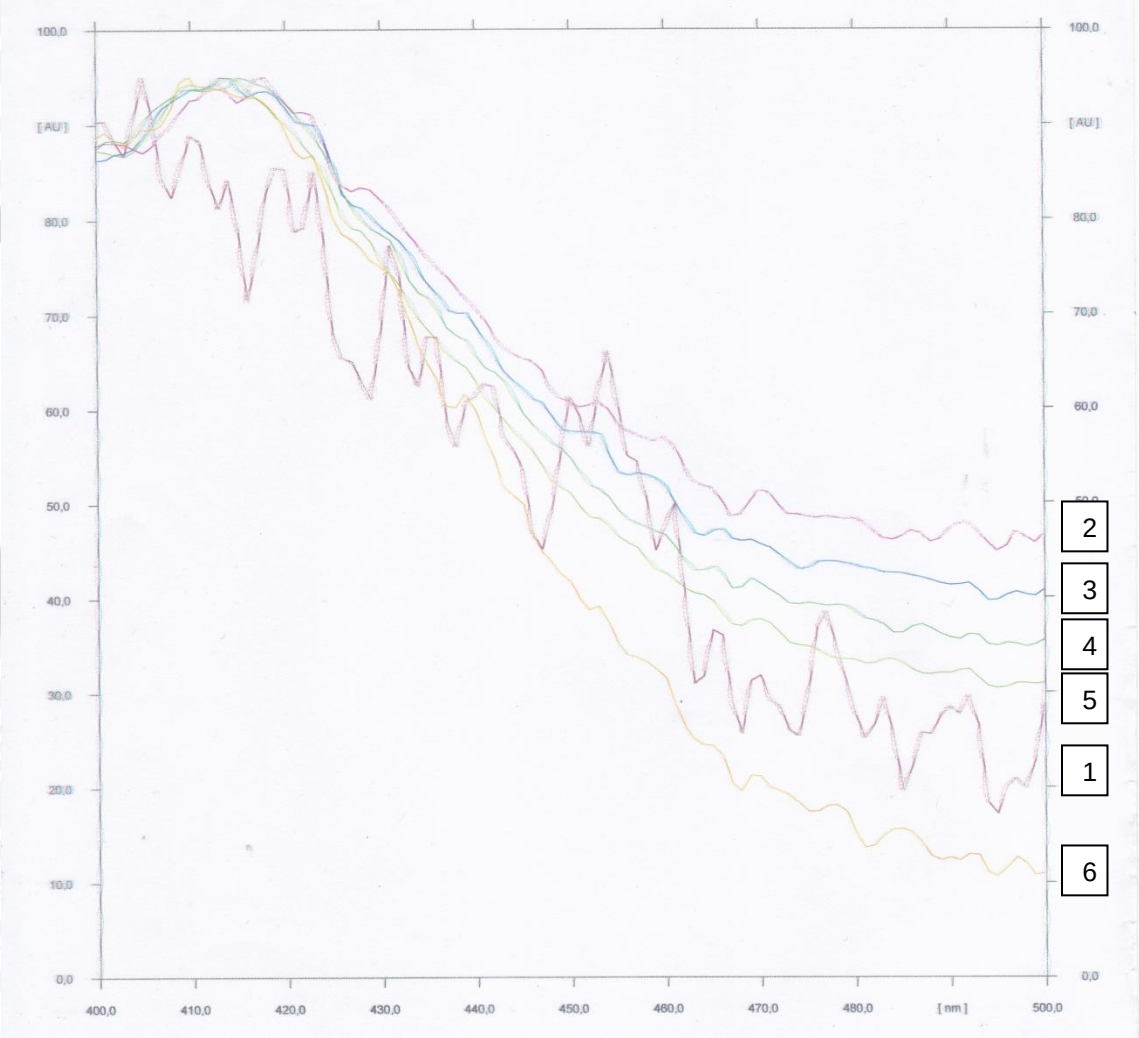
4	Saponin	Pengocokan selama 10 detik (Depkes RI, 1995) dan penambahan minyak zaitun (Prihanto, 2011).	Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm dan dapat membentuk emulsi saat ditambahkan dengan minyak zaitun.	Buih bertahan selama 10 menit dan terbentuk emulsi setelah penambahan minyak zaitun.	+
5	Glikosida Jantung	+Asam asetat glasial, $FeCl_3$, dan H_2SO_4 (Yadav, 2011).	Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin coklat pada permukaan.	Tidak terbentuk cincin cokelat	-
6	Terpenoid	+Kloroform dan H_2SO_4 (Ayoola *et al*, 2008)	Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna coklat kemerahan pada permukaan.	Tidak terbentuk warna cokelat kemerahan	-
7	Steroid	+Asetat anhidrat dan asam sulfat (Uddin, 2011)	Reaksi positif menunjukkan perubahan warna dari ungu ke biru atau hijau.	Warna sampel akhir hijau kecokelatan tetapi tidak mengalami perubahan dari warna ungu	-
8	Alkaloid	**Bagian pertama** (Marliana, 2005): +Mayer **Bagian kedua** (Marliana, 2005): +Wagner **Bagian ketiga** (Marliana, 2005): +Dragendorf	Reaksi positif pada bagian A membentuk endapan putih, bagian B dan C menunjukkan endapan coklat muda sampai kuning.	Menunjukkan warna kuning kecokelatan tanpa membentuk endapan	-

5.3 Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Densitometri

5.3.1 Selektivitas

Pada uji selektivitas dilakukan pengujian terhadap standard asiatikosida, sampel kosong (tanpa dibubuhi standard), serta sampel yang dibubuhi standard. Sampel kosong yang dibuat dalam beberapa konsentrasi ekstrak yaitu 7.000 ppm, 10.000 ppm, 15.000 ppm, dan 20.000 ppm sebagai perbandingan. Hasil uji yang diamati meliputi faktor retensi (Rf), hasil spektrum, serta *match factor.* Untuk hasil faktor retensi (Rf) dapat dilihat pada tabel 5.2. Sementara hasil

spektrum uji selektivitas dapat dilihat pada gambar 5.1. Nilai kemiripan *(match factor)* ditunjukkan dengan nilai "r(s,m)" dan "r(m,e)" dengan s = *start* atau awal, m = *center* atau tengah, dan e = *end* atau akhir (Kristiningrum *et al*, 2013). Dari pengujian ini juga diperoleh panjang gelombang maksimum dari asiatikosida adalah pada 415 nm.



Gambar 5.1. Hasil Spektrum Uji Selektivitas

Keterangan: (1) Spektrum standard, (2) Spektrum sampel konsentrasi 7.000 ppm, (3) Spektrum sampel konsentrasi 10.000 ppm, (4) Spektrum sampel konsentrasi 15.000 ppm, (5) Spektrum sampel konsentrasi 20.000 ppm, (6) Spektrum sampel konsentrasi 10.000 ppm yang dibubuhi standard (*spike*)

Tabel 5.2 Hasil Faktor Retensi dan *Match Factor* Uji Selektivitas

Berkas Uji	Faktor Retensi (Rf)	r(s,m)	r(m,e)
Standard asiatikosida	0,45	0,980	0,965
Sampel 7.000 ppm	0,44	0,994	0,996
Sampel 10.000 ppm	0,45	0,996	0,996
Sampel 15.000 ppm	0,44	0,996	0,994
Sampel 20.000 ppm	0,44	0,998	0,993
Sampel 10.000 ppm + Standard asiatikosida	0,46	0,998	0,997

Pada pengujian ini dibandingkan luas area antara sampel dan standard untuk menentukan rentang dari larutan standard yang digunakan untuk proses validasi. Luas area standard yang diperoleh adalah 339,1 AU (*arbitrary unit*), sementara luas area dari sampel ekstrak dengan konsentrasi ekstrak 10.000 ppm adalah 1718,5 AU. Karena standard asiatikosida yang digunakan memiliki konsentrasi 1.000 ppm, maka untuk memperkirakan konsentrasi asiatikosida ekstrak dapat digunakan perbandingan berikut:

$$\frac{1000\ ppm}{339{,}1} = \frac{x\ ppm}{1718{,}5}$$

$$x = \frac{1000\ ppm\ .1718{,}5}{339{,}1}$$

$$x = 5067{,}8\ ppm\ \approx\ 5000\ \text{ppm}$$

Rentang konsentrasi standard yang digunakan untuk validasi pada penelitian ini adalah 50%, 75%, 100%, 125%, dan 150% dari konsentrasi analit yang diharapkan, sehingga diperoleh lima konsentrasi standard sebagai berikut:

- 50% konsentrasi target:

  $$\frac{50}{100} \times 5000\ ppm = 2.500\ ppm$$

- 75% konsentrasi target:

  $$\frac{75}{100} \times 5000\ ppm = 3.750\ ppm$$

- 100% konsentrasi target:

  $\frac{100}{100} \times 5000\ ppm = 5.000\ ppm$
- 125% konsentrasi target:

  $\frac{125}{100} \times 5000\ ppm = 6.250\ ppm$
- 150% konsentrasi target:

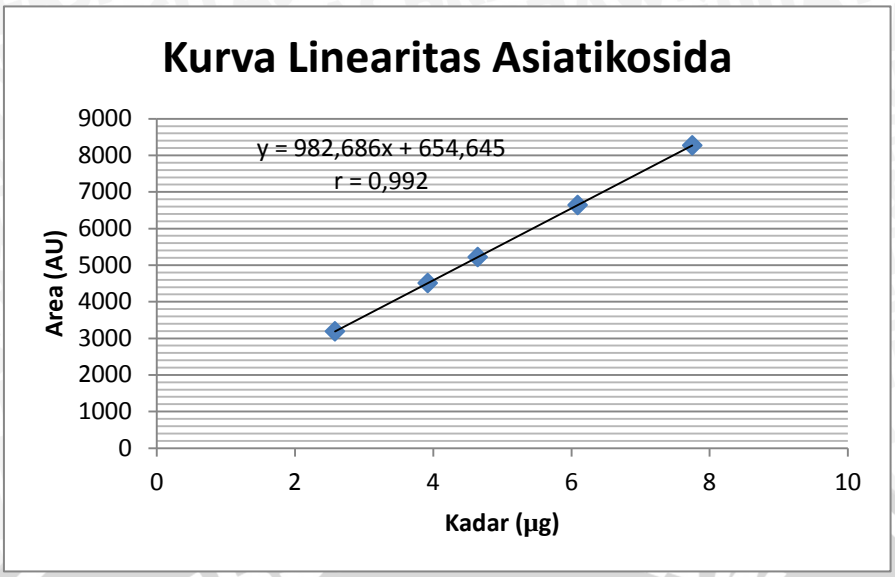
  $\frac{150}{100} \times 5000\ ppm = 7.500\ ppm$

5.3.2 Linearitas dan Rentang

Uji ini dilakukan pada seri larutan standard asiatikosida dengan rentang konsentrasi 2.500 ppm, 3.750 ppm, 5.000 ppm, 6.250 ppm, 7.500 ppm dengan cara menotolkan 2,5 µl, 3,75 µl, 5 µl, 6,25 µl, dan 7,5 µl dari larutan standard 1.000 ppm. Dari hasil uji pada tabel 5.3 didapatkan persamaan regresi linier Y= 982,686x + 654,645 dengan koefisien korelasi (r)= 0,992. Dari koefisien korelasi tersebut dapat ditentukan koefisien determinasinya yaitu sebesar r^2 = 0,984 atau 98,400%.

Tabel 5.3 Hasil Uji Linearitas dan Rentang

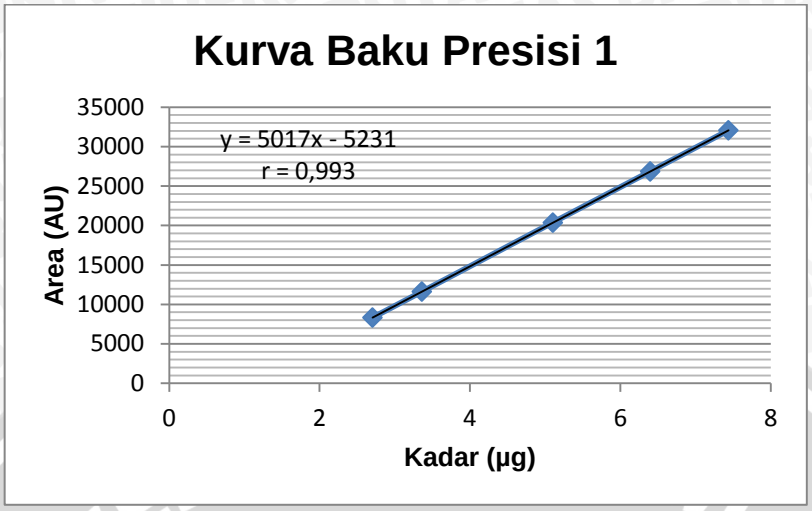
Konsentrasi Larutan Standard (ppm)	Area (AU)	Kadar (µg)
2500	3189,44	2,58
3750	4508,84	3,92
5000	5219,61	4,65
6250	6640,68	6,09
7500	8270,81	7,75



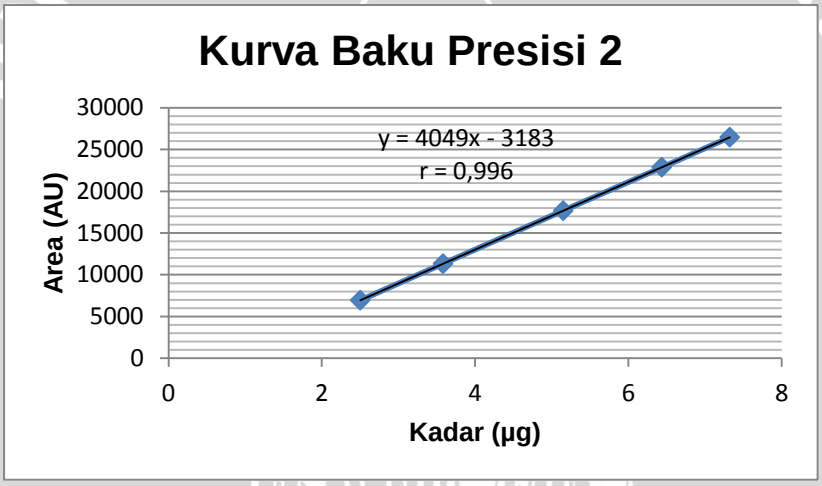
Gambar 5.2. Kurva Baku Linearitas Standard Asiatikosida

5.3.3 Presisi

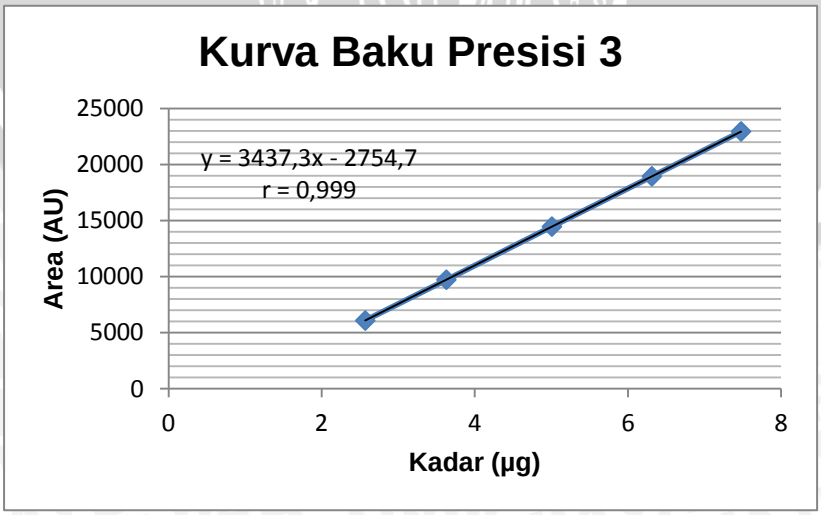
Uji presisi dilakukan terhadap tiga larutan sampel yang berbeda, dimana data untuk pengulangan (*repeatability*) diperoleh dari 6 berkas totolan sampel terpisah yang diaplikasikan pada satu lempeng dalam hari yang sama. Dari keenam berkas sampel tersebut ditentukan kadarnya untuk kemudian dihitung rata-rata kadar dan ditentukan standard deviasi (SD) dan persen koefisien variasi (% KV) (lampiran 4). Penetapan kadar untuk presisi hari pertama menggunakan kurva baku pada gambar 5.3, presisi hari kedua menggunakan kurva baku pada gambar 5.4, sementara presisi hari ketiga menggunakan kurva baku pada gambar 5.5. Data untuk presisi antara (*intermediate precision*) diperoleh dari tiga lempeng (dengan masing-masing lempeng terdapat 6 berkas totolan) yang diambil pada 3 hari yang berbeda. Rata-rata kadar sampel dari tiga hari yang berbeda ditentukan standard deviasi (SD) dan persen koefisien variasi (%KV). Koefisien variasi yang dapat diterima berdasarkan ICH Q2(R1) yaitu tidak lebih dari 15 %. Hasil uji presisi dapat dilihat pada tabel 5.4.



Gambar 5.3. Kurva Baku Presisi Hari 1



Gambar 5.4. Kurva Baku Presisi Hari 2



Gambar 5.5. Kurva Baku Presisi Hari 3

Tabel 5.4 Hasil Uji Presisi

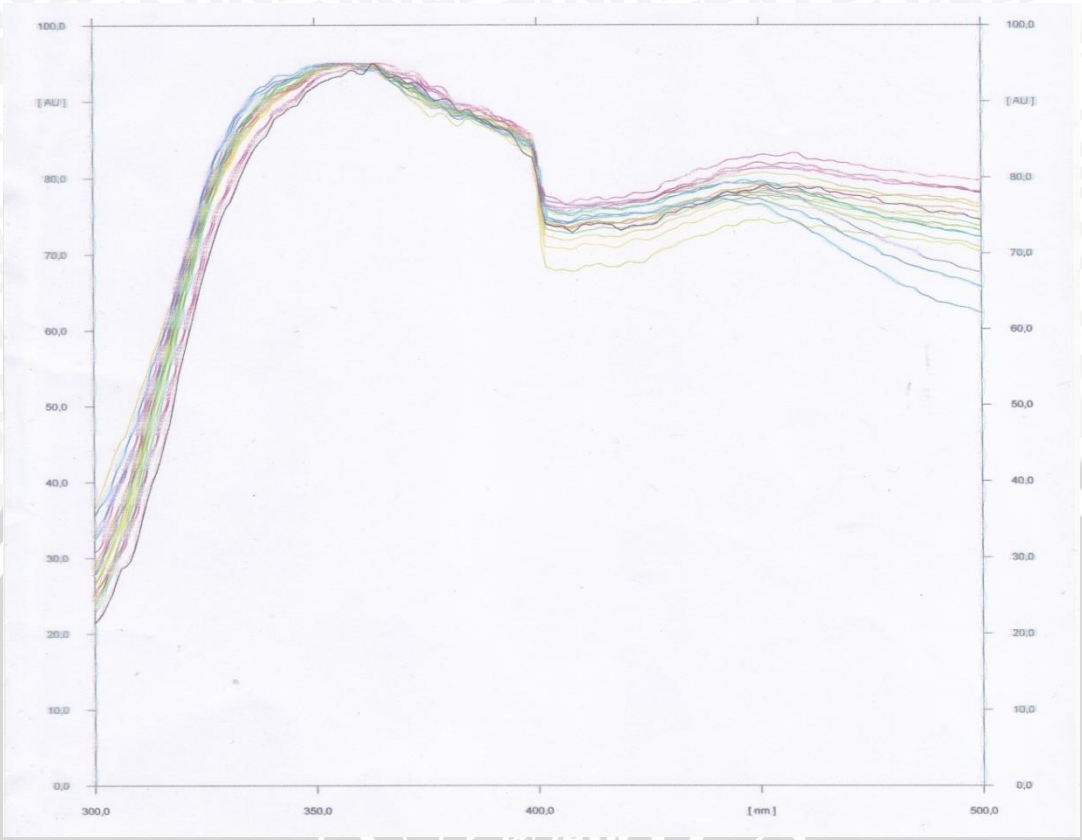
	Pengulangan (*Repeatability)*			Presisi antara (*Intermediate Precision*)		
	Kadar (µg)			Kadar (µg)		
	Hari I	Hari II	Hari III	Hari I	Hari II	Hari III
	4,039	4,061	4,011	4,084	4,040	3,956
	4,149	4,026	3,957			
	4,097	4,096	3,933			
	4,050	4,008	4,019			
	4,021	3,978	3,997			
	4,145	4,071	3,817			
Rata-rata	**4,084**	**4,040**	**3,956**	**4,027**		
SD	**0,055**	**0,044**	**0,076**	**0,065**		
%KV	**1,353**	**1,085**	**1,909**	**1,615**		

5.3.4 Spesifisitas

Uji spesifisitas dilakukan dengan membubuhkan standard ke dalam sampel ekstrak dengan konsentrasi yang berbeda. Hasil yang diharapkan yaitu tidak terdapat bukti munculnya (bentuk puncak) senyawa lain yang dilihat dari kemurnian puncak (*peak purity*). Uji spesifisitas pada penelitian ini menunjukkan nilai kemurnian (*purity*) yang baik (Tabel 5.5). Pada pengujian spesifisitas ini juga dapat dilihat bahwa hasil spektrum dari seluruh berkas uji menunjukkan kemiripan yang baik (Gambar 5.6).

Tabel 5.5. Hasil Uji Sepesifisitas

Berkas Uji	Retention Factor (Rf)	Purity
1	0,35	OK
2	0,35	OK
3	0,36	OK
4	0,40	OK
5	0,39	OK
6	0,39	OK
7	0,40	OK
8	0,39	OK
9	0,40	OK



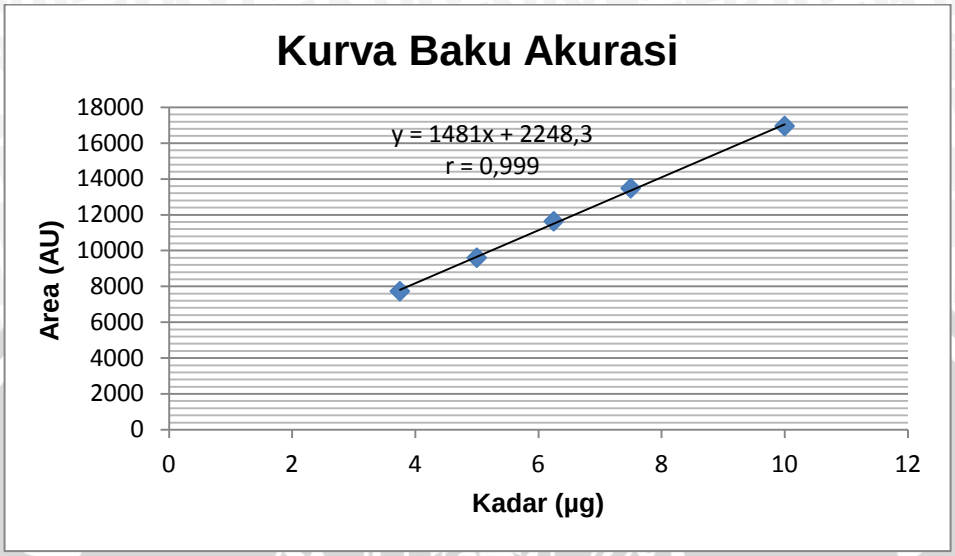
Gambar 5.6 Hasil Spektrum Uji Spesifisitas

Keterangan: Spektrum terdiri atas 10 spektrum berkas standard dan 9 spektrum dari berkas uji spesifisitas.

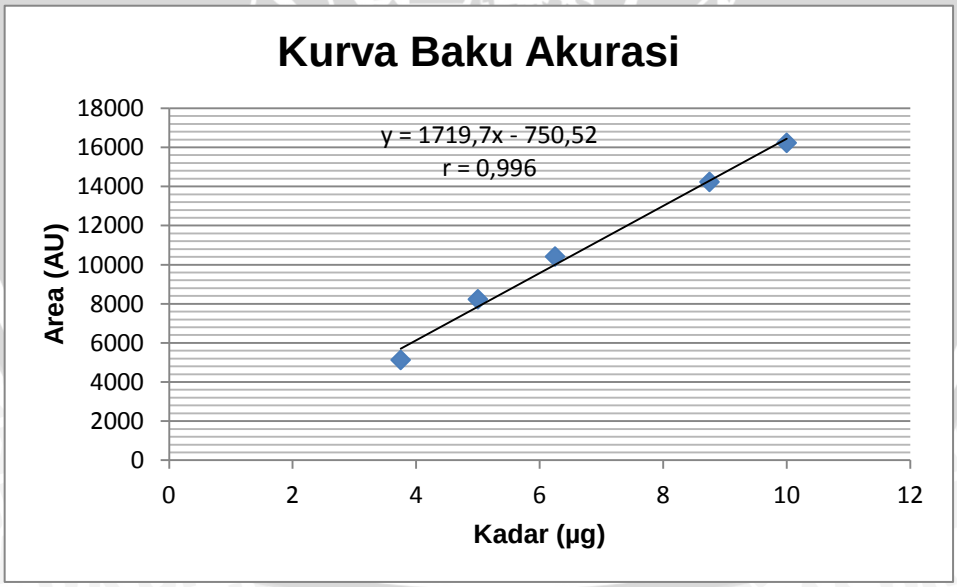
5.3.5 Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan membubuhkan (*spiked*) tiga konsentrasi standard yang berbeda (3.750 ppm, 5.000 ppm, 6.250 ppm) ke dalam masing-masing sampel dan dibuat tiga kali replikasi. Syarat yang dapat diterima untuk uji akurasi berdasarkan ICH Q2(R1) yaitu hasil nilai persen *recovery* adalah 100±20% (Huber, 2007). Perhitungan kadar untuk pengujian akurasi ini dapat dilihat pada lampiran 5. Hasil uji akurasi pada penelitian ini (Tabel 5.6) telah memenuhi syarat penerimaan. Pada gambar 5.7 menunjukkan kurva baku penetapan kadar untuk uji akurasi pada penambahan standard 3750 ppm dan

6250 ppm, sementara pada gambar 5.8 menunjukkan kurva baku untuk penentuan kadar pada uji akurasi.



Gambar 5.7. Kurva Baku untuk Uji Akurasi pada Penambahan Standard 3750 ppm dan 6250 ppm



Gambar 5.8. Kurva Baku untuk Uji Akurasi pada Penambahan Standard 5000 ppm

Tabel 5.6 Hasil Uji Akurasi

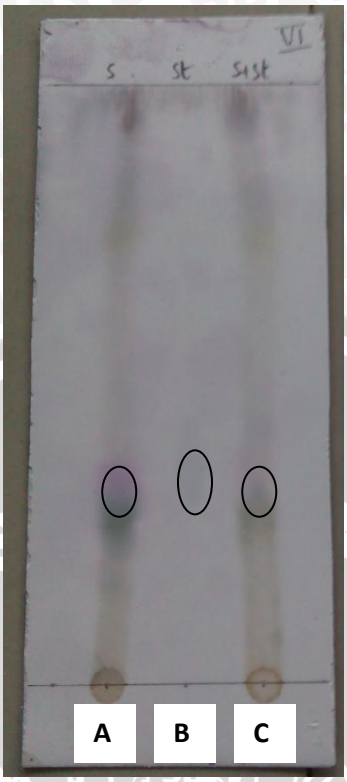
Penambahan Standard	Replikasi	Area	Kadar (µg)	% Recovery	Rata-rata %Recovery	SD
3750 ppm	1	14489,930	8,266	104,293	**107,591**	**2,863**
	2	14754,040	8,444	109,040		
	3	14776,250	8,459	109,440		
5000 ppm	1	14419,760	8,821	94,400	**92,980**	**1,947**
	2	14105,920	8,639	90,760		
	3	14365,280	8,790	93,780		
6250 ppm	1	17702,430	10,430	97,200	**90,496**	**6,861**
	2	17108,030	10,030	90,800		
	3	16426,360	9,573	83,488		

5.4 Uji Kualitatif Senyawa Asiatikosida

Uji kualitatif dilakukan dengan penotolan sampel ekstrak semanggi gunung dan standard asiatikosida di atas lempeng KLT. Penotolan dilakukan masing-masing sebanyak 2 µl untuk standard dan sampel. Sampel yang dibubuhi dengan standard juga ditotolkan untuk membandingkan faktor retensi (Rf) yang dihasilkan oleh sampel dan standard. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 5.9.

Tabel 5.7. Hasil *Retention Factor* (Rf) Uji Kualitatif

Berkas Uji	Retention Factor (Rf)
Sampel	0,34
Standard Asiatikosida	0,35
Standard Asiatikosida + sampel	0,34



Gambar 5.9. Hasil Uji Kualitatif Senyawa Asiatikosida
Keterangan: (A) Sampel, (B) Standard, (C) Sampel yang dibubuhi standard

Dari hasil uji kualitatif tampak noda asiatikosida yang berwarna ungu kebiruan pada sampel dan standard. Dari noda yang terbentuk kemudian dihitung faktor retensinya berdasarkan rumus 5.2 berikut:

$$Rf = \frac{jarak\ tempuh\ senyawa\ uji\ dari\ titik\ asal}{jarak\ tempuh\ pelarut\ dari\ titik\ asal} \quad \text{.....(5.2)}$$

- Rf Sampel

  $Rf = \frac{2,7}{8} = 0,34$

- Rf Standard

  $Rf = \frac{2,8}{8} = 0,35$

- Rf Sampel yang dibubuhi standard

  $Rf = \frac{2,7}{8} = 0,34$

Berdasarkan uji kualitatif senyawa asiatikosida diketahui nilai faktor retensi (Rf) dari sampel adalah 0,34 dan Rf standard adalah 0,35. Sementara nilai Rf untuk sampel yang dibubuhi dengan standard adalah 0,34. Hasil tersebut menunjukkan bahwa secara kualitatif senyawa asiatikosida terdapat dalam ektrak etanol 70% semanggi gunung.

5.5 Uji Kuantitatif Senyawa Asiatikosida

Pada penetapan kadar senyawa asiatikosida dilakukan dengan menotolkan lima konsentrasi larutan standard sebagai kurva baku serta penotolan sampel dengan replikasi sebanyak tiga kali. Sampel yang ditotolkan kemudian ditentukan kadar asiatikosida dan dihitung persen kadarnya (Lampiran 6). Hasil uji kuantitatif senyawa asiatikosida dapat dilihat pada tabel 5.8.

Tabel 5.8 Hasil Uji Kuantitatif Senyawa Asiatikosida

	Kadar (μg)	Luas Area	% Kadar
	4,061	13257,920	9,986
	4,026	13114,410	9,900
	4,096	13397,550	10,072
Rata-rata ± SD	**4,061 ± 0,035**		**9,986 ± 0,086**

Kadar asiatikosida yang diperoleh pada replikasi pertama yaitu 4,061 μg, pada replikasi kedua 4,026 μg, dan pada replikasi ketiga diperoleh kadar 4,096 μg. Persen kadar asiatikosida rata-rata dari ketiga replikasi yang diperoleh adalah 9,986%. Persentase kadar ini menunjukkan bahwa terdapat kandungan asiatikosida sebesar 9,986% dari ekstrak etanol 70% semanggi gunung.

Dari persentase kadar yang diperoleh tersebut, dapat diketahui berapa jumlah ekstrak yang harus ditimbang untuk memperoleh kandungan asiatikosida dengan jumlah tertentu seperti pada perhitungan berikut:

- Jumlah asiatikosida yang diinginkan adalah 5 mg, maka jumlah ekstrak yang harus ditimbang adalah:

$$\frac{9{,}986}{100}\ x\ Ekstrak = 5\ mg$$

$$Ekstrak = \frac{5\ x\ 100}{9{,}986}$$

$$= 50{,}07\ mg$$

- Jumlah asiatikosida yang diinginkan adalah 10 mg, maka jumlah ekstrak yang harus ditimbang adalah:

$$\frac{9{,}986}{100}\ x\ Ekstrak = 10\ mg$$

$$Ekstrak = \frac{10\ x\ 100}{9{,}986}$$

$$= 100{,}14\ mg$$

- Jumlah asiatikosida yang diinginkan adalah 20 mg, maka jumlah ekstrak yang harus ditimbang adalah:

$$\frac{9{,}986}{100}\ x\ Ekstrak = 20\ mg$$

$$Ekstrak = \frac{20\ x\ 100}{9{,}986}$$

$$= 200{,}28\ mg$$