

BAB 4**METODE PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan menetapkan kadar asiatikosida dari ekstrak semanggi gunung menggunakan penyari etanol 70% menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Densitometri, dimana peneliti tidak melakukan intervensi terhadap sampel yang diamati.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah ekstrak dari herba semanggi gunung. Ekstraksi dilakukan dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**4.3.1 Lokasi Penelitian**

- a. Ekstraksi, skrining fitokimia, serta optimasi eluen dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- b. Proses penetapan kadar dilakukan di Unit Layanan Pengujian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dari September 2014 sampai Mei 2015.

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1 Bahan

- a. Bahan untuk melakukan maserasi

Simplisia semanggi gunung (Unit Pelaksana Teknis Materia Medica, Batu), etanol 70%.

- b. Bahan untuk skrining fitokimia

Natrium klorida (NaCl), 1% larutan gelatin, FeCl_3 , amonia, H_2SO_4 , aluminum iodida, etil asetat, minyak zaitun, etanol 70%, *Fehling A* dan *Fehling B*, NaOH, asetat anhidrat, asam sulfur, kloroform, *mayer*, *dragendorf*, *wagner*, asam asetat glasial.

- c. Bahan untuk uji kualitatif dan kuantitatif asiatikosida

Fase gerak yang terdiri atas perbandingan eluen kloroform: metanol: asam asetat glasial (22: 8: 4), reagen anisaldehyd asam sulfat (anisaldehid 0,5 ml, asam asetat glasial 10 ml, metanol 85 ml, asam sulfur 5 ml), gas nitrogen, standard asiatikosida (Sigma-Aldrich).

4.4.2 Alat

- a. Alat untuk maserasi

Wadah maserasi, batang pengaduk, corong, kertas saring, timbangan digital, cawan porselen, *rotary evaporator*, *oven*.

- b. Alat untuk skrining fitokimia

Gelas ukur, gelas beaker, corong, tabung reaksi, pipet tetes.

- c. Alat untuk uji kualitatif dan kuantitatif asiatikosida

Chamber, plat/lempeng silika gel (Merck), *sprayer*, *oven*, gelas ukur, gelas beaker, pinset, labu ukur, pipet kapiler, mikropipet, densitometer, timbangan mikrogram, *ependorf*.

4.5 Definisi Operasional

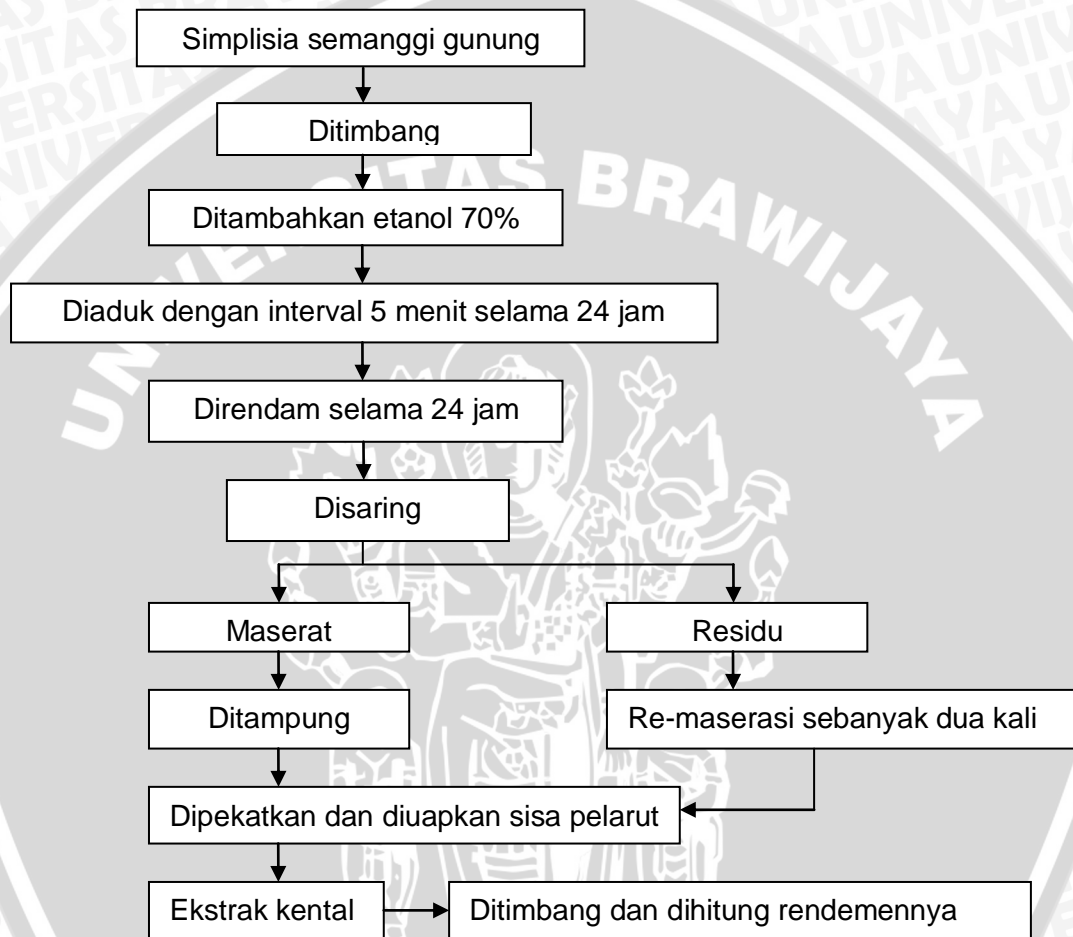
- a. Ekstrak etanol 70% semanggi gunung merupakan ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi simplisia herba semanggi gunung dengan pelarut 70% menggunakan metode maserasi dan diuapkan sisa pelarutnya.
- b. Penetapan kadar adalah suatu uji kuantitatif untuk menetapkan jumlah dari suatu komponen yang ada di dalam sampel (Larson, 2008).
- c. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Densitometri adalah metode untuk mengidentifikasi senyawa target pada lempeng KLT. Metode ini dapat memisahkan dan kemudian mengukur secara langsung spektrum absorpsi senyawa target (Cazes, 2004).
- d. Skrining fitokimia merupakan suatu pengujian yang dilakukan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa fitokimia yang diperkirakan terdapat pada ekstrak meliputi tanin, flavonoid, saponin, glikosida, steroid, terpenoid, alkaloid, glikosida jantung (Bhandary *et al*, 2012).
- e. Validasi metode adalah pengujian untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerja dari suatu metode cukup mampu untuk mengatasi masalah analisis. Berdasarkan *guideline* ICH, parameter yang harus dilakukan untuk penetapan kadar atau kuantifikasi kandungan utama meliputi akurasi, presisi, spesifisitas, linearitas, dan rentang (Huber, 2007).

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Pembuatan Ekstrak Semanggi Gunung

Untuk proses pembuatan ekstrak (Gambar 4.1), dilakukan penimbangan simplisia dan ditambahkan etanol 70 % sebagai penyari dengan perbandingan 1:5. Kemudian dilakukan pengadukan dengan interval 5 menit dalam 1 jam pertama, untuk kemudian dilakukan perendaman selama 24 jam (Mulyono,

2013). Ekstrak yang diperoleh kemudian disaring. Maserat dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C dengan kecepatan 70 rpm, dan diuapkan sisa pelarut dengan oven suhu 40°C. Residu yang diperoleh dilakukan re-maserasi sebanyak 2 kali (Rahayu, 2014).



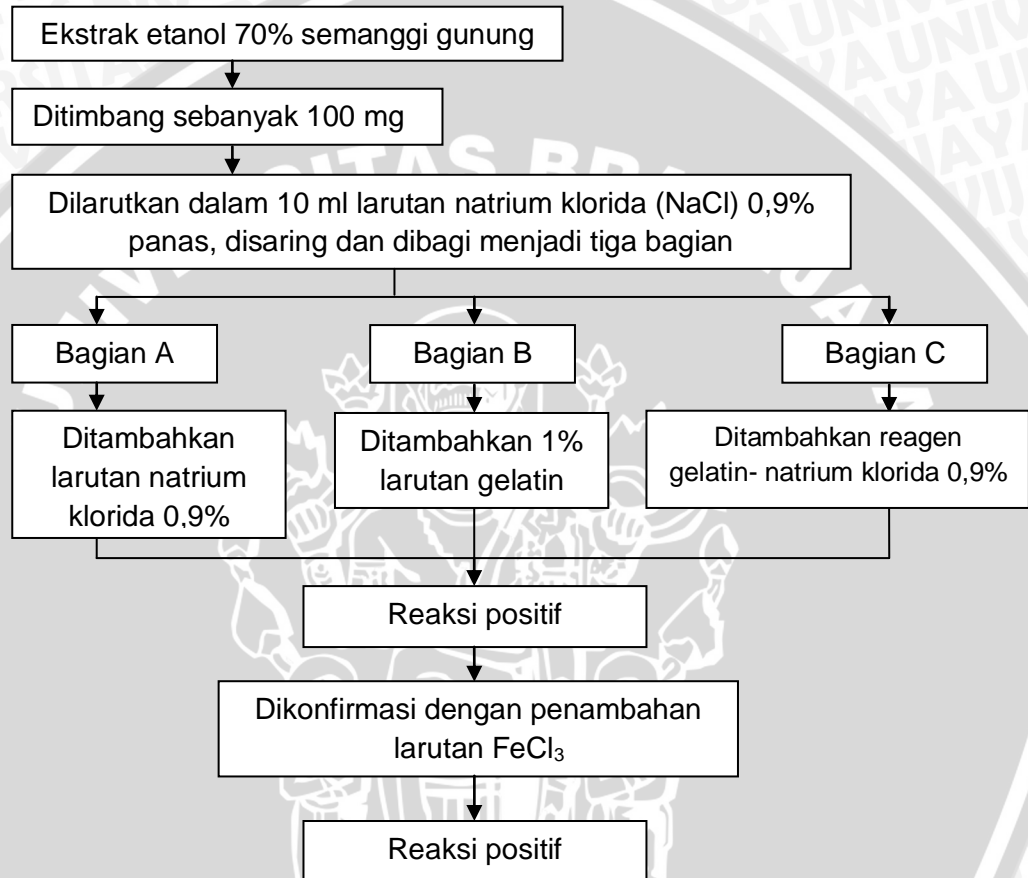
Gambar 4.1. Prosedur Pembuatan Ekstrak Semanggi Gunung

4.6.2 Skrining Fitokimia

4.6.2.1 Tanin

Untuk pengujian tanin (Gambar 4.2), ekstrak etanol 70% semanggi gunung ditimbang sebanyak 100 mg untuk kemudian dilarutkan dalam 10 ml larutan natrium klorida (NaCl) 0,9% panas, disaring dan dibagi menjadi tiga bagian. Bagian A ditambahkan dengan larutan natrium klorida, bagian B

ditambahkan dengan 1% larutan gelatin, bagian C ditambahkan reagen gelatin-garam. Reaksi positif yang menunjukkan adanya endapan dikonfirmasi hasilnya dengan menambahkan FeCl_3 . Ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna biru, biru kehitaman, hijau, atau biru kehijauan (Mojab, 2003).

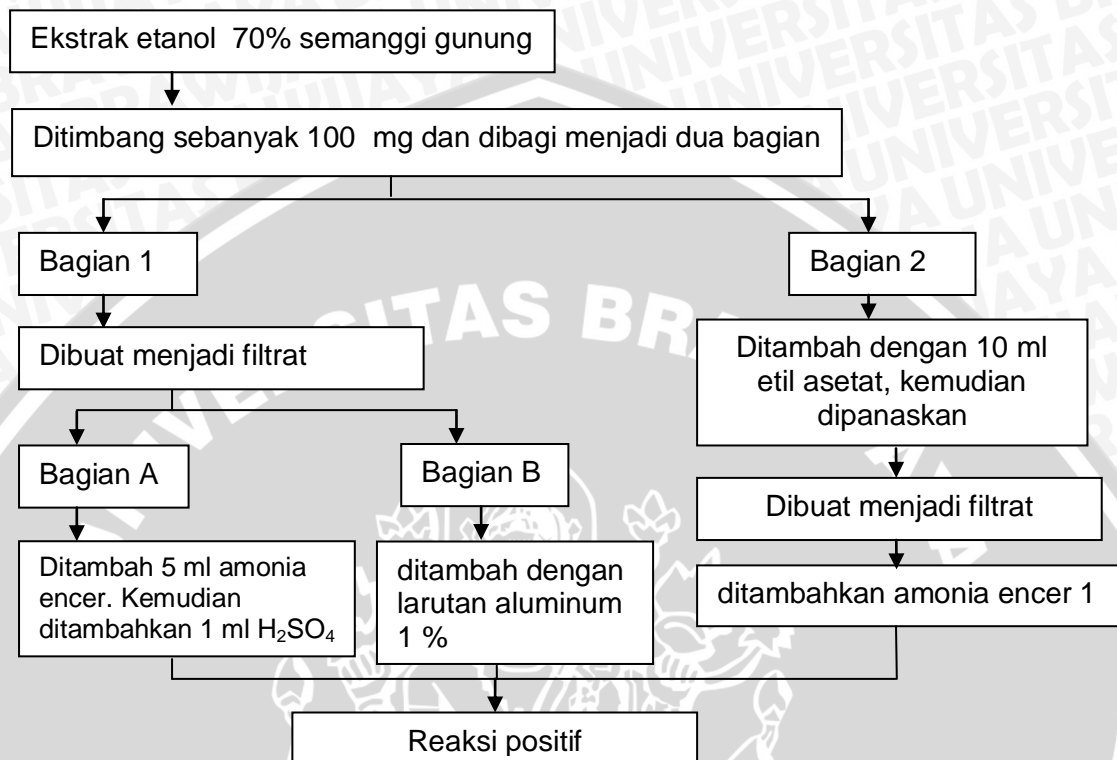


Gambar 4.2. Prosedur Skrining Tanin

4.6.2.2 Flavonoid

Pada pengujian flavonoid (Gambar 4.3), ekstrak semanggi gunung ditimbang sebanyak 100 mg dan dibagi menjadi dua bagian. Bagian 1 dibuat menjadi filtrat dan dibagi menjadi dua bagian A dan B. Bagian A ditambahkan 5 ml amonia encer. Kemudian ditambahkan 1 ml H_2SO_4 . Bagian B ditambah dengan larutan aluminum 1 %. Bagian 2 Ditambah dengan 10 ml etil asetat, kemudian dipanaskan di atas water bath, dibuat menjadi filtrat, dan ditambahkan amonia

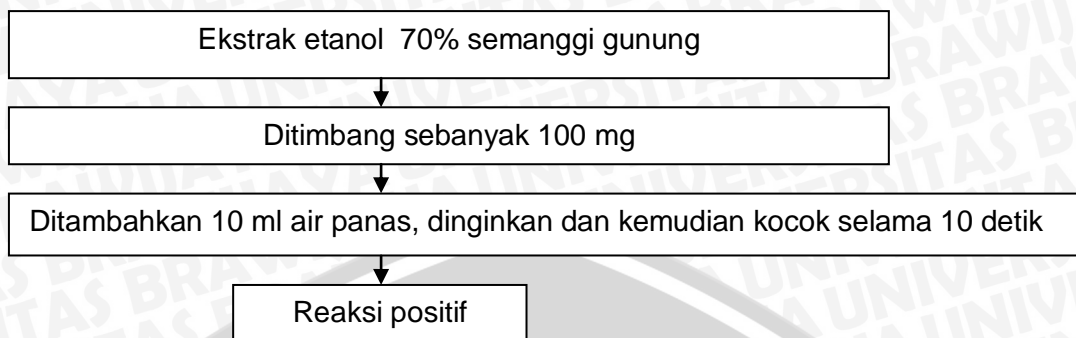
encer. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna kuning (Ayoola *et al*, 2008).



Gambar 4.3. Prosedur Skrining Flavonoid

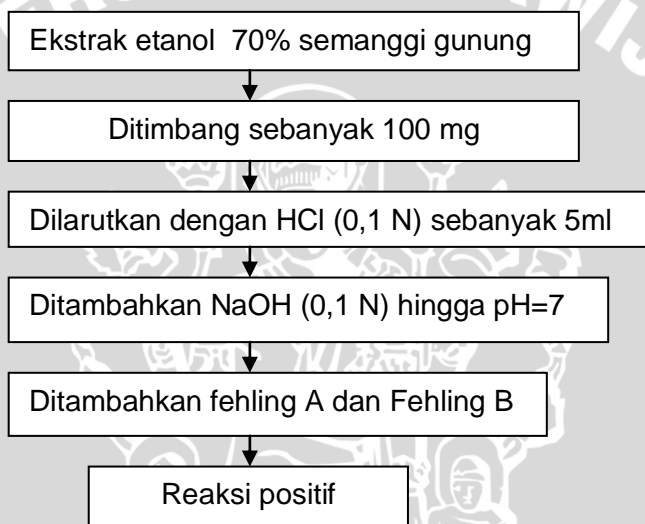
4.6.2.3 Saponin

Pada pengujian saponin (Gambar 4.4), ekstrak semanggi gunung ditimbang sebanyak 100 mg, ditambah air panas, didinginkan dan dikocok selama 10 detik. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm (Depkes RI, 1995). Selain itu, dapat membentuk emulsi saat ditambahkan dengan minyak zaitun (Prihanto, 2011).



Gambar 4.4. Prosedur Skrining Saponin

4.6.2.4 Glikosida



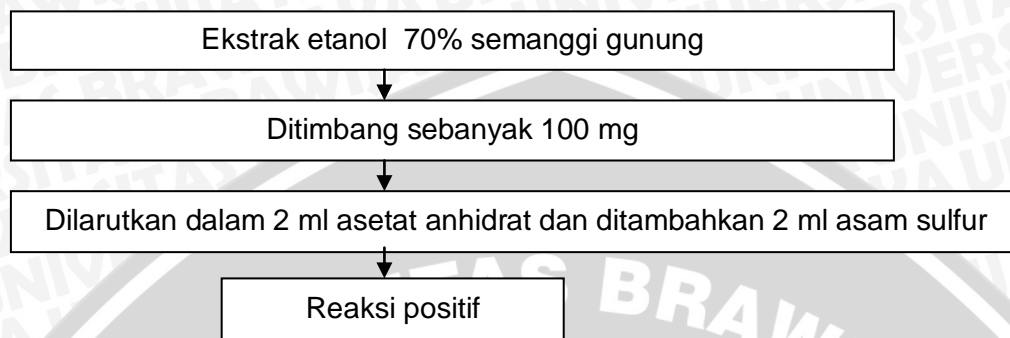
Gambar 4.5. Prosedur Skrining Glikosida

Pada pengujian glikosida (Gambar 4.5), ekstrak semanggi gunung ditimbang sebanyak 100 mg. Kemudian dilakukan penambahan HCl (0,1 N) sebanyak 5ml, selanjutnya ditambahkan NaOH (0,1 N) hingga pH=7. Ditambah *Fehling A* dan *Fehling B*. Reaksi positif ditandai dengan endapan merah (Nisar, 2011).

4.6.2.5 Steroid

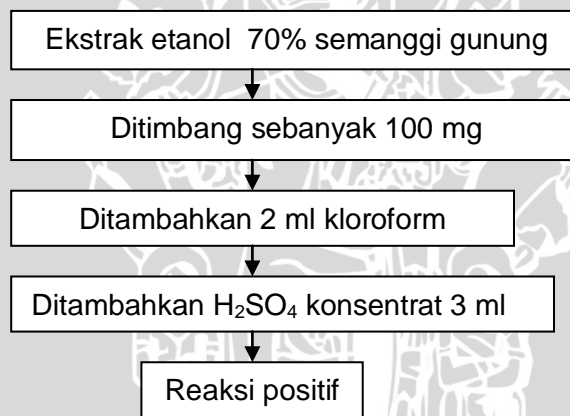
Pada pengujian steroid (Gambar 4.6), ekstrak semanggi gunung ditimbang sebanyak 100 mg. Kemudian dilarutkan dalam 2 ml asetat anhidrat

dan ditambahkan 2 ml asam sulfur. Reaksi positif menunjukkan perubahan warna dari ungu ke biru atau hijau (Uddin, 2011).



Gambar 4.6. Prosedur Skrining Steroid

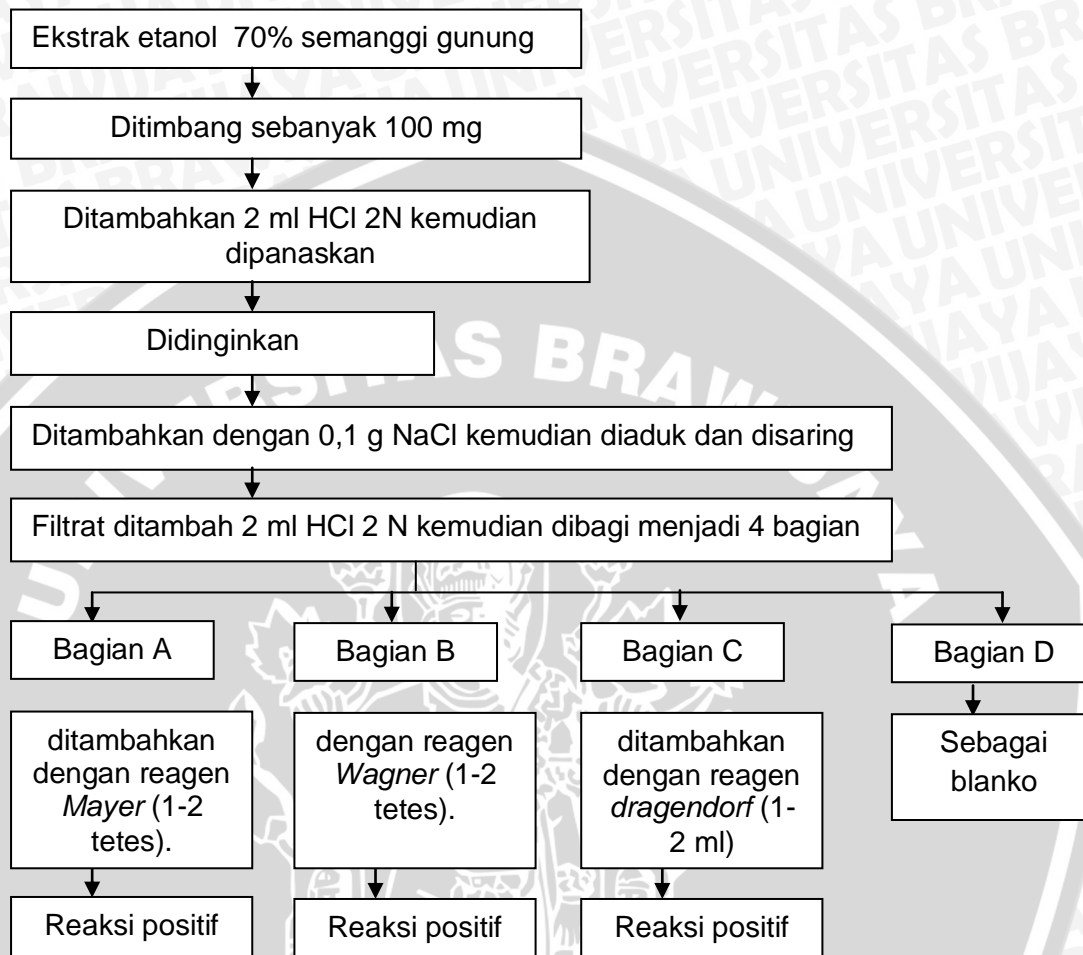
4.6.2.6 Terpenoid



Gambar 4.7. Prosedur Skrining Terpenoid

Pada pengujian terpenoid (Gambar 4.7), ekstrak semanggi gunung ditimbang sebanyak 100 mg dan kemudian ditambahkan 2 ml kloroform. Selanjutnya ditambahkan H₂SO₄ konsentrat 3 ml. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna coklat kemerahan pada permukaan (Ayoola *et al*, 2008).

4.6.2.7 Alkaloid

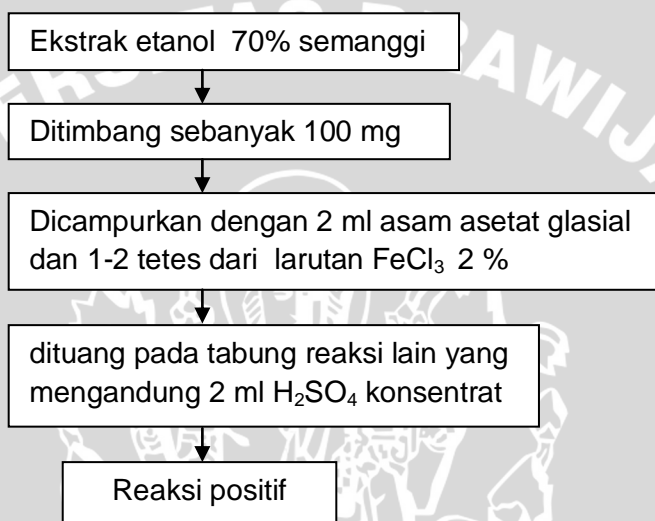


Gambar 4.8. Prosedur Skrining Alkaloid

Pada pengujian alkaloid (Gambar 4.8), ekstrak semanggi gunung ditimbang sebanyak 100 mg. Ditambahkan 2 ml HCl 2N kemudian dipanaskan di atas *water bath* 2-3 menit sambil diaduk kemudian didinginkan. Ditambahkan dengan 0,1 g NaCl kemudian diaduk dan disaring. Filtrat ditambah 2 ml HCl 2 N kemudian dibagi menjadi 4 bagian. Reaksi positif pada bagian A akan membentuk endapan putih. Reaksi positif pada bagian B akan menunjukkan terbentuknya endapan coklat. Reaksi positif pada bagian C menunjukkan endapan kuning atau jingga (Marliana, 2005).

4.6.2.8 Glikosida Jantung

Pada pengujian glikosida jantung (Gambar 4.9), ekstrak semanggi gunung ditimbang sebanyak 100 mg. Kemudian dicampurkan dengan 2 ml asam asetat glasial dan 1-2 tetes dari larutan FeCl_3 2%. Selanjutnya dituang pada tabung reaksi lain yang mengandung 2 ml H_2SO_4 konsentrasi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin coklat pada permukaan (Yadav, 2011).



Gambar 4.9. Prosedur Skrining Glikosida Jantung

4.6.3 Validasi Metode

4.6.3.1 Preparasi Larutan Standard

Standard asiatikosida dicampurkan dengan metanol 1 ml, kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex*. Larutan standard yang sudah homogen kemudian dibagi menjadi 5 bagian ke dalam *ependorf* yang sudah ditimbang berat kosongnya menggunakan timbangan mikrogram. Metanol dalam *ependorf* diuapkan menggunakan gas nitrogen, sehingga hanya tertinggal serbuk asiatikosida dalam *ependorf*. Berat akhir *ependorf* kemudian ditimbang kembali, dan dihitung berat asiatikosida dalam *ependorf*. Untuk proses validasi,

diambil salah satu eppendorf dan kemudian asiatikosida dilarutkan dengan metanol untuk membuat konsentrasi larutan standard sebesar 1.000 ppm.

4.6.3.2 Penentuan Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Baku

Dibuat sampel ekstrak 30 mg dan dilarutkan dalam 3 ml etanol 70%, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 2 μ l. Larutan standard asiatikosida 1000 ppm ditotolkan sebanyak 2 μ l pada lempeng KLT. Kemudian dilakukan eluasi dengan fase gerak kloroform: metanol: asam asetat glasial (22: 8: 4). Plat KLT kemudian diupkan di lemari asam dan dipanaskan dengan oven pada suhu 100^oC selama 10 menit. Kemudian disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat (anisaldehid 0,5 ml, asam asetat glasial 10 ml, metanol 85 ml, asam sulfur 5 ml), dipanaskan dengan oven pada suhu 95^oC selama 10 menit. Dilakukan pengamatan dengan KLT-densitometri untuk menentukan panjang gelombang asiatikosida, kemudian ditentukan luas area dan perkiraan jumlah kandungan asiatikosida yang diperoleh. Dari hasil tersebut dapat ditentukan rentang untuk pembuatan seri larutan standard yaitu 50, 75, 100, 125, dan 150% dari konsentrasi analit yang diharapkan.

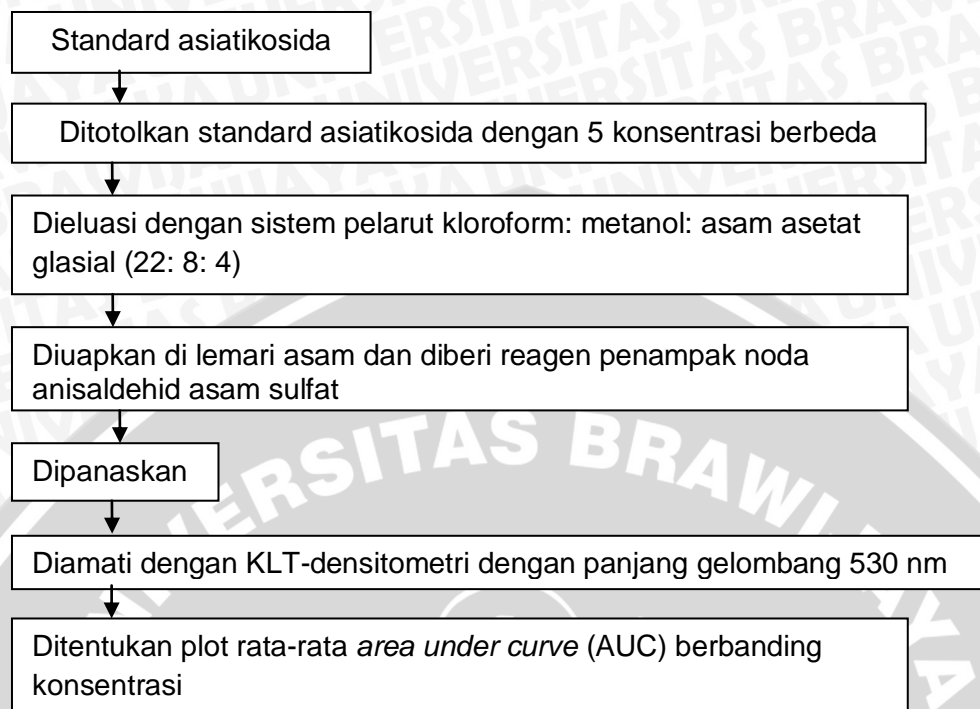
4.6.3.3 Selektivitas

Dibuat sampel yang terdiri atas beberapa konsentrasi ekstrak, antara lain 7.000 ppm, 10.000 ppm, 15.000 ppm, 20.000 ppm. Ekstrak kemudian ditotolkan pada plat KLT masing-masing sebanyak 2 μ l. Pada berkas yang berbeda, larutan standard asiatikosida 1.000 ppm ditotolkan sebanyak 2 μ l pada lempeng KLT. Kemudian pada berkas yang berbeda, sampel ekstrak (10.000 ppm) ditotolkan pada plat KLT sebanyak 2 μ l, dan dibubuhkan larutan standard asiatikosida 1000 ppm dengan menotolkan pada berkas tersebut sebanyak 2 μ l (Hilmi, 2013).

Kemudian dilakukan eluasi dengan kloroform: metanol: asam asetat glasial (22: 8: 4), dipanaskan dengan suhu 100°C selama 10 menit, disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat (anisaldehid 0,5 ml, asam asetat glasial 10 ml, metanol 85 ml, asam sulfur 5 ml), dipanaskan dengan oven pada suhu 95°C selama 10 menit. Dilakukan *scanning* plat KLT dengan *scanner* KLT-Densitometri pada panjang gelombang 415 nm, diamati spektrum yang terbentuk. Selektivitas dapat ditentukan dengan membandingkan spektrum secara visual serta melihat hasil nilai *match factor* (Huber, 2007).

4.6.3.4 Linearitas dan Rentang

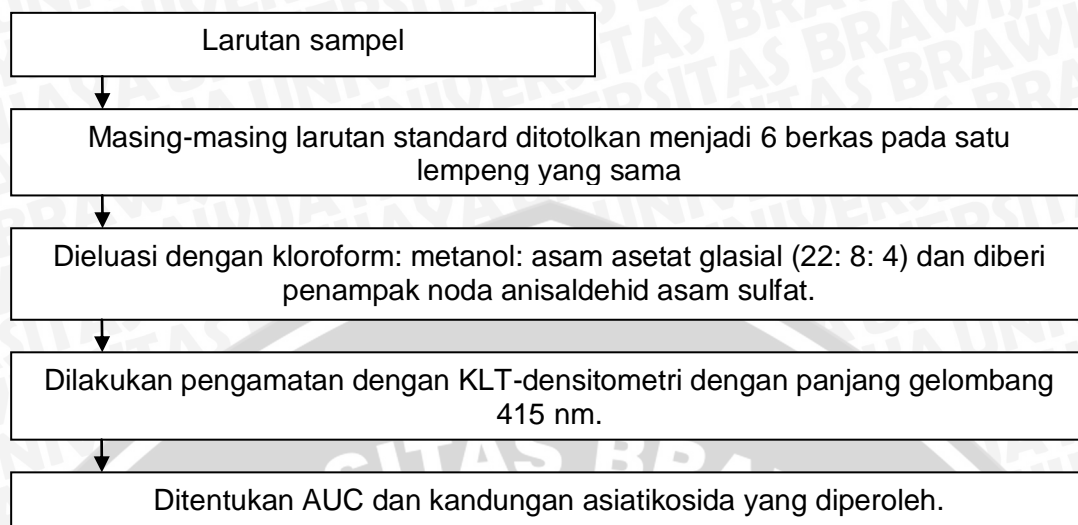
Dalam prosedur pengukuran linearitas dan rentang (Gambar 4.10), standard asiatikosida dengan 5 konsentrasi berbeda ditotolkan pada lempeng KLT. Kemudian dilakukan eluasi dengan fase gerak kloroform: metanol: asam asetat glasial (22: 8: 4). Plat KLT kemudian diupkan di lemari asam dan dipanaskan dengan oven pada suhu 100°C selama 10 menit. Kemudian disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat (anisaldehid 0,5 ml, asam asetat glasial 10 ml, metanol 85 ml, asam sulfur 5 ml), dipanaskan dengan oven pada suhu 95°C selama 10 menit. Dilakukan pengamatan dengan KLT-densitometer pada panjang gelombang 415 nm. Selanjutnya ditentukan kurva standard berdasarkan plot rata-rata *area under curve* (AUC) berbanding konsentrasi. Linearitas dinyatakan sebagai koefisien korelasi (r). Nilai koefisien korelasi yang dapat diterima adalah $r \geq 0,99$ (UNODC, 2009). Rentang adalah konsentrasi terendah dan konsentrasi tertinggi dimana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi, dan linearitas yang mencukupi. Rentang yang digunakan pada penelitian ini adalah 25, 50, 75, 100, 125, dan 150% dari konsentrasi analit yang diharapkan (Gandjar, 2007).



Gambar 4.10. Prosedur Pengujian Linearitas dan Rentang

4.6.3.5 Presisi

Untuk menentukan presisi (Gambar 4.11), tiga larutan sampel yang masing-masing dibuat dengan menimbang ekstrak sebesar 30 mg dan dilarutkan dalam etanol 70% sebanyak 3 ml. Masing-masing larutan sampel ditotolkan menjadi 6 berkas pada satu lempeng yang sama. Jumlah masing-masing penotolan adalah 4 μ l. Kemudian dilakukan eluasi, dipanaskan dengan suhu 100°C selama 10 menit, disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat (anisaldehyd 0,5 ml, asam asetat glasial 10 ml, metanol 85 ml, asam sulfur 5 ml), dipanaskan dengan oven pada suhu 95°C selama 10 menit. Kemudian dilakukan pengamatan dengan KLT-densitometri dengan panjang gelombang 415 nm dan ditentukan AUC dan kandungan asiaticosida yang diperoleh (Chaisawadi, 2012).



Gambar 4.11. Prosedur Pengujian Presisi

Data untuk pengulangan (*repeatability*) diperoleh dari 6 berkas totalan terpisah yang diaplikasikan pada satu lempeng dalam hari yang sama. Sementara data untuk presisi antara (*intermediate precision*) diperoleh dari tiga lempeng (dengan masing-masing lempeng terdapat 6 berkas totalan) yang diambil pada 3 hari yang berbeda. Kemudian ditentukan standard deviasi (SD) dan persen koefisien variasi (% KV) dari hasil yang diperoleh. Koefisien variasi yang dapat diterima berdasarkan ICH Q2(R1) yaitu tidak lebih dari 15 %.

Standard deviasi dihitung dengan mengukur perbedaan antara rata-rata dan masing-masing nilai pada kumpulan data (McPolin, 2009).

$$s = \sqrt{s^2} \dots\dots\dots(4.1)$$

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \dots\dots\dots(4.2)$$

dengan:

s = Standard deviasi

s^2 = Varian

n = Jumlah data

\bar{x} = Rata-rata



x_i = Nilai data ke- i

KV dirumuskan dengan persamaan (Gandjar, 2007):

$$KV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \% \dots\dots\dots(4.3)$$

dengan:

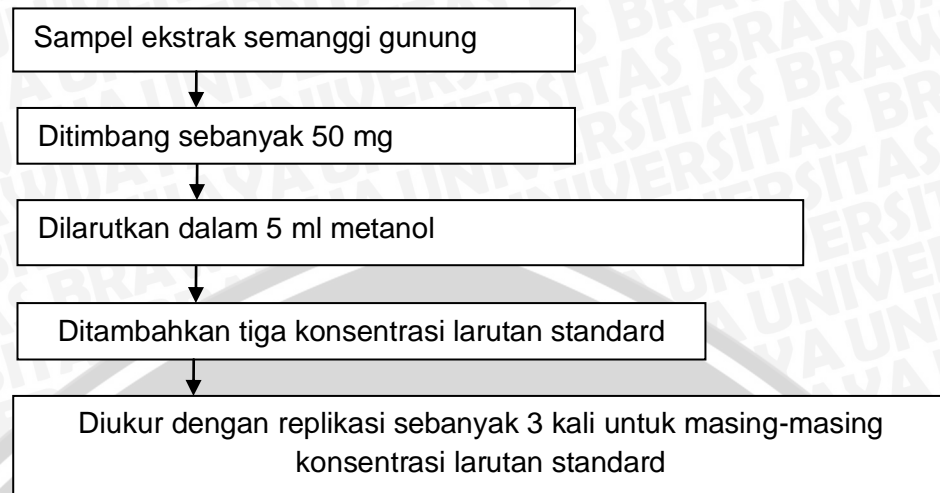
KV = Koefisien variasi

s = Standard deviasi

\bar{x} = Rata-rata

4.6.3.6 Spesifisitas

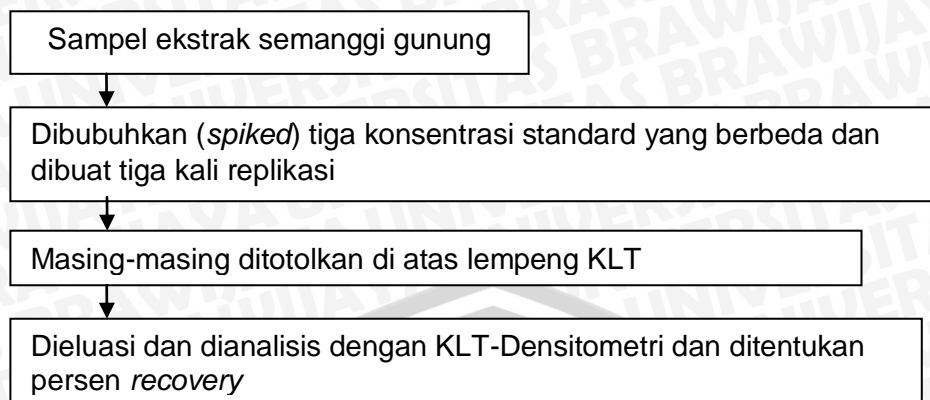
Dalam proses penentuan spesifisitas (Gambar 4.12), dibuat sampel ekstrak yang diperoleh dari penimbangan 50 mg ekstrak dan dilarutkan dengan 5 ml etanol 70% untuk kemudian ditotolkan pada plat KLT. Setelah itu dibubuhkan tiga konsentrasi larutan standard yaitu 3.750 ppm, 5.000 ppm, dan 6.250 ppm dengan menambahkan 3,75 μ l, 5 μ l, 6,25 μ l standard ke dalam masing-masing sampel ekstrak untuk kemudian ditotolkan pada lempeng KLT (ICH Expert Working Group, 2005). Kemudian dilakukan eluasi dengan kloroform: metanol: asam asetat glasial (22: 8: 4), dipanaskan dengan suhu 100^oC selama 10 menit, disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat (anisaldehyd 0,5 ml, asam asetat glasial 10 ml, metanol 85 ml, asam sulfur 5 ml), dipanaskan dengan oven pada suhu 95^oC selama 10 menit (James, 2011). Selanjutnya dilakukan pengukuran replikasi sebanyak 3 kali untuk masing-masing konsentrasi larutan standard. Hasil yang diharapkan yaitu tidak terdapat bukti munculnya (bentuk puncak) senyawa lain (Gandjar, 2007). Bukti munculnya puncak senyawa lain dapat ditandai dengan nilai *peak purity* (ICH Expert Working Group, 2005).



Gambar 4.12. Proses Pengujian Spesifisitas

4.6.3.7 Akurasi

Untuk menguji akurasi (Gambar 4.13), dibuat sampel ekstrak yang diperoleh dari penimbangan 50 mg ekstrak dan dilarutkan dengan 5 ml etanol 70%. Sampel ekstrak semanggi gunung tersebut dibubuhkan (*spiked*) dengan tiga konsentrasi standard yang berbeda 3.750 ppm, 5.000 ppm, 6.250 ppm (diambil 3,75 μ l, 5 μ l, 6,25 μ l dari larutan standard 1.000 ppm) ke dalam masing-masing sampel dan dibuat tiga kali replikasi. Hasil *spiking* kemudian ditotolkan di atas lempeng KLT. Kemudian dilakukan eluasi, dipanaskan dengan suhu 100°C selama 10 menit, disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat (anisaldehid 0,5 ml, asam asetat glasial 10 ml, metanol 85 ml, asam sulfur 5 ml), dipanaskan dengan oven pada suhu 95°C selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan analisis dengan KLT-Densitometri dan ditentukan persen *recovery* dari perolehan kadar asiatikosida. Syarat yang dapat diterima untuk uji akurasi berdasarkan ICH Q2(R1) yaitu hasil nilai persen *recovery* adalah 100 \pm 20% (Huber, 2007).



Gambar 4.13. Prosedur Pengujian Akurasi

Persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya.

$$\% \text{ Perolehan Kembali} = \frac{(C_F - C_A)}{C^*_A} \times 100\% \dots\dots\dots(4.4)$$

dengan:

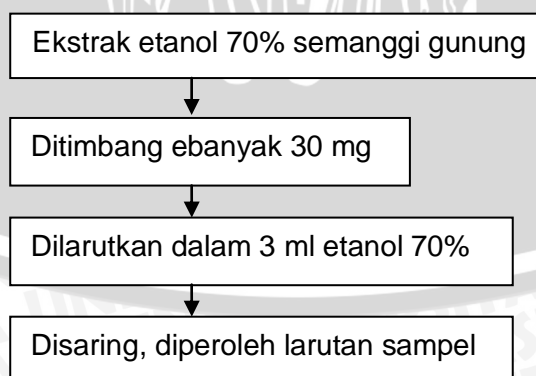
C_F = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A = konsentrasi sampel sebenarnya

C^*_A = konsentrasi analit yang ditambahkan

4.6.4 Uji Kualitatif Senyawa Asiatikosida

4.6.4.1 Preparasi Sampel

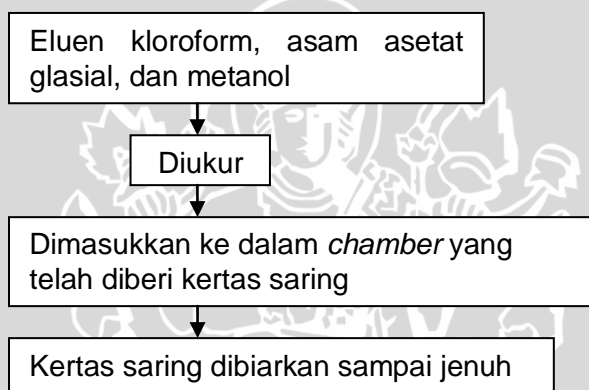


Gambar 4.14. Prosedur Preparasi Sampel

Dalam prosedur preparasi sampel (Gambar 4.14), ekstrak semanggi gunung ditimbang sebanyak 30 mg, kemudian dilarutkan dalam 3 ml etanol 70%. Dilakukan penyaringan dan diperoleh larutan sampel.

4.6.4.2 Preparasi Fase Gerak

Dalam prosedur preparasi fase gerak (Gambar 4.15), eluen kloroform: metanol: asam asetat glasial (22: 8: 4) diukur, kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah diberi kertas saring. *Chamber* ditunggu sampai jenuh ditandai dengan keseluruhan bagian kertas saring menjadi basah.

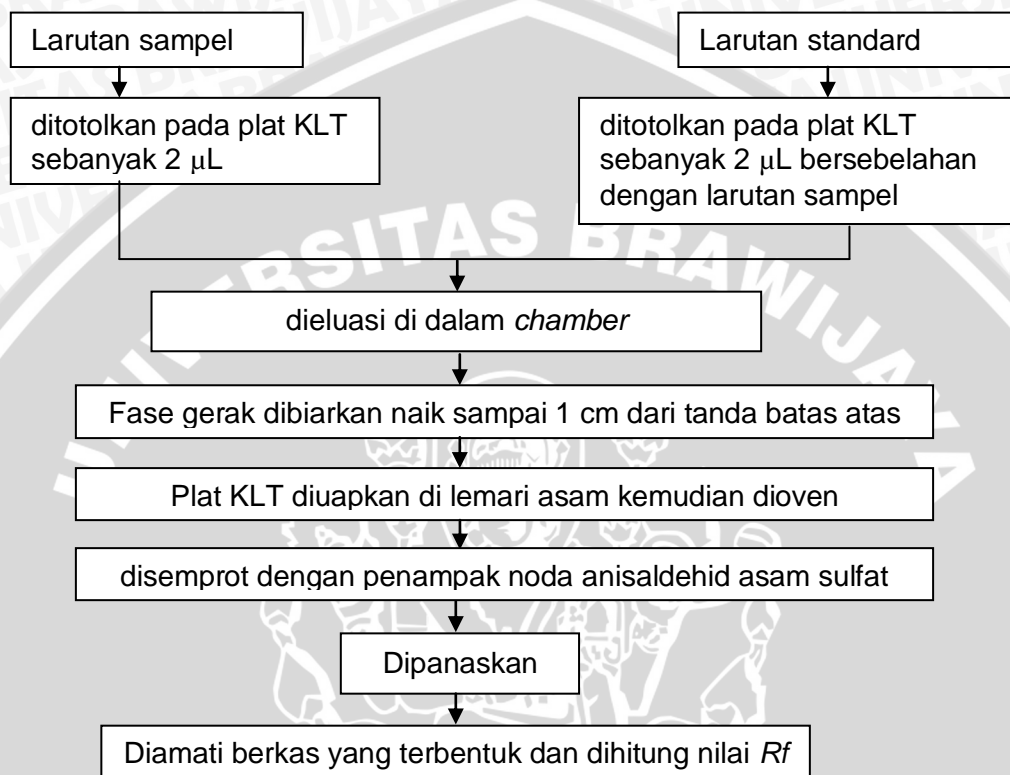


Gambar 4.15. Prosedur Preparasi Fase Gerak

4.6.4.3 Pengujian Kualitatif Asiatikosida

Dalam proses pengujian Kualitatif Asiatikosida (Gambar 4.16), larutan sampel ditotolkan di atas lempeng KLT sebanyak 2 μL , larutan standard ditotolkan bersebelahan dengan sampel sebanyak 2 μL . Dieluasi di dalam *chamber* dengan fase gerak kloroform: metanol: asam asetat glasial (22: 8: 4). Fase gerak dibiarkan naik sampai 1 cm dari tanda batas atas. Plat KLT kemudian diuapkan di lemari asam dan dipanaskan dengan oven pada suhu 100 $^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit. Kemudian disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat (anisaldehid 0,5 ml, asam asetat glasial 10 ml, metanol 85 ml, asam sulfur 5 ml),

dipanaskan dengan oven pada suhu 95°C selama 10 menit. Kemudian diamati asiaticosida yang ditandai dengan berkas berwarna ungu, dihitung R_f dari berkas yang terbentuk (James, 2011).

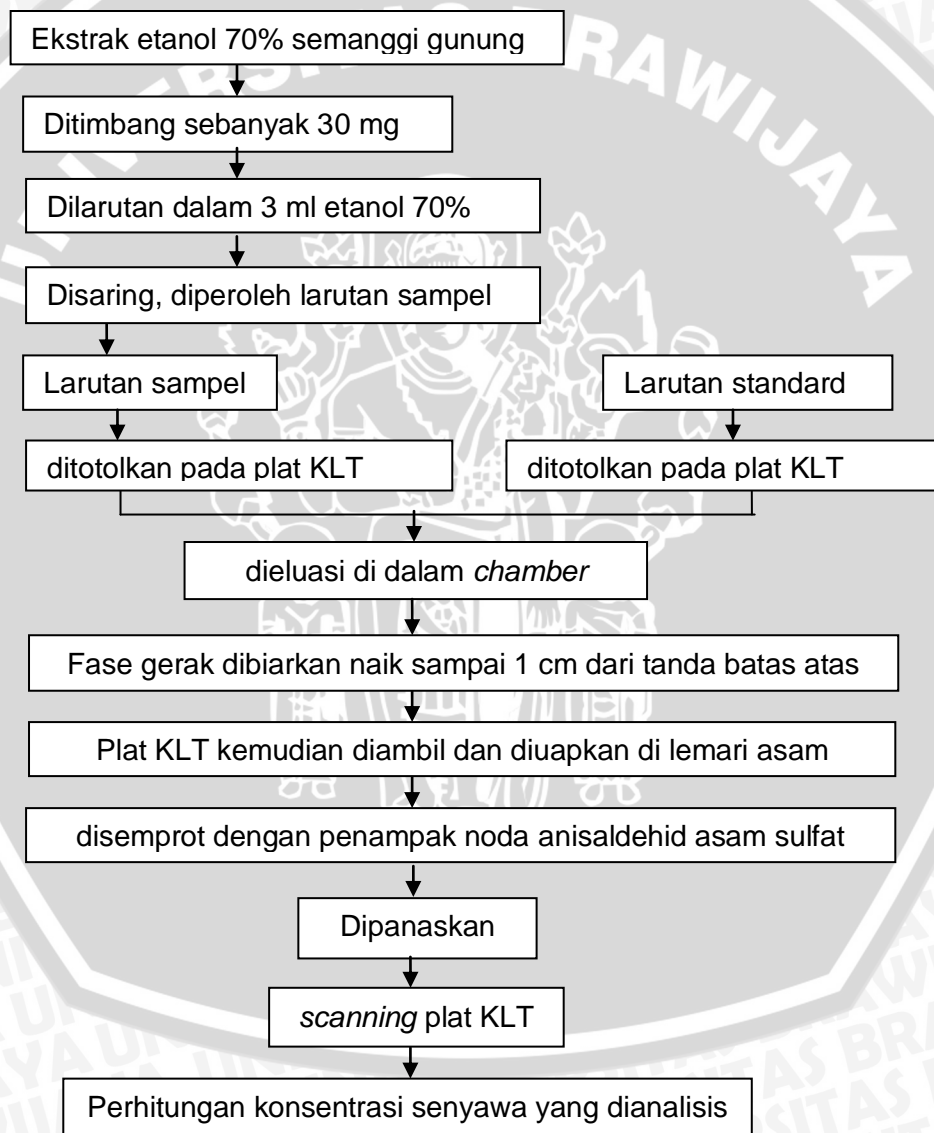


Gambar 4.16. Prosedur Pengujian Kualitatif Asiatikosida

4.6.5 Uji Kuantitatif Senyawa Asiatikosida

Untuk pengujian kuantitatif asiaticosida (Gambar 4.17), larutan sampel ditotolkan di atas lempeng KLT sebanyak $4\ \mu\text{L}$. Lima konsentrasi larutan standard yaitu $2.500\ \text{ppm}$, $3.750\ \text{ppm}$, $5.000\ \text{ppm}$, $6.250\ \text{ppm}$, dan $7.500\ \text{ppm}$ (dengan cara menotolkan $2,5\ \mu\text{l}$, $3,75\ \mu\text{l}$, $5\ \mu\text{l}$, $6,25\ \mu\text{l}$, dan $7,5\ \mu\text{l}$ dari larutan standard $1.000\ \text{ppm}$) ditotolkan bersebelahan dengan sampel sebagai kurva baku penetapan kadar. Kemudian dilakukan eluasi dengan kloroform: metanol: asam asetat glasial (22: 8: 4), fase gerak dibiarkan naik sampai 1 cm dari tanda batas atas. Kemudian plat KLT dipanaskan dengan suhu 100°C selama 10 menit,

disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat (anisaldehid 0,5 ml, asam asetat glasial 10 ml, metanol 85 ml, asam sulfur 5 ml), dipanaskan dengan oven pada suhu 95°C selama 10 menit (James, 2011). Dilakukan *scanning* plat KLT dengan *scanner* KLT-Densitometri pada panjang gelombang 415 nm, kemudian dilakukan perhitungan konsentrasi senyawa yang dianalisis. Dibuat replikasi tiga kali (Chaisawadi, 2012).



Gambar 4.17. Prosedur Uji Kuantitatif Senyawa Asiatikosida

4.7 Analisis Data

Data dianalisis melalui perhitungan rata-rata (*mean*), standard deviasi, dan koefisien variansi.

a. Rata-rata (*Mean*)

Rata-rata adalah jumlah keseluruhan nilai dalam kumpulan data dibagi dengan jumlah data yang ada. Rumus perhitungan rata rata yaitu (McPolin, 2009):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i \dots\dots\dots(4.5)$$

dengan:

\bar{x} = Rata-rata

n = Jumlah data

x_i = nilai data ke-i

Perhitungan rata-rata dilakukan untuk data dari replikasi pengujian seperti penetapan kadar, akurasi, presisi, spesifisitas.

b. Standard Deviasi (SD)

Standard deviasi dalah ukuran penyebaran nilai dalam kumpulan data. Standard deviasi dihitung dengan mengukur perbedaan antara rata-rata dan masing-masing nilai pada kumpulan data. Standard deviasi dapat dihitung dengan rumus 4.1 dan rumus 4.2 untuk menentukan varian (McPolin, 2009).

c. Koefisien Variasi (KV)

Koefisien variasi yang dikenal juga dengan standard deviasi relatif merupakan ukuran ketepatan relatif dan umumnya dinyatakan dalam persen.

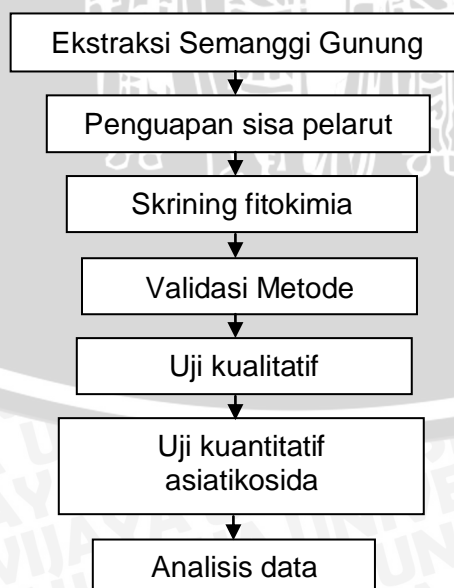
KV dapat diitung dengan rumus 4.3 (Gandjar, 2007).

d. Persen Perolehan Kembali (% Recovery)

Persen peroleh kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Persen perolehan kembali dapat dihitung dengan rumus 4.4 (Harmita, 2004).

4.8 Alur Penelitian

Alur penelitian secara umum dapat dilihat pada gambar 4.18. Simplisia semanggi gunung diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan penyari etanol 70%. Maserat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan diupakan sisa pelarut dengan oven. Hasil ekstrak kemudian digunakan untuk skrining fitokimia yang meliputi tanin, flavonoid, saponin, glikosida, steroid, terpenoid, alkaloid, glikosida jantung. Selanjutnya dilakukan validasi metode yang meliputi akurasi, presisi, spesifisitas, selektivitas, linearitas, dan rentang. Hasil ekstrak kemudian ditentukan keberadaan senyawa asiatikosida melalui uji kualitatif menggunakan KLT. Penetapan kadar asiatikosida selanjutnya dilakukan menggunakan uji kuantitatif dengan metode KLT-Densitometri.



Gambar 4.18. Alur Penelitian Umum