

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan

6.1.1 Ekstraksi

Proses ekstraksi simplisia semanggi gunung dilakukan dengan metode maserasi karena tidak memerlukan adanya pemanasan. Pada proses pemekatan hasil ekstraksi dengan *rotary evaporator* dan penguapan sisa pelarut dengan oven digunakan suhu 40°C untuk menghindari kerusakan asiatikosida. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi ini adalah etanol 70% karena bersifat semipolar sehingga sesuai untuk menarik asiatikosida yang merupakan molekul yang bersifat semipolar. Pada proses maserasi ini dilakukan pengadukan yang bertujuan untuk mempercepat proses ekstraksi komponen aktif. Dalam proses maserasi, pelarut menembus dinding sel bahan dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa aktif. Kemudian senyawa aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa aktif di dalam dan di luar sel, maka cairan hipertonis akan masuk ke cairan hipotonis sehingga terjadi keseimbangan (Baraja, 2008). Setelah terjadinya keseimbangan tersebut, perlu dilakukan penggantian larutan penyari atau remaserasi agar dapat mengekstraksi senyawa-senyawa yang masih tersisa dalam bahan yang diekstraksi.

Pada penelitian ini, ekstraksi dari simplisia semanggi gunung dengan berat total 652,410 gram menghasilkan ekstrak pekat seberat 91,041 gram. Dari hasil tersebut diperoleh persentase rendemen sebesar 13,955 %. Persentase

rendemen menunjukkan persentase berat ekstrak pekat yang berhasil diperoleh dari hasil ekstraksi dibandingkan dengan berat simplisia awal. Semakin tinggi rendemen menunjukkan bahwa senyawa-senyawa organik yang diperoleh juga semakin banyak (Ma'mun *et al*, 2005). Adapun faktor yang berpengaruh terhadap nilai rendemen ekstrak antara lain waktu ekstraksi, perbandingan jumlah pelarut organik terhadap bahan dasar, ukuran partikel, dan jenis pelarut (Bustan, 2008). Waktu ekstraksi, perbandingan jumlah pelarut dengan bahan yang diekstrak, serta ukuran partikel menentukan adanya kontak yang cukup antara pelarut dan bahan yang diekstrak (Kusnaeni, 2008). Pelarut yang digunakan untuk menyari berpengaruh terhadap kesesuaian komponen yang diekstrak.

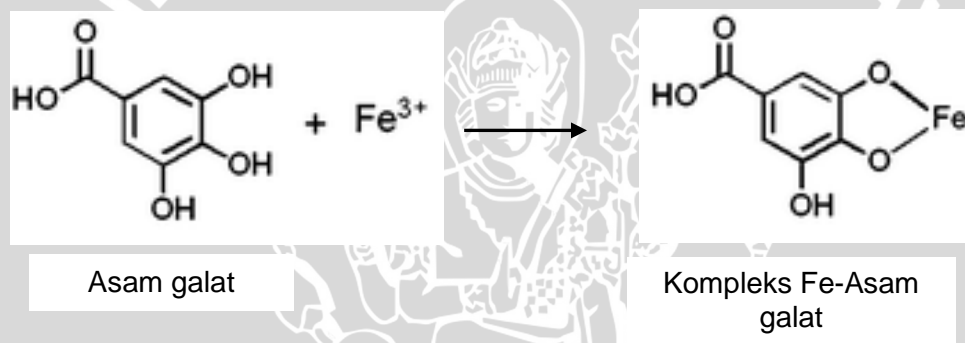
6.1.2 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi beberapa jenis senyawa fitokimia yang diperkirakan terdapat pada ekstrak meliputi tanin, flavonoid, saponin, glikosida, steroid, terpenoid, alkaloid, glikosida jantung. Uji ini memudahkan estimasi kuantitatif dan pemisahan kualitatif dari senyawa kimia aktif yang terkandung di dalamnya (Bhandary *et al*, 2012).

6.1.2.1 Tanin

Hasil uji tanin pada sampel dengan penambahan gelatin tidak menunjukkan adanya endapan dengan jelas. Sampel dengan penambahan gelatin dan NaCl juga tidak menunjukkan endapan dengan jelas. Setelah dipertegas dengan penambahan FeCl_3 , tampak perubahan warna menjadi biru kehitaman yang menunjukkan hasil positif. Fungsi penambahan gelatin dalam uji tanin ini karena adanya tanin akan mengendapkan protein pada gelatin. Tanin

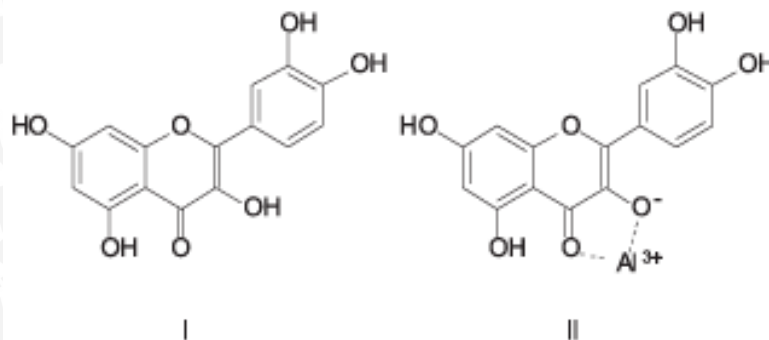
bereaksi dengan gelatin membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air. Reaksi ini lebih sensitif dengan penambahan NaCl untuk mempertinggi penggaraman dari tanin-gelatin (Marliana, 2005). Penambahan FeCl_3 berfungsi untuk membentuk senyawa kompleks antara Fe dengan tanin (Effendy, 2007). Pada gambar 6.1 ditunjukkan perkiraan terbentuknya kompleks antara asam galat yang merupakan monomer dari tanin dengan Fe. Pada gambar tersebut, Fe^{3+} mengalami reduksi menjadi Fe^{2+} yang dapat terjadi karena kondisi tertentu, terutama karena perubahan pH. Fe^{2+} kemudian berikatan dengan O dan membentuk kompleks sehingga terjadi perubahan warna (Wentworth, 2011).



Gambar 6.1. Reaksi Pembentukan Kompleks Asam Galat dengan Fe (Wentworth, 2011)

6.1.2.2 Flavonoid

Pada uji flavonoid menunjukkan bahwa sampel yang diberi penambahan amonia dan H_2SO_4 (bagian A), larutan Aluminium (bagian B), serta etil asetat dan amonia (bagian C) menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi kuning. Perubahan warna menjadi kuning ini dikarenakan flavonoid termasuk senyawa fenol, dimana fenol dapat membentuk sistem konjugasi bila direaksikan dengan basa atau amonia. Sementara penambahan aluminium bertujuan membentuk kompleks dan membentuk perubahan warna menjadi kuning (Gambar 6.2) (Pekal, 2014).

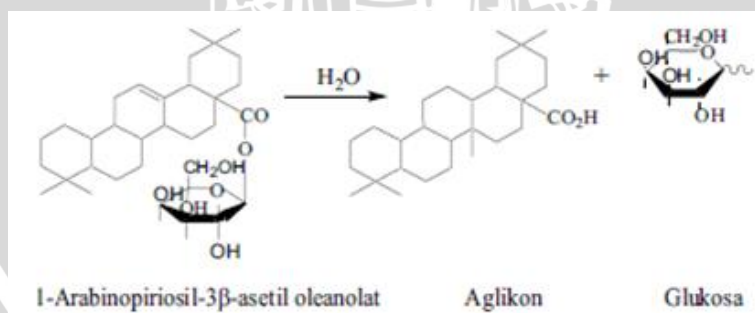


Gambar 6.2. Pembentukan Kompleks Flavonoid-Aluminium (Frederice, 2010)

Keterangan: (I) Struktur Umum Flavonoid, (II) Kompleks Flavonoid-Aluminium

6.1.2.3 Saponin

Uji saponin pada penelitian ini menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya buih mantap setinggi 1 cm dan bertahan selama 10 menit serta membentuk emulsi setelah penambahan minyak zaitun. Timbulnya buih pada uji saponin menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya yang dapat dilihat pada gambar 6.3 (Marliana, 2005).

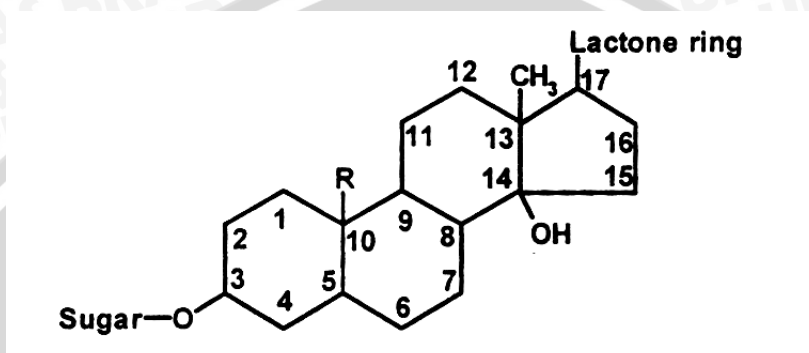


Gambar 6.3. Reaksi Hidrolisis Saponin dalam Air (Marliana, 2005)

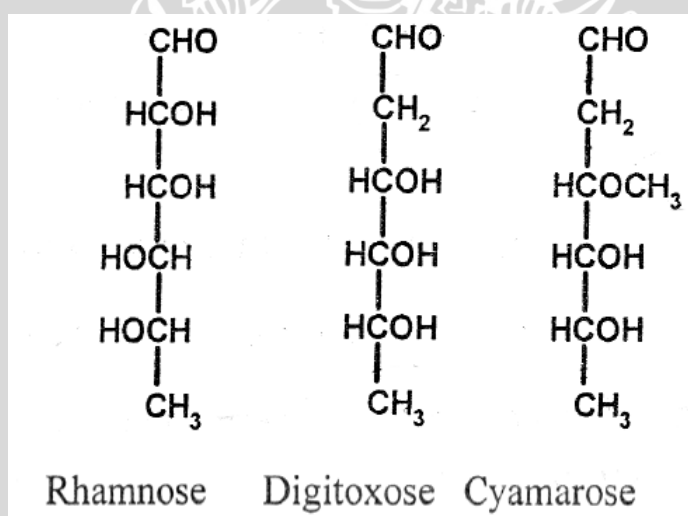
6.1.2.4 Glikosida Jantung

Hasil positif pada uji glikosida jantung ditandai oleh terbentuknya cincin coklat setelah ditambahkan dengan yang mengindikasikan keberadaan gula deoksi (*deoxy-sugar*) pada bagian glikon dari glikosida jantung (Akinjogunla,

2012). Pada penelitian ini tidak terbentuk cincin coklat, melainkan terbentuk dua lapisan dengan lapisan bawah yang berwarna lebih jernih dibanding lapisan atasnya. Contoh gula deoksi (Gambar 6.5) antara lain digitoxose, cymarose, dan rhamnose. Gambar 6.4 menunjukkan struktur umum dari glikosida jantung.



Gambar 6.4. Struktur Umum Glikosida Jantung (Delta University, 2015)



Gambar 6.5. Contoh Gula Deoksi (Delta University, 2015)

6.1.2.5 Terpenoid

Skринing terpenoid dilakukan dengan penambahan kloroform pada ekstrak karena kloroform sesuai untuk melarutkan terpenoid, kemudian dilakukan penambahan H₂SO₄ konsentrat 3 ml. Reaksi positif ditunjukkan dengan

terbentuknya warna coklat kemerahan pada permukaan (Ayoola *et al*, 2008).

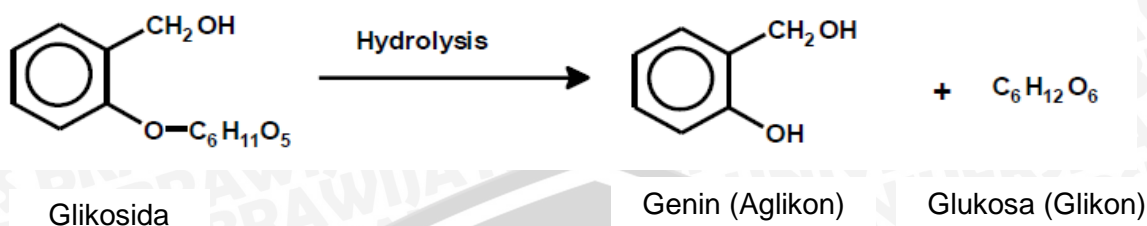
Pada penelitian ini tidak terbentuk warna cokelat kemerahan pada permukaan, tetapi terbentuk warna cokelat kehitaman dengan lapisan atas yang lebih jernih dibanding dengan lapisan bawahnya.

6.1.2.6 Steroid

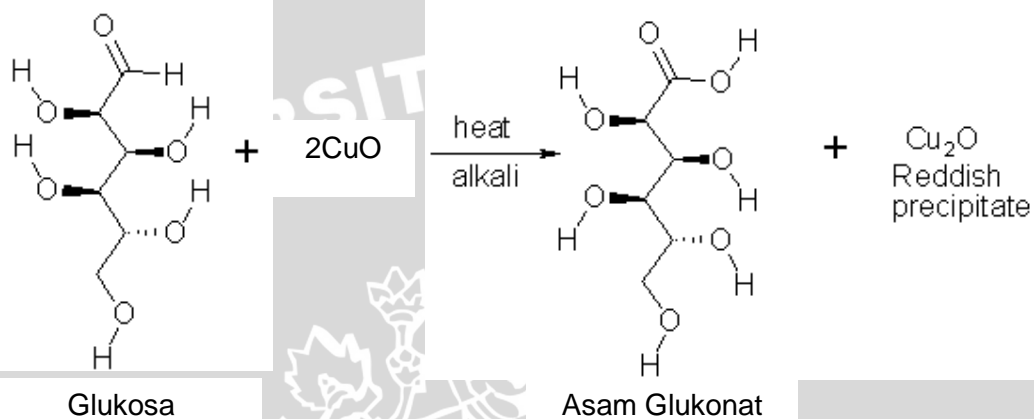
Pada penelitian ini, hasil uji steroid menunjukkan warna larutan akhir hijau kecokelatan, sementara hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna dari ungu ke biru atau hijau. Pereaksi asetat anhidrat yang digunakan bertujuan untuk membentuk turunan kolesterol (3,5 cholestadiene), sementara penambahan asam sulfat bertujuan untuk membentuk reaksi yang menghasilkan kompleks asam sulfonat kolestaheksan yang berwarna hijau (Das, 2012).

6.1.2.7 Glikosida

Glikosida terdiri atas bagian glikon dan aglikon (Gambar 6.6). Pada pengujian glikosida dilakukan penambahan asam untuk memutus ikatan antara bagian glikon dengan aglikon (Temidayo, 2013). Bagian glikon pada glikosida adalah dalam glukosa, sehingga dapat diuji keberadaannya menggunakan reagen Fehling. Pada penelitian ini, uji glikosida menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau dengan adanya endapan merah. Endapan merah ini dapat terjadi karena reagen Fehling yang mengandung ion Cu^{2+} dapat tereduksi menjadi Cu^+ jika terdapat agen reduksi dan kemudian membentuk endapan merah (Gambar 6.7). Warna endapan dapat bervariasi dari merah, jingga, dan hijau yang dapat terbentuk karena campuran endapan warna jingga dan biru (Kooti, 2010). Agen reduksi yang berperan dalam pengujian ini adalah glukosa yang merupakan jenis gula pereduksi.



Gambar 6.6. Reaksi Hidrolisis Glikosida (Delta University, 2015)

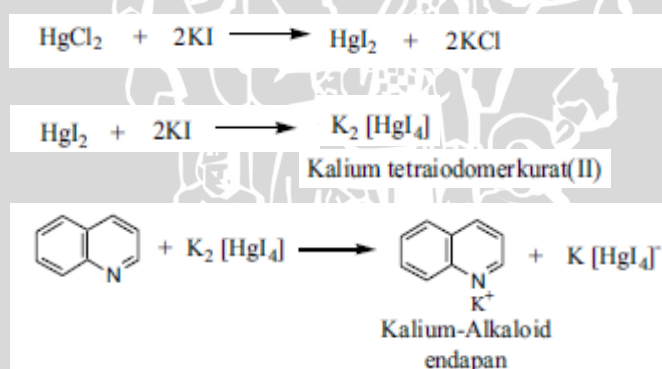


Gambar 6.7. Reaksi Uji Glikosida dengan Reagen Fehling (Delta University, 2015)

6.1.2.8 Alkaloid

Pengujian alkaloid dalam penelitian ini tidak tampak terbentuk suatu endapan. Sementara hasil positif pada skrining alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan pada pengujian menggunakan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff. Pada uji pendahuluan sebelum ditambahkan dengan pereaksi, dilakukan penambahan HCl dalam sampel karena alkaloid bersifat basa sehingga biasanya diekstrak dengan pelarut yang mengandung asam. Penambahan NaCl pada sampel sebelum penambahan pereaksi dilakukan untuk menghilangkan protein. Adanya protein yang mengendap pada penambahan pereaksi yang mengandung logam berat (pereaksi Mayer) dapat memberikan reaksi positif palsu pada beberapa senyawa (Marliana, 2005).

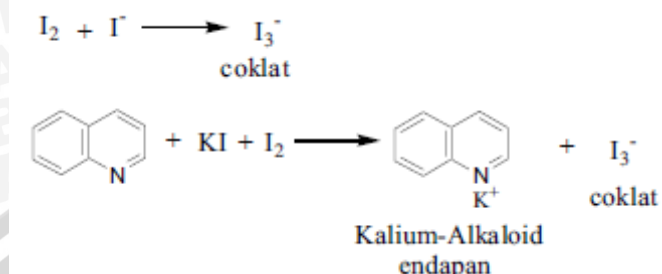
Hasil positif alkaloid pada uji Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Diperkirakan endapan tersebut adalah kompleks kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Mayer, larutan merkuri klorida ditambah kalium iodida akan bereaksi membentuk endapan merah merkuri iodida. Jika kalium iodida yang ditambahkan berlebih maka akan terbentuk kalium tetraiodomerkurat (II). Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam (McMurry, 2004). Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Perkiraan reaksi yang terjadi pada uji Mayer ditunjukkan pada gambar 6.8 (Marliana, 2005).



Gambar 6.8. Perkiraan Reaksi Uji Mayer (Marliana, 2005)

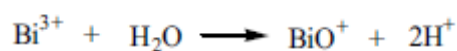
Hasil positif alkaloid pada uji Wagner ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Diperkirakan endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Wagner, iodine bereaksi dengan ion I^- dari kalium iodida menghasilkan ion I_3^- yang berwarna coklat. Pada uji Wagner, ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada

alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marliana, 2005). Reaksi yang terjadi pada uji Wagner ditunjukkan pada gambar 6.9.



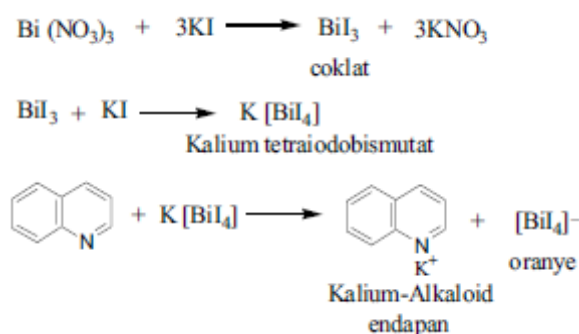
Gambar 6.9. Perkiraan Reaksi Uji Wagner (Marliana, 2005)

Hasil positif alkaloid pada uji Dragendorff juga ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Dragendorff, bismut nitrat dilarutkan dalam HCl agar tidak terjadi reaksi hidrolisis karena garam-garam bismut mudah terhidrolisis membentuk ion bismutil (BiO^+), yang reaksinya ditunjukkan pada gambar 6.10 (Marliana, 2005).



Gambar 6.10. Reaksi Hidrolisis Bismut (Marliana, 2005)

Agar ion Bi^{3+} tetap berada dalam larutan, maka larutan itu ditambah asam sehingga kesetimbangan akan bergeser ke arah kiri. Selanjutnya ion Bi^{3+} dari bismut nitrat bereaksi dengan kalium iodida membentuk endapan hitam Bismut (III) iodida yang kemudian larut dalam kalium iodida berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam. Reaksi pada uji Dragendorff ditunjukkan pada gambar 6.11 (Marliana, 2005).



Gambar 6.11. Reaksi Uji Dragendorff (Marliana, 2005)

Dari hasil skrining fitokimia yang telah dilakukan pada penelitian ini diketahui bahwa kandungan fitokimia yang terdapat dalam semanggi gunung antara lain tanin, flavonoid, saponin, dan glikosida.

6.1.3 Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Densitometri

6.1.3.1 Selektivitas

Dari tabel 5.2 dapat dilihat bahwa faktor retensi (R_f) dari standard dan sampel tidak jauh berbeda, demikian juga dengan sampel yang dibubuhi dengan standard. Hasil spektrum standard asiatikosida pada gambar 5.1 secara visual tampak tidak teratur jika dibandingkan dengan kelima spektrum lainnya. Bentuk spektrum yang tidak teratur ini dapat dikarenakan adanya pengotor yang mengganggu saat proses pemindaian spektrum, tetapi standard asiatikosida ini menunjukkan nilai *match factor* yang masih memenuhi persyaratan yaitu $\geq 0,9$. Hasil *match factor* dari standard asiatikosida yaitu $r(s,m) = 0,980$ dan $r(m,e) = 0,965$. Diketahui bahwa $r(s,m)$ adalah kemiripan (*match factor*) puncak depan, sementara $r(m,e)$ adalah kemiripan puncak belakang (Kristiningrum *et al*, 2013). Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa spektrum sampel dengan standard dan juga sampel yang dibubuhi dengan standard memiliki kemiripan yang baik,

sehingga menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan dapat mendeteksi komponen-komponen kimia secara terpisah atau selektif.

6.1.3.2 Linearitas dan Rentang

Linearitas didefinisikan pada ICH sebagai kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan (Huber, 2007). Hubungan linier antara konsentrasi standard dengan luas area ditentukan dengan penotolan larutan standard asiaticosida dengan rentang konsentrasi 2.500 ppm sampai 7.500 ppm. Hasil yang diperoleh berupa konsentrasi versus luas area dan selanjutnya dibuat persamaan garis regresi linier serta ditentukan koefisien korelasinya. Dari hasil uji linearitas didapatkan persamaan regresi linier $Y = 982,686x + 654,645$ dengan koefisien korelasi ($r = 0,992$). Nilai koefisien korelasi yang dapat diterima adalah $r \geq 0,99$ (UNODC, 2009). Berdasarkan hasil koefisien korelasi, dapat disimpulkan bahwa kadar (x) dan area (y) yang ditunjukkan pada kurva linearitas (Gambar 5.2) memiliki hubungan linearitas yang baik karena data tersebar dalam garis yang lurus atau linier, dengan rentang konsentrasi 2,58 – 7,75 $\mu\text{g/berkas uji}$. Sementara hasil koefisien determinasi menunjukkan bahwa 98,404% dari total variasi pada y dapat dijelaskan oleh hubungan linearitas antara x dan y .

6.1.3.3 Presisi

Dari hasil uji presisi, ditentukan standard deviasi (SD) dan persen koefisien variasi (%KV). Standard deviasi adalah ukuran penyebaran nilai dalam kumpulan data (McPolin, 2009). Semakin kecil penyebaran nilai, yang berarti nilai antar data hampir sama, maka standard deviasi mendekati angka 0. Koefisien

variasi mengukur variabilitas dari seri angka atau nilai dengan cara membagi standard deviasi dengan rata-rata dari angka-angka dalam kumpulan data (Salkind, 2010). Nilai SD dan %KV perlu ditentukan dalam pengujian presisi karena pengujian presisi bertujuan untuk mengetahui seberapa dekat serangkaian hasil pengukuran satu sama lain. Pada penelitian ini, nilai koefisien variasi (%KV) untuk hari pertama adalah 1,353%, hari kedua 1,085%, dan hari ketiga 1,909%. Sementara rata-rata koefisien variasi (%KV) untuk tiga hari yang berbeda adalah 1,449%. Dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa pengulangan (*repeatability*) yang diperoleh dari 6 berkas totolan terpisah yang diaplikasikan pada satu lempeng dalam hari yang sama, serta presisi antara (*intermediate precision*) sampel uji yang diperoleh dari tiga lempeng yang diambil pada 3 hari yang berbeda menunjukkan adanya kedekatan hasil pengukuran satu sama lain yang baik. Kedekatan hasil pengukuran ini dapat dilihat dari nilai koefisien variasi (%KV) yang memenuhi persyaratan pada *guideline* ICH Q2(R1), yaitu tidak lebih dari 15%.

6.1.3.4 Spesifisitas

Uji spesifisitas dilakukan dengan membuktikan bahwa tidak terbentuknya bukti puncak senyawa lain. Pada tahap ini, dilakukan penotolan sampel yang dibubuhi dengan standard dibandingkan juga dengan standard asiatikosida tanpa sampel. Standard yang dibubuhkan pada sampel adalah konsentrasi standard 3.750 ppm, 5.000 ppm, dan 6.250 ppm, dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing konsentrasi standard. Hasil yang diperoleh menunjukkan kemurnian (*purity*) yang baik, ditandai dengan kode "OK" (Tabel 5.5) yang menunjukkan tidak adanya bukti munculnya puncak senyawa lain. Selain itu, hasil pemindaian spektrum dari keseluruhan berkas uji menunjukkan spektrum yang mirip dan

teratur, sehingga menunjukkan tidak adanya pengotor saat proses pemindaian. Diketahui bahwa hasil spesifisitas yang buruk ditandai dengan kode "FAILED". Jadi dapat disimpulkan bahwa metode KLT-Densitometri yang digunakan dapat mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel.

6.1.3.5 Akurasi

Hasil akurasi diperoleh dengan menotolkan seri larutan standard sebagai kurva baku, sampel kosong (tanpa dibubuhi standard), serta sampel yang dibubuhi standard untuk ditentukan kadar dan persen *recovery*. Pada pengujian akurasi diperoleh rata-rata kadar tiga sampel kosong untuk penambahan dengan larutan standard 3.750 ppm dan 6.250 ppm adalah 4,355 μg , sementara rata-rata kadar tiga sampel kosong penambahan dengan larutan baku 5.000 ppm adalah 4,101 μg karena diuji menggunakan lempeng yang berbeda sehingga kurva baku yang digunakan juga berbeda. Penggunaan lempeng yang berbeda dapat menunjukkan hasil yang berbeda dikarenakan adanya perbedaan kondisi seperti kejenuhan dalam *chamber* atau penurunan jumlah eluen selama proses pengujian.

Persen *recovery* ditentukan dengan mengurangi hasil kadar sampel yang dibubuhi larutan baku dengan hasil kadar sampel kosong (Lampiran 5). Rata-rata persen *recovery* dari tiga kali replikasi untuk sampel dengan penambahan larutan baku 3.750 ppm adalah 107,591%. Rata-rata persen *recovery* dari tiga kali replikasi untuk sampel dengan penambahan larutan baku 5.000 ppm adalah 92,980%. Sementara rata-rata persen *recovery* dari tiga kali replikasi untuk sampel dengan penambahan larutan baku 6.250 ppm adalah 90,496%. Karena nilai persen *recovery* memenuhi kriteria penerimaan ICH Q2(R1) yaitu $100 \pm 20\%$

(Huber, 2007), maka dapat dinyatakan bahwa metode ini dapat menunjukkan kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima atau memiliki hasil yang akurat. Dari validasi metode analisis yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa metode KLT-Densitometri telah memenuhi persyaratan setiap parameter dalam validasi sehingga selanjutnya dapat digunakan untuk penetapan kadar.

6.1.4 Uji Kualitatif Senyawa Asiatikosida

Berdasarkan uji kualitatif senyawa asiatikosida diketahui nilai faktor retensi (R_f) sampel dan standard tidak berbeda jauh. Nilai R_f dari sampel adalah 0,34 dan R_f standard adalah 0,35. Sementara nilai R_f untuk sampel yang dibubuhi dengan standard adalah 0,34. Noda yang tampak pada sampel dan standard tampak berwarna ungu kebiruan. Penelitian yang dilakukan oleh Chaisawadi (2012) menunjukkan juga bahwa asiatikosida memiliki noda yang tampak berwarna ungu kebiruan. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa secara kualitatif senyawa asiatikosida terdapat dalam ekstrak etanol 70% semanggi gunung. Adapun perbandingan eluen yang sesuai untuk menghasilkan noda yang intensif dan R_f yang hampir sama antara standard dan sampel yaitu kloroform: metanol: asam asetat glasial (22:8:4).

Perbandingan eluen yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari hasil optimasi eluen. Dari perbandingan tersebut diketahui bahwa indeks polaritas yang diperoleh adalah 4,371 yang termasuk dalam sifat semipolar (lampiran 3). Diketahui bahwa asiatikosida memiliki sifat semipolar karena memiliki trisakarida (glukosa-glukosa-rhamnosa) pada bagian glikon dari struktur kimianya. Pelarut yang dipilih memiliki kepolaran sedang dan dikombinasi dengan pelarut polar untuk dapat melarutkan bagian glikon maupun aglikon dari asiatikosida pada proses KLT (Chaisawadi, 2012). Dari proses optimasi eluen ini

juga diketahui bahwa prosedur pemberian penampak noda akan menunjukkan hasil yang baik jika melalui proses pencelupan hingga semua lempeng terbasahi, karena proses penyemprotan membuat adanya bercak-bercak yang dapat terpindai sebagai noda pada lempeng sehingga dapat mengganggu interpretasi hasil.

6.1.5 Uji Kuantitatif Senyawa Asiatikosida

Uji kuantitatif asiatikosida dilakukan dengan menotolkan lima konsentrasi standard yaitu 2.500 ppm, 3.750 ppm, 5.000 ppm, 6.250 ppm, dan 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 pada lempeng sebagai kurva baku penetapan kadar. Kemudian dilakukan penotolan sampel yang direplikasi sebanyak tiga kali untuk ditentukan kadarnya. Dari pengujian ini diperoleh hasil replikasi kadar pertama adalah 4,061 µg dengan persentase kadar 9,986%, replikasi kedua 4,026 µg dengan persentase kadar 9,900%, dan replikasi ketiga 4,096 µg dengan persentase kadar 10,072%, sehingga diperoleh rata-rata persentase kadar sebesar 9,986%. Persentase kadar ini menunjukkan bahwa terdapat kandungan asiatikosida sebesar 9,986% dari ekstrak etanol 70% semanggi gunung. Adanya perbedaan kadar yang diperoleh dari ketiga replikasi ini dapat dimungkinkan karena pencampuran hasil ekstraksi yang kurang homogen baik dari proses maserasi, setelah pemekatan ekstrak menggunakan *rotary evaporator*, ataupun saat pelarutan ekstrak untuk sampel uji. Pada penelitian ini tidak terdapat perbedaan yang signifikan, sehingga hasil yang diperoleh masih dapat diterima.

6.2 Implikasi Penelitian

Penelitian ini dapat dikembangkan untuk penelitian selanjutnya dengan menguji variabel yang mungkin berpengaruh seperti pemilihan tanaman atau metode ekstraksi terhadap kadar asiatikosida yang terkandung dalam ekstrak. Selain itu, penelitian ini juga dapat dijadikan dasar untuk pengujian aktivitas asiatikosida baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini antara lain:

1. Tanaman semanggi gunung yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari *Materia Medica Batu* dan diekstraksi dengan proses ekstraksi maserasi menggunakan larutan penyari etanol 70%. Jika lokasi penanaman serta kondisi ekstraksi yang dilakukan berbeda, maka dapat memungkinkan terjadi perbedaan hasil perolehan kadar.
2. Prosedur validasi membutuhkan standard asiatikosida yang cukup banyak karena diperlukan adanya replikasi dalam beberapa parameter validasi, selain itu harus disiapkan untuk mengantisipasi kegagalan dalam pengujian sehingga memerlukan pengulangan.
3. Jika merujuk pada guideline lain seperti USP 29 – NF 24, terdapat parameter validasi yang dapat diujikan yaitu kekasaran (*ruggedness*). Stabilitas juga merupakan parameter yang dapat diujikan berdasarkan guideline ICH Q1A(R2) tentang pengujian senyawa obat dan produk baru. Parameter-parameter tersebut tidak dilakukan karena parameter yang diujikan pada penelitian ini disesuaikan dengan kategori berdasarkan ICH Q2(R1) tentang validasi dari prosedur analitis.