



**PENENTUAN KADAR FENOL TOTAL PADA EKSTRAK DAUN TANAMAN
MENGUNAKAN METODE SPEKTROKOPI NIR
DAN KEMOMETRIK**

SKRIPSI

Oleh

**Fracilia Arinda Ratnasari
NIM 112210101015**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015



**PENENTUAN KADAR FENOL TOTAL PADA EKSTRAK DAUN TANAMAN
MENGUNAKAN METODE SPEKTROKOPI NIR
DAN KEMOMETRIK**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Sarjana Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

Fracilia Arinda Ratnasari
NIM 112210101015

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang senantiasa memberikan rahmat dan nikmat yang tak terhingga untuk hambaNya;
2. Rasulullah SAW yang senantiasa menjadi penyemangat bagi penulis agar senantiasa bersemangat dalam menuntut ilmu;
3. Bapak Taufik Sama, Ibu Hariati, mas Franky Anggriawan dan adik Fikry Aldin Syach untuk doa, jerih payah, kasih sayang, semangat, motivasi, pengorbanan, dan kepercayaan yang selalu mengiringi perjalanan hidup saya;
4. Bapak Harsito sekeluarga di Sidoarjo;
5. Guru-guru yang telah membimbing saya di TK Angkasa 2 Singosari, SDN Tamanharjo 1 Singosari, SMPN 1 Singosari dan SMAN 1 Lawang;
6. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Tuhan-mu lah hendaknya kamu berharap.”

(terjemahan Surat *Al-Insyirah* ayat 6-8)*)

Jangan pernah mengerdilkan kuasa Tuhan dengan impian-impian kerdil kita.

Kalau Tuhan kita Mahahebat, kenapa kita minta yang remeh-remeh?

(Ahmad Rif' ai Rif'an)**)

Kesabaran itu menolong segala pekerjaan

(Pepatah Arab)**)

*)Departemen Agama Republik Indonesia. 2000. Al Qur'an dan Terjemahnya (Ayat Pojok Bergaris). Semarang : Asy Syifa'

***)Ahmad Rif' ai Rif'an. 2013. Man Shabara Zhafira. Jakarta : Elex Media Komputindo

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Fracilia Arinda Ratnasari

NIM : 112210101015

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Penentuan Kadar Fenol Total pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektroskopi NIR dan Kemometrik” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 19 November 2015

Yang menyatakan,



Fracilia Arinda Ratnasari

NIM. 112210101015

SKRIPSI

**PENENTUAN KADAR FENOL TOTAL PADA EKSTRAK DAUN TANAMAN
MENGUNAKAN METODE SPEKTROKOPI NIR
DAN KEMOMETRIK**

Oleh

Fracilia Arinda Ratnasari
NIM 112210101015

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.

Dosen Pembimbing Anggota : Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm.

PENGESAHAN

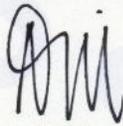
Skripsi berjudul “Penentuan Kadar Fenol Total pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektroskopi NIR dan Kemometrik” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

Hari, tanggal : Kamis, 19 November 2015

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

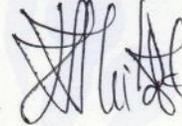
Dosen Pembimbing Utama,



Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.

NIP 197604142002122001

Dosen Pembimbing Anggota,

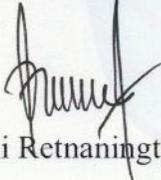


Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm.

NIP 198204062006042001

Tim Penguji

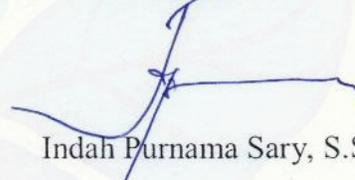
Dosen Penguji I,



Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt.

NIP 197806092005012004

Dosen Penguji II,



Indah Purnama Sary, S.Si., Apt., M.Farm.

NIP 198304282008122004

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



Lestyo Wulandari S.Si., Apt., M.Farm.

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Penentuan Kadar Fenol Total pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektroskopi NIR dan Kemometrik: Fracilia Arinda Ratnasari, 112210101015; 2015; 66 halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

Senyawa fenol merupakan senyawa yang memiliki satu atau lebih cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Fenol dan polifenol yang terkandung pada tanaman memainkan peran penting dalam kesehatan jangka panjang, mengurangi risiko penyakit kronis dan degeneratif. Senyawa fenol dapat memiliki aktivitas antioksidan, antitumor, antiviral, dan antibiotik. Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar fenol total dengan menggunakan instrumen spektroskopi inframerah karena metode analisis yang umum digunakan untuk menentukan kadar fenol total membutuhkan tahapan analisis yang panjang dan waktu analisis yang cukup lama. Keuntungan menggunakan metode spektroskopi inframerah diantaranya adalah bersifat non destruktif, jumlah sampel yang dibutuhkan sedikit, hampir semua bentuk sampel dapat diteliti, dan hampir tidak memerlukan pelarut kimia sehingga lebih ramah lingkungan.

Penetapan kadar dengan metode spektroskopi NIR dan kemometrik ini memerlukan suatu analisis data multivariat (kemometrik) untuk mengetahui informasi spektrum yang diperlukan dari spektrum inframerah dan menggunakan informasi spektrum tersebut untuk aplikasi kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan perangkat lunak *The Unscrambler X 10.2*. Teknik yang digunakan dari metode kemometrik untuk pembuatan model kalibrasi (analisis kuantitatif) dan model klasifikasi (analisis kualitatif) dalam penelitian ini masing-masing adalah *Partial Least Square (PLS)* dan *Linear Discriminant Analysis (LDA)*. Penetapan kadar ini kemudian divalidasi dengan metode validasi silang (*cross validation*) *Leave-One-Out* dan *2-Fold Cross-Validation* untuk menguji validitas model regresi.

Metode pembandingan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode spektrofotometri UV-Vis menggunakan pereaksi Folin Ciocalteu dan Na_2CO_3 dengan standar asam galat. Berdasarkan hasil penelitian, model PLS dengan spektroskopi NIR memberikan hasil terbaik dengan nilai R^2 kalibrasi sebesar 0.9920369; R^2 validasi sebesar 0.991725; RMSEC sebesar 2,0049472, dan RMSECV sebesar 2,1234381. Validasi model juga memberikan nilai yang baik dengan R^2 LOOCV sebesar 0,9939401 dan R^2 2-Fold-Cross-Validation sebesar 0,9834646, sedangkan model klasifikasi LDA yang digunakan pada pengkategorian antara matriks dengan sampel yang mengandung fenol memiliki akurasi sebesar 100%.

Model PLS dan LDA yang telah terbentuk dan tervalidasi tersebut kemudian diterapkan pada sampel obat herbal yang tersedia di pasaran (Stimuno dan ekstrak daun salam) sehingga diperoleh kadar fenol total. Kadar fenol total yang diperoleh dari spektroskopi NIR sebesar 4,242 mg GAE/g ekstrak untuk sampel Stimuno dan 6,683 mg GAE/g untuk sampel Ekstrak daun salam. Hasil analisis ini kemudian dibandingkan dengan kadar fenol total yang diperoleh dari metode spektrofotometri UV-Vis. Hasil penetapan kadar sampel fenol total yang diperoleh dari dua metode berbeda ini kemudian diuji dengan Uji T Dua Sampel Berpasangan dan dapat ditarik kesimpulan bahwa kadar yang diperoleh tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikansi 0,296 dan t tabel $>$ t hitung, sedangkan pengkategorian sampel nyata dengan model LDA memberikan persentase kemampuan prediksi sebesar 100%.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Penentuan Kadar Fenol Total pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektroskopi NIR dan Kemometrik”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian serta dengan sabar membimbing saya untuk menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;
3. Ibu Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt. selaku Dosen Penguji I dan Ibu Indah Purnama Sary, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dosen Penguji II yang dengan sabar memberikan saran dalam penulisan skripsi ini;
4. Drs.Wiratmo M.Sc., Apt. dan Bapak Dian Agung Pangaribowo S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama saya menjadi mahasiswa;
5. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu, berbagi pengalaman dan selalu memotivasi penulis selama masa perkuliahan, juga staf dan karyawan atas segala bantuan yang diberikan selama saya menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Ibu Wayan dan Mbak Hani selaku teknisi Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Jember yang telah banyak membantu saya selama penelitian;

7. Orang tua tercinta Bapak Taufik Sama dan Ibu Hariati yang senantiasa memberi doa, kasih sayang, semangat dan motivasi yang tidak terhingga untuk mengiringi perjalanan hidup penulis; mas Franky Anggriawan, adik Fikry Aldin Syach dan seluruh keluarga besar yang selalu menjadi penyemangat;
8. Bapak Harsito dan Ibu Endang Sri Haryani yang juga tidak pernah berhenti memberikan semangat dan motivasi kepada penulis selama masa perkuliahan maupun skripsi;
9. Partner skripsi (Mia, Nurul dan Alan) yang selalu siap memberikan bantuan berupa tenaga, pikiran dan juga pundak saat hasil yang didapatkan kurang memuaskan;
10. Semua rekan seperjuangan penelitian bagian Kimia Farmasi yang telah banyak membantu;
11. Teman-teman Angkatan 2011 Fakultas Farmasi Universitas Jember (ASMEF) yang tidak dapat disebutkan satu per satu;
12. Keluarga besar Badan Eksekutif Mahasiswa TA 2013/2014 dan keluarga besar UKMO Fassenden untuk ilmu non akademis yang telah banyak membantu saya;
13. Keluarga kecilku di kos Mastrip 1 no.57B (Willy, Pipit, Elisa, Zul, dek Bertha, dek Catur, mbak Frinda dan mb Elis) yang selalu bersama selama beberapa tahun terakhir ini dalam suka maupun duka;
14. *Dulur-dulur* KKN kelompok 121A Gelombang I TA 2014/2015 Desa Candijati Kecamatan Arjasa (Bimbi, Kahlil, Dandy, dan Soleh) yang telah mengajarkan arti kebersamaan, kekompakan, selalu memberikan semangat, dan saling mengingatkan selama proses pengerjaan skripsi hingga saat ini;
15. Tiwi, Yeni, Pipit, Zul, Vita, Indartho, Yuniar, Anggar, Dhitya, Putri Eka, Naning, Nikma, Aslyni, Willy, Eky, dan Syahrul atas segala masukan, *sharing* pengalaman, cerita dan banyak bantuan yang telah diberikan;

16. Aru Mahendra Wibowo yang selalu sabar memberi semangat, motivasi dan telah menjadi kakak, sahabat serta teman terbaik bagi penulis;
17. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Tuhan Yang Maha Esa. Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 19 November 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Daun	5
2.2 Metabolit Sekunder	6
2.3 Senyawa Fenol	7
2.4 Simplisia dan Ekstrak	8
2.4.1 Simplisia.....	8
2.4.2 Ekstrak.....	8

2.5 Metode Ekstraksi	9
2.6 Metode Penetapan Kadar Fenol dengan Reagen Folin Ciocalteu	11
2.7 Spektrofotometri UV-Visible (UV-Vis)	12
2.7.1 Prinsip	12
2.7.2 Instrumentasi	14
2.8 Spektrofotometri <i>Infrared</i> (IR)	17
2.8.1 Spektroskopi IR Dispersif	19
2.9 Spektrofotometri <i>Near-Infrared</i> (NIR)	20
2.9.1 Prinsip	21
2.9.2 Instrumentasi	22
2.10 Analisis Kemometrik	23
2.10.1 <i>Principal Component Analysis</i> (PCA)	25
2.10.2 <i>Linear Discriminant Analysis</i> (LDA)	26
2.10.3 <i>Partial Least Square</i> (PLS)	26
2.11 Validasi Silang	27
BAB 3. METODE PENELITIAN	29
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	29
3.2 Rancangan Penelitian.....	29
3.3 Bahan dan Alat Penelitian	29
3.3.1 Bahan Penelitian	29
3.3.2 Alat Penelitian	31
3.4 Alur Penelitian.....	32
3.5 Prosedur Penelitian	33
3.5.1 Pengumpulan Sampel untuk <i>Training Set</i> dan <i>Test Set</i>	33
3.5.2 Pembuatan Ekstrak	34
3.5.3 Preparasi Sampel	35

3.5.4	Penentuan Data Spektra NIR dan Data Kadar Fenol Total Spektrofotometri UV-Vis.....	35
3.5.5	Pembentukan Model Klasifikasi dan Kalibrasi	37
3.5.6	Validasi Model PLS dan LDA	38
3.5.7	Aplikasi Sampel pada Ekstrak Nyata	39
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
4.1	Pembuatan Ekstrak Sampel	40
4.2	Penetapan Kadar Fenol Total.....	42
4.2.1	Optimasi Panjang Gelombang Maksimum	42
4.2.2	Penetapan Waktu Inkubasi.....	43
4.2.3	Pengujian Akurasi Kadar Fenol Total Sampel <i>Training Set</i> dan <i>Test Set</i> Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis....	44
4.2.4	Penetapan Kadar Sampel <i>Training Set</i> dan <i>Test Set</i> Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis	45
4.3	Pembentukan Model Kalibrasi dan Klasifikasi	49
4.4	Validasi Model PLS dan LDA	51
4.5	Penerapan Model PLS dan LDA terhadap Sampel	54
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	57
5.1	Kesimpulan.....	57
5.2	Saran	58

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur kimia fenol	7
Gambar 2.2 Reaksi reagen Folin Ciocalteu dengan fenol	12
Gambar 2.3 Diagram tingkat energi elektronik	13
Gambar 2.4 Instrumentasi Spektrofotometri UV-Vis	14
Gambar 2.5 Daerah spektra NIR.....	20
Gambar 2.6 Daerah gugus fungsi dan panjang gelombang spektroskopi NIR pada hasil pertanian	21
Gambar 2.7 Instrumentasi NIR	23
Gambar 2.8 Bagan metode kemometrik.....	24
Gambar 2.9 Prinsip PCA	25
Gambar 3.1 Skema alur penelitian	32
Gambar 4.1 Hasil optimasi panjang gelombang maksimum.....	43
Gambar 4.2 Hasil optimasi waktu inkubasi.....	44
Gambar 4.3 Kurva standar asam galat	47
Gambar 4.4 Data pemetaan model klasifikasi LDA	50
Gambar 4.5 Data korelasi model kalibrasi PLS	51
Gambar 4.6 Hasil validasi LOOCV model PLS	52
Gambar 4.7 Hasil validasi LOOCV model LDA.....	53
Gambar 4.8 Hasil validasi <i>2-fold cross validation</i> model PLS	54

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1	Pembagian daerah radiasi inframerah 18
Tabel 2.2	Identifikasi gugus fungsi pada inframerah 19
Tabel 3.1	Simplisia tanaman yang digunakan..... 30
Tabel 3.2	Ekstrak tanaman yang sudah jadi..... 30
Tabel 3.3	Identitas kode tanaman..... 34
Tabel 3.4	Identitas kategori pengklasifikasian objek 38
Tabel 4.1	Hasil uji akurasi asam galat 45
Tabel 4.2	Hasil penetapan kadar sampel <i>training set</i> 48
Tabel 4.3	Hasil penetapan kadar sampel <i>test set</i> 48
Tabel 4.4	Hasil perhitungan mg GAE/g ekstrak sampel nyata dengan spektroskopi NIR dan dengan metode pembandingan (metode spektrofotometri UV-Vis)..... 54

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Alat dan bahan yang digunakan.....	67
A.1 Simplisia kering dan simplisia yang telah dihaluskan	67
A.2 Sampel <i>training set</i> dan <i>test set</i>	67
A.3 Sampel nyata.....	68
A.4 Instrumen yang digunakan.....	68
A.5 Kompartemen sampel.....	68
B. Spektrum hasil <i>scanning</i> dengan NIR.....	69
C. Identitas sampel ekstrak	71
C.1 Sampel <i>training set</i>	71
C.2 Sampel <i>test set</i>	72
C.3 Sampel nyata.....	72
D. Perhitungan persentase rendemen.....	72
E. Data penetapan kadar fenol total menggunakan Spektrofotometri UV-Vis	73
E.1 Standar asam galat.....	73
E.2 Ekstrak sampel	74
F. Pembuatan larutan pada penetapan kadar fenol total	74
F.1 Perhitungan pembuatan larutan induk asam galat.....	74
F.2 Perhitungan pembuatan larutan sampel.....	75
G. Pembuatan larutan Folin Ciocalteu 1:10	77
H. Pembuatan larutan Na ₂ CO ₃ 75%	77
I. Hasil spektra optimasi panjang gelombang maksimum fenol total.....	77
I.1 Grafik spektra optimasi panjang gelombang maksimum	77
I.2 Data spektra optimasi panjang gelombang maksimum.....	78
J. Pengujian akurasi	81

K. Hasil pengukuran kadar fenol total sampel <i>training set</i> , <i>test set</i> , dan sampel nyata dengan spektrofotometer UV-Vis	84
K.1 Contoh perhitungan	84
K.2 Hasil perhitungan mg GAE/g ekstrak seluruh <i>training set</i>	84
K.3 Hasil perhitungan mg GAE/g ekstrak seluruh <i>test set</i>	85
K.4 Hasil perhitungan mg GAE/g ekstrak sampel nyata	86
L. Hasil penetapan waktu inkubasi.....	87
M. Hasil analisis kuantitatif dengan metode kemometrik PLS.....	88
M.1 Model kalibrasi yang terbentuk dari sampel <i>training set</i>	88
M.2 Model klasifikasi yang terbentuk dari sampel <i>training set</i>	89
M.3 Hasil validasi model kalibrasi (LOOCV)	90
M.4 Hasil validasi model klasifikasi (LOOCV)	91
M.5 Hasil validasi model kalibrasi (<i>2-fold-cross-validation</i>).....	91
M.6 Hasil validasi model kalibrasi sampel nyata.....	92
N. Hasil analisis statistik uji T dengan program <i>Statistical Product and Service Solution</i> (SPSS)	93
O. Tabel Distribusi Normal Standar T.....	94

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah sebuah negara kepulauan yang memiliki sumber daya alam hayati yang sangat berlimpah dan beraneka ragam. Indonesia memegang peranan penting dalam keanekaragaman hayati di dunia, karena termasuk dalam sepuluh negara dengan keanekaragaman hayati tertinggi dengan sebutan *mega biodiversity country* (Kementerian Lingkungan Hidup Republik Indonesia, 2014). Jumlah tanaman yang ada di wilayah Indonesia meliputi 30.000 jenis, sekitar 940 jenis di antaranya telah diketahui berkhasiat sebagai obat (Kementerian Kehutanan, 2010).

Obat yang berasal dari tanaman atau obat herbal secara turun-temurun telah digunakan oleh masyarakat Indonesia karena harganya yang relatif terjangkau dan mudah didapat (Lumbessy *et al.*, 2013). Selain itu juga disebabkan adanya keyakinan pada masyarakat bahwa obat tradisional tidak memiliki efek samping pada tubuh (Kardinan dan Kusuma, 2004). Pembuatan obat herbal sebagian besar berasal dari ekstrak, karena ekstrak memiliki kandungan senyawa bermanfaat yang lebih banyak daripada bahan baku awalnya, tahan disimpan dalam waktu lama tanpa mengalami kerusakan (Ma'mun *et al.*, 2006) dan dari segi bobot pemakaiannya lebih sedikit daripada bobot tanaman aslinya (BPOM RI, 2005).

Senyawa dalam tanaman yang dapat digunakan sebagai obat herbal dinamakan metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder sangat bervariasi jumlah dan jenisnya dari setiap tanaman. Beberapa dari senyawa tersebut telah diisolasi dan sebagian diantaranya memberikan efek fisiologis dan farmakologis yang lebih dikenal dengan senyawa kimia aktif (Copriyadi *et al.*, 2005).

Adanya senyawa kimia aktif pada tanaman dapat diketahui dengan melakukan uji fitokimia. Uji fitokimia sangat bermanfaat untuk mengetahui dan menginformasikan adanya senyawa kimia aktif yang terkandung dalam tanaman (Harborne, 1987). Kandungan senyawa kimia yang beragam pada berbagai tumbuhan dijumpai secara tersebar ataupun terpusat pada organ tubuh tumbuhan seperti daun, bunga, buah, biji, akar, rimpang, atau kulit batang (Hornok, 1992).

Daun umumnya tipis melebar, kaya akan suatu zat warna hijau yang dinamakan klorofil. Oleh karena itu daun umumnya berwarna hijau dan menyebabkan tumbuhan atau daerah-daerah yang ditempati tumbuhan nampak hijau pula (Tjitrosoepomo, 2005). Fungsi utama daun adalah melakukan proses fotosintesis (Haryadi, 2013). Bagian tanaman terutama pada sel tanaman yang mengalami fotosintesis banyak ditemukan senyawa fenol (Kumar dan Pandey, 2013).

Senyawa fenol adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang menempel pada cincin aromatik. Pada tanaman, senyawa fenol akan disintesis pada kloroplas daun dan akan menumpuk di dalam vakuola sel daun yang dimanfaatkan untuk memperkuat dinding sel sekunder (Kefeli *et al.*, 2003). Senyawa fenol digunakan secara luas sebagai antioksidan untuk mencegah penyakit jantung, mengurangi peradangan, menurunkan kejadian kanker dan diabetes (Khoddami *et al.*, 2013).

Ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya senyawa fenol di dalam tanaman, diantaranya penelitian yang telah dilakukan Arina dan Rohman (2013) tentang identifikasi senyawa fenol menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada tanaman *Phyllanthus urinaria* L di Indonesia. Sedangkan dalam *review* Khoddami *et al* (2013) senyawa fenol dalam tanaman dapat dianalisis menggunakan Kromatografi Kertas (KK), Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Gas (KG) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau Elektroforesis Kapiler. Metode-metode tersebut membutuhkan banyak tenaga dan

waktu sehingga diperlukan pengembangan teknik analisis yang cepat dan dapat dipercaya (Rohman *et al.*, 2011)

Spektroskopi *Near-Infrared* (NIR) merupakan suatu pilihan yang efektif karena merupakan teknik analisis non destruktif, dapat menganalisis dengan kecepatan tinggi, tidak menimbulkan polusi, dan tidak memerlukan bahan kimia (Karlinasari *et al.*, 2012). Spektrofotometer NIR merupakan salah satu instrumen dalam analisis farmasetika yang dikenal secara luas digunakan untuk pengujian bahan baku, proses *monitoring* dan kontrol kualitas (Gowen *et al.*, 2008). Spektroskopi NIR kini menjadi penting dalam analisis sampel farmasetika dikarenakan ketangguhan (*ruggedness*) yang sangat menonjol dari instrumen tersebut (Abrahamsson, 2005). Namun pita spektra NIR sangat rumit dan tumpang tindih sehingga sulit diinterpretasikan. Oleh karena itu diperlukan bantuan metode statistik multivariat (Ahuja, 2006).

Manfaat dari metode statistik multivariat tersebut adalah kemampuannya dalam mengekstrak informasi spektrum yang diperlukan dari spektrum inframerah dan menggunakan informasi spektrum tersebut untuk aplikasi kualitatif dan kuantitatif. Metode statistik multivariat sering disebut dengan metode kemometrik (Ritz *et al.*, 2011). Pada penelitian ini digunakan metode kemometrik *Linear Discriminant Analysis* (LDA) dan *Partial Least Square* (PLS), karena merupakan metode yang paling banyak digunakan secara luas. LDA merupakan metode analisis kualitatif yang dilakukan untuk mengklasifikasikan suatu model yang telah dibuat. Sedangkan PLS merupakan metode analisis kuantitatif yang dilakukan untuk mengkalibrasi dan menghitung nilai kadar total dari model yang telah dibuat.

Hasil nilai kadar yang didapat dari analisis kuantitatif nantinya akan dibandingkan dengan hasil nilai kadar pada analisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis sebagai pembanding. Mengacu pada uraian tersebut, maka dalam penelitian ini akan dilakukan penentuan kadar fenol total pada ekstrak daun tanaman menggunakan metode spektroskopi NIR dan kemometrik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah yang diperoleh adalah:

- a. Apakah model PLS dan LDA dapat digunakan untuk menentukan kadar fenol total dan menentukan klasifikasi antara ekstrak daun yang mengandung fenol dan matriks pada beberapa ekstrak daun tanaman?
- b. Apakah kadar fenol total pada sampel nyata yang ditetapkan dengan metode NIR-kemometrik dan metode spektrofotometri UV-Vis (pembanding) memiliki perbedaan yang signifikan?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas maka tujuan penelitian ini adalah:

- a. Menentukan model PLS dan LDA untuk menentukan kadar fenol total dan menentukan klasifikasi antara ekstrak daun yang mengandung fenol dan matriks pada beberapa ekstrak daun tanaman.
- b. Mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara kadar fenol total yang ditetapkan dengan metode NIR-kemometrik dibandingkan dengan metode spektrofotometri UV-Vis (pembanding).

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini antara lain:

- a. Memberikan informasi tentang identifikasi senyawa fenol total pada tanaman melalui spektrum inframerah dengan menggunakan metode analisis kemometrik.
- b. Memberikan pengetahuan tentang metode analisis fenol total yang lebih sederhana, cepat dan mudah.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun

Daun (*folium*) merupakan satu dari struktur utama pada tanaman. Dalam proses nya daun melakukan fungsi eksternal yaitu melakukan respirasi, transpirasi dan absorpsi cahaya (Haryadi, 2013). Daun hanya terdapat pada batang saja dan tidak pernah terdapat pada bagian lain pada tubuh tumbuhan (Tjitrosoepomo, 2005).

Daun memiliki bentuk dan ukuran yang bervariasi, mulai dari yang berbentuk duri kecil hingga yang berbentuk lebar. Sekalipun bentuk dan ukuran daun tampak bervariasi, pada dasarnya daun terdiri dari tiga bagian, yaitu bagian pelepah (vagina), tangkai daun (petiolus) dan helaian daun (lamina). Daun yang memiliki ketiga bagian tersebut dinamakan daun lengkap. Pada sebagian besar tumbuhan, daun hanya terdiri dari satu atau dua bagian saja. Daun-daun yang demikian dinamakan sebagai daun tak lengkap (Latifa, 2015).

Daun terdiri dari sistem jaringan dermal, yakni jaringan epidermis, jaringan pembuluh, dan jaringan dasar yang disebut mesofil. Daun umumnya tidak mengalami penebalan sekunder sehingga epidermis bertahan sebagai sistem dermal, namun pada sisik tunas yang bertahan lama ada kemungkinan dibentuk periderm (Hidayat, 1995).

Fungsi utama daun adalah membuat makanan melalui fotosintesis. Hal ini terjadi dalam helaian daun yang tipis. Pada kebanyakan dikotil, helaian daun menempel pada batang dengan tangkai daun (petiola). Sistem pembuluh pada batang meluas sampai ke tangkai daun, dan tulang daun ke dalam helaian daun itu sendiri (Cutter, 1989).

2.2 Metabolit Sekunder

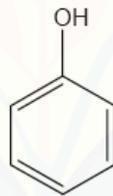
Metabolisme adalah koordinasi dari gabungan konversi enzimatik pada organisme hidup, salah satunya terjadi pada tanaman (Fits dan Memelink, 2000). Senyawa organik yang dihasilkan dan terlibat dalam metabolisme itu disebut sebagai metabolit. Jalur metabolisme yang secara umum mensintesis dan memodifikasi senyawa-senyawa karbohidrat, protein, lemak, dan asam nukleat disebut metabolisme primer. Sedangkan segala senyawa yang terlibat di dalam jalur metabolisme primer disebut sebagai metabolit primer. Metabolit dan metabolisme primer dibutuhkan untuk menunjang terjadinya proses kehidupan pada setiap organisme. Contoh proses metabolisme primer adalah degradasi senyawa karbohidrat dan gula yang biasanya terjadi melalui jalur glikolisis dan siklus Krebs/asam sitrat/trikarboksilat yang menghasilkan energi melalui reaksi oksidasi (Sudibyo, 2002). Contoh metabolit primer yaitu asam amino, asam organik, fitosterol, dan nukleotida (Croteau *et al.*, 2000).

Sedangkan senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa yang disintesis oleh suatu makhluk hidup bukan untuk memenuhi kebutuhan dasarnya, akan tetapi untuk mempertahankan eksistensinya dalam berinteraksi dengan ekosistem. Sampai dengan saat ini telah diidentifikasi lebih dari 100.000 senyawa metabolit sekunder. Metabolit sekunder yang berasal dari metabolisme sekunder ini hanya ditemukan pada organisme spesifik atau bahkan strain (galur) yang spesifik dan hanya diproduksi pada kondisi-kondisi tertentu. Secara khusus, senyawa metabolit sekunder mempunyai fungsi umum yaitu sebagai alat penolak (*repellant*) terhadap gangguan hama atau hewan pemangsanya, sebagai alat pelindung (*protectant*) terhadap kondisi lingkungan fisik yang ekstrim (Sudibyo, 2002) serta pelindung dari zat-zat yang bersifat merusak (Fits dan Memelink, 2000). Contoh metabolit sekunder adalah senyawa alkaloid, senyawa kurkumin, senyawa saponin, senyawa glukosida, senyawa flavonoid, dan senyawa fenol (Saxena *et al.*, 2013)

2.3 Senyawa Fenol

Senyawa fenol merupakan senyawa yang memiliki gugus hidroksil yang menempel pada cincin aromatik (Vermerris dan Nicholson, 2006). Senyawa fenol memiliki titik leleh rendah dan bau khas yang sedikit menyengat. Selain itu juga mudah larut dalam sebagian besar pelarut organik (hidrokarbon aromatik, alkohol dan keton) dan agak kurang larut dalam hidrokarbon alifatik. Fenol membentuk campuran azeotropik dengan air dan zat lainnya (Rappoport, 2003).

Senyawa yang memiliki lebih dari satu gugus hidroksil fenolik yang menempel pada satu atau lebih cincin aromatik disebut sebagai senyawa polifenol (Vermerris dan Nicholson, 2006). Struktur kimia dari fenol dapat dilihat pada Gambar 2.1. Turunan senyawa fenol merupakan metabolit sekunder terbesar yang diproduksi oleh tanaman melalui jalur sikimat dan metabolisme fenil propanoid (Vermerris dan Nicholson, 2006). Fenol terbagi menjadi fenol sederhana, kumarin, lignin, lignan, tannin terkondensasi, tannin terhidrolisis, asam fenolat dan flavonoid (Khoddami *et al.*, 2013)



Gambar 2.1. Struktur kimia fenol (Vermerris dan Nicholson, 2006)

Fenol dan polifenol yang terkandung pada tanaman memainkan peran penting dalam kesehatan jangka panjang, mengurangi risiko penyakit kronis dan degeneratif. Senyawa fenol dapat memiliki aktivitas antioksidan, antitumor, antiviral, dan antibiotik (Apak *et al.*, 2007). Selain itu juga berfungsi sebagai pertahanan terhadap radiasi ultraviolet atau perlindungan diri dari patogen, parasit, predator serta memberi warna pada tanaman (Dai dan Mumper, 2010).

2.4 Simplisia dan Ekstrak

2.4.1 Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah berupa tanaman utuh bagian tanaman atau eksudat tanaman yang digunakan sebagai obat dan belum mengalami pengolahan secara sederhana serta belum merupakan zat murni kecuali dinyatakan lain berupa bahan yang telah dikeringkan (BPOM, 2005).

Menurut Materia Medika Indonesia Jilid VI (1995), simplisia dapat digolongkan dalam tiga kategori, yaitu :

a. Simplisia nabati

Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman. Eksudat adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau isi sel yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya dan belum berupa zat kimia.

b. Simplisia hewani

Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan atau bagian hewan zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni.

c. Simplisia pelikan (mineral)

Simplisia pelikan adalah simplisia yang berupa bahan-bahan pelikan (mineral) yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia.

2.4.2 Ekstrak

Menurut Farmakope Indonesia edisi V (2014), ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan.

Menurut Voigh (1995), ekstrak dikelompokkan atas dasar sifatnya yaitu:

- a. Ekstrak encer adalah sediaan yang memiliki konsistensi semacam madu dan dapat dituang.
- b. Ekstrak kental adalah sediaan yang dilihat dalam keadaan dingin dan tidak dapat dituang. Kandungan airnya berjumlah sampai 30%. Tingginya kandungan air menyebabkan ketidakstabilan sediaan obat karena cemaran bakteri.
- c. Ekstrak kering adalah sediaan yang memiliki konsistensi kering dan mudah dituang, sebaiknya memiliki kandungan lembab tidak lebih dari 5%.
- d. Ekstrak cair, ekstrak yang dibuat sedemikiannya sehingga 1 bagian simplisia sesuai dengan dua bagian ekstrak cair.

2.5 Metode Ekstraksi

Pada prinsipnya ekstraksi adalah melarutkan dan menarik senyawa dengan menggunakan pelarut yang tepat. Ada tiga tahapan proses pada waktu ekstraksi (Emilan *et al*, 2011) yaitu:

- a. Penetrasi pelarut kedalam sel tanaman dan pengembangan sel.
- b. Disolusi pelarut ke dalam sel tanaman dan pengembangan sel.
- c. Difusi bahan yang terekstraksi ke luar sel.

Ketiga proses di atas diharapkan terjadinya kesetimbangan antara bahan terlarut dan pelarut. Kecepatan untuk mencapai kesetimbangan umumnya tergantung pada suhu, pH, ukuran partikel, dan gerakan partikel. Prinsip yang utama adalah yang berkaitan dengan kelarutan, yaitu senyawa polar lebih mudah larut dalam pelarut polar dan senyawa non polar akan mudah larut dalam pelarut non polar (Emilan *et al*, 2011).

Terdapat beberapa macam cara untuk melakukan ekstraksi berdasarkan bahan yang akan kita ambil diantaranya:

a. Cara Dingin

Ekstraksi cara dingin adalah ekstraksi tanpa menggunakan pemanasan yang bertujuan untuk melindungi senyawa yang tidak stabil terhadap pemanasan.

1) Maserasi

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat yang cocok ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan penyari 75 bagian, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil diaduk sekali-kali setiap hari lalu diperas dan ampasnya dimaserasi kembali dengan cairan penyari. Penyarian diakhiri setelah pelarut tidak berwarna lagi, lalu dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan pada tempat yang tidak bercahaya, setelah dua hari lalu endapan dipisahkan (Harborne, 1987).

b. Cara Panas

Ekstraksi cara panas adalah ekstraksi menggunakan pemanasan yang bertujuan untuk mempercepat ekstraksi. Senyawa yang stabil dalam pemanasan adalah senyawa yang cocok digunakan dalam metode ini (BPOM, 2000).

c. Destilasi Uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara terus menerus sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian. Destilasi uap, bahan (simplisia) benar-benar tidak tercelup ke air yang mendidih, namun dilewati uap air sehingga senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi. Destilasi uap dan air, bahan (simplisia) bercampur sempurna atau sebagian dengan air mendidih, senyawa kandungan menguap tetap kontinu ikut terdestilasi (BPOM, 2000).

d. Cara Ekstraksi Lainnya

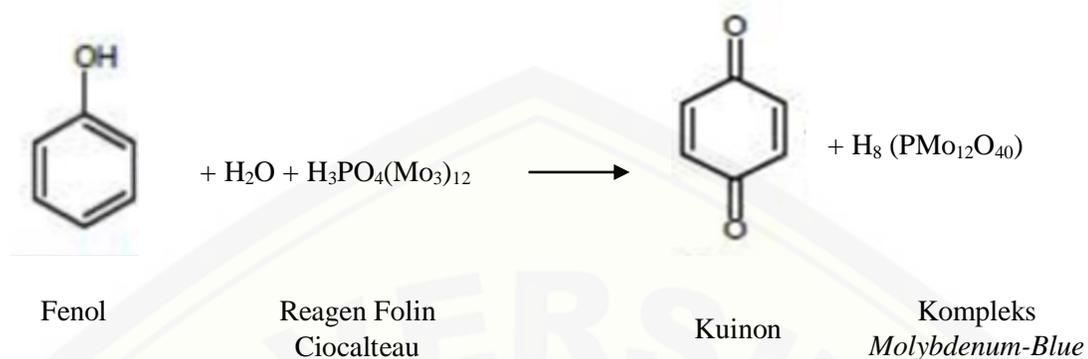
1) Ekstraksi ultrasonik

Getaran ultrasonik (16-20 kHz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel menimbulkan gelembung spontan sebagai stress dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Sifat dari ultrasonik adalah non destruktif dan non invasive sehingga mudah diadaptasikan ke berbagai aplikasi pada medium padat, cair dan gas. Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi (Sari, 2012).

2.6 Metode Penetapan Kadar Fenol dengan Reagen Folin-Ciocalteu

Senyawa fenol dalam ekstrak tumbuhan bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu untuk membentuk kompleks yang dapat diukur oleh cahaya tampak spektrofotometri. Senyawa fenol akan mereduksi senyawa molibdat dan tungstat dalam Folin Ciocalteu membentuk larutan kromofor yang berwarna biru (Singleton *et al.*, 1999), dimana penyerapan maksimum gugus kromofor tergantung pada larutan alkali dan konsentrasi senyawa fenolik (Blainski, 2013).

Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang terbentuk sehingga warna biru yang dihasilkan semakin pekat (Singleton dan Rosi, 1965). Reaksi reagen Folin Ciocalteu dengan fenol dapat dilihat pada Gambar 2.2. Singleton dan Rosi (1965), juga menyatakan bahwa penambahan Na_2CO_3 pada uji fenolik bertujuan untuk membentuk suasana basa agar terjadi reaksi reduksi folin oleh gugus hidroksil dari fenolik di dalam sampel. Metode ini memiliki kelebihan diantaranya relatif cepat, ekonomis dan sederhana (Khoddami *et al.*, 2013).



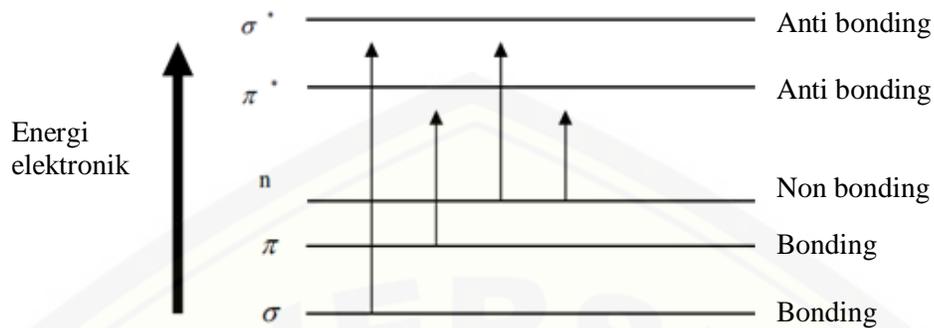
Gambar 2.2. Reaksi reagen Folin Ciocalteu dengan fenol (Tursiman, 2012)

2.7 Spektrofotometri UV-Visible (UV-Vis)

2.7.1 Prinsip

Teknik spektroskopi adalah salah satu teknik analisis fisiko-kimia yang mengamati tentang interaksi antara atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik (REM). Radiasi elektromagnetik panjang gelombang 380nm-780nm merupakan radiasi yang dapat diterima oleh panca indera mata manusia, sehingga dikenal sebagai cahaya tampak (visibel), sedangkan di luar rentang panjang gelombang cahaya tampak, REM sudah tidak dapat ditangkap oleh panca indera. Ada tiga macam distribusi elektron di dalam suatu senyawa organik secara umum yang selanjutnya dikenal sebagai orbital elektron pi (π), sigma (σ) dan elektron tidak berpasangan (n) (Mulja dan Suharman, 1995).

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah sinar tampak tergantung pada energi elektronik molekul. Penyerapan sejumlah energi menghasilkan transisi elektron dari orbital tingkat dasar ke orbital yang berenergi lebih tinggi dalam keadaan tereksitasi yang dikenal sebagai orbital elektron *anti bonding* (Mulja dan Suharman, 1995). Diagram tingkat energi elektron pada keadaan dasar dan keadaan tereksitasi dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Diagram tingkat energi elektronik (Mulja dan Suharman, 1995).

Semua gugus atau gugusan atom yang mengabsorpsi radiasi UV-Vis disebut sebagai gugus kromofor. Gugus kromofor memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang menyebabkan suatu senyawa memiliki warna. Molekul yang mengandung dua gugus kromofor atau lebih akan mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang yang hampir sama dengan molekul yang hanya mempunyai satu gugus kromofor tertentu, tetapi intensitas absorpsinya adalah sebanding dengan jumlah kromofor yang ada (Triyati 1985)

Analisis dengan spektrofotometri UV-Vis selalu melibatkan pembacaan absorbansi radiasi elektromagnetik oleh molekul atau radiasi elektromagnetik yang diteruskan. Keduanya dikenal sebagai absorbansi (A) tanpa satuan dan transmittansi dengan satuan persen ($\%T$). Apabila suatu radiasi elektromagnetik dikenakan kepada suatu larutan dengan intensitas radiasi semula (I_0) maka sebagian radiasi tersebut akan diteruskan (I_t) dipantulkan (I_r) dan diabsorpsi (I_a) sehingga didapatkan persamaan $I_0 = I_t + I_r + I_a$(1)

Persamaan diatas dengan harga I_r ($\pm 4\%$) dapat diabaikan karena pengerjaan dengan metode Spektrofotometri UV-Vis dipakai larutan pembanding sehingga persamaan 1 dapat disederhanakan seperti berikut

$$I_0 = I_t + I_a$$
.....(2)

Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas serapan yang diteruskan oleh larutan penyerap berbanding lurus dengan tebal dan kadar larutan

$$T = \frac{I_t}{I_0} = 10^{-\epsilon cb} \dots\dots(3)$$

$$A = \log \frac{1}{T} = \epsilon.c.b.\dots\dots(4)$$

Keterangan :

T : persen transmittan

I_0 : intensitas radiasi yang datang

I_t : intensitas radiasi yang diteruskan

ϵ : absorbansi molar

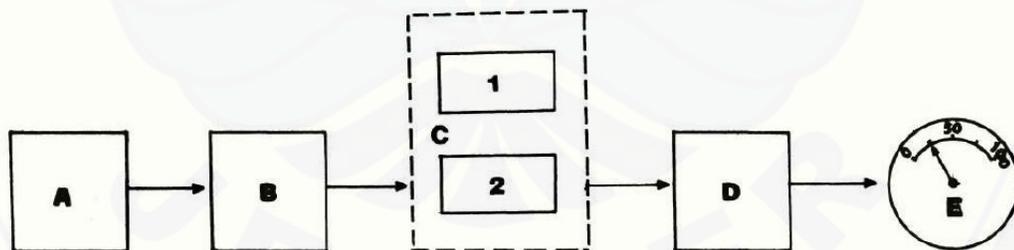
c : konsentrasi

b : tebal larutan (cm)

A : absorban

2.7.2 Instrumentasi

Pada umumnya konfigurasi dasar setiap spektrofotometer UV-Vis berupa susunan peralatan optik yang tersusun sedemikian rupa dan memegang fungsi dan peranan masing-masing yang saling terkait fungsi dan perannya. Setiap fungsi dan peranan tiap bagian dituntut ketelitian dan ketepatan yang optimal, sehingga akan diperoleh hasil pengukuran yang tinggi tingkat ketelitian dan ketepatannya. Instrumentasi Spektrofotometri UV-Vis ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Instrumentasi Spektrofotometri UV-Vis (Triyati, 1985)

Keterangan :

A : sumber cahaya

B : monokromator

C : sel absorpsi (tempat larutan)

C1 : blangko

C2 : pelarut

D : detektor

E : meter atau rekorder

Monokromator berfungsi untuk mendapatkan radiasi monokromatis dari sumber radiasi yang memancarkan radiasi polikromatis. Monokromator pada spektrofotometer UV-Vis biasanya terdiri dari celah (*slit*) masuk-filter-prisma-kisi (*grating*)-celah-keluar. Celah monokromator adalah bagian yang pertama dan terakhir dari suatu sistem optik monokromator pada spektrofotometer UV-Vis. Celah dibuat dari logam yang kedua ujungnya diasah dengan cermat sehingga sama. Lebar celah masuk dan celah keluar harus sama yang dapat diatur dengan memutar tombol mekanik atau diatur dengan sistem elektronik (Mulja dan Suharman, 1995).

Susunan peralatan selanjutnya adalah filter optik yang berfungsi untuk menyerap cahaya berwarna yang sesuai dengan warna filter optik yang dipakai. Adanya filter optik akan menghasilkan pita cahaya sangat sempit sehingga kepekaan analisisnya lebih tinggi, sehingga akan didapatkan cahaya yang hampir monokromatis sehingga akan mengikuti hukum Beer-Lambert. Prisma dan kisi (*grating*) merupakan bagian monokromator yang terpenting. Pada prinsipnya prisma dan kisi akan mendispersi radiasi elektromagnetik sebesar mungkin supaya didapatkan resolusi yang baik dari radiasi polikromatis. Susunan peralatan spektrofotometri UV-Vis yang terakhir adalah detektor. Kualitas detektor akan menentukan kualitas spektrofotometer UV-Vis. Fungsi detektor adalah mengubah sinyal radiasi yang diterima menjadi sinyal elektronik (Mulja dan Suharman, 1995).

Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam analisis dengan spektrofotometer UV-Vis terutama untuk senyawa yang semula tidak berwarna yang akan dianalisis dengan spektrofotometri UV-Vis karena senyawa tersebut harus diubah terlebih dahulu menjadi senyawa yang berwarna. Menurut Rohman (2007), berikut adalah tahap-tahap yang harus diperhatikan:

a. Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis

Hal ini perlu dilakukan jika senyawa yang dianalisis tidak menyerap pada daerah tersebut. Cara yang digunakan adalah dengan merubah menjadi senyawa lain atau direaksikan dengan pereaksi tertentu. Pereaksi yang digunakan harus memenuhi

beberapa persyaratan, yaitu reaksinya selektif dan sensitif, cepat, kuantitatif, reproduibel, dan hasil reaksi stabil dalam jangka waktu yang lama.

b. Waktu operasional

Cara ini biasa digunakan untuk pengukuran hasil reaksi atau pembentukan warna. Tujuannya adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu operasional ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan.

Pada saat awal terjadi reaksi absorbansi senyawa yang berwarna ini meningkat sampai waktu tertentu sehingga diperoleh absorbansi yang stabil. Semakin lama waktu pengukuran maka ada kemungkinan senyawa yang berwarna tersebut menjadi rusak atau terurai sehingga intensitas warnanya turun. Alasan inilah maka untuk pengukuran senyawa berwarna (hasil suatu reaksi kimia) harus dilakukan pada waktu operasional.

c. Pemilihan panjang gelombang

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Memilih panjang gelombang maksimal dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu. Ada beberapa alasan mengapa harus menggunakan panjang gelombang maksimal, yaitu:

- 1) Pada panjang gelombang maksimal, kepekaannya juga maksimal karena pada panjang gelombang maksimal tersebut perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar.
- 2) Disekitar panjang gelombang maksimal bentuk kurva absorbansi datar dan pada kondisi tersebut hukum Lambert-Beer akan terpenuhi.

- 3) Jika dilakukan pengukuran ulang maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan kecil sekali ketika digunakan panjang gelombang maksimal.

d. Pembuatan kurva baku

Seri larutan baku dari zat yang akan dianalisis dibuat dengan berbagai konsentrasi. Masing-masing absorbansi larutan dengan berbagai konsentrasi diukur kemudian dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorbansi (y) dengan konsentrasi (x). Bila hukum Lambert-Beer terpenuhi, maka kurva baku berupa garis lurus. Kemiringan atau slope α (absorptivitas) atau (absorptivitas molar). Kurva baku sebaiknya sering diperiksa ulang. Penyimpangan dua garis lurus biasanya dapat disebabkan oleh kekuatan ion yang tinggi perubahan suhu dan reaksi ikatan yang terjadi.

e. Pembacaan absorbansi sampel atau cuplikan

Absorban yang terbaca pada spektrofotometer hendaknya antara 0,2 sampai 0,8 atau 15% sampai 70% jika dibaca sebagai transmittan. Anjuran ini berdasarkan anggapan bahwa kesalahan dalam pembacaan T adalah 0,001 atau 0,5% (kesalahan fotometrik).

2.8 Spektrofotometri *Infrared* (IR)

Spektrofotometri IR merupakan salah satu teknik analisa yang didasarkan pada penyerapan sinar infra merah oleh molekul senyawa. Metode spektrofotometri ini berguna untuk menentukan gugus fungsional senyawa organik. Cuplikan yang dianalisis dapat berupa zat cair atau zat padat. Pola spektra berupa alur antara % transmisi (% T) terhadap perubahan angka gelombang (Hendayana *et al.*, 1994).

Daerah radiasi spektroskopi inframerah terbagi dalam daerah IR dekat, daerah IR pertengahan, daerah IR jauh, dan daerah IR terpakai untuk analisis instrumental yang dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Pembagian daerah radiasi infra merah

Daerah Infra Merah	Rentang Panjang Gelombang (λ) dalam μm	Rentang Bilangan Gelombang (ν) cm^{-1}	Rentang Frekuensi (ν) (HZ)
Dekat	0,78 - 2,5	13.000 - 4.000	3,8 - 1,2 (10^{14})
Pertengahan	2,5 - 50	4.000 - 200	1,2 - 0,06 (10^{14})
Jauh	50 - 1000	200 - 10	6,0 - 0,3(10^{12})
Terpakai untuk analisis instrumental	2,5 - 15	4.000 - 670	1,2 - 0,2 (10^{14})

Sumber : Mulja dan Suharman (1995)

Daerah IR tengah dapat dibagi dalam empat daerah dan karakter frekuensi gugus umumnya ditentukan berdasar daerah frekuensi yang dihasilkan. Empat daerah tersebut adalah daerah X-H *stretching* ($4000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$), daerah ikatan rangkap tiga ($2500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$), daerah ikatan rangkap dua ($2000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$), dan daerah sidik jari atau *fingerprint* ($1500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$). Pada daerah sidik jari, pita-pita absorpsi berhubungan dengan vibrasi molekul secara keseluruhan. Setiap atom dalam molekul akan saling mempengaruhi sehingga dihasilkan pita-pita absorpsi yang khas untuk setiap molekul (Stuart, 2004). Selain itu juga dapat digunakan diagram korelasi dalam mengidentifikasi gugus fungsi secara umum yang ada pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Identifikasi gugus fungsi pada inframerah

	Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)
O-H	Alifatik dan aromatik	3600-3000
NH ₂	Amina sekunder dan tersier	3600-3100
C-H	Aromatik	3150-3000
C-H	Alifatik	3000-2850
-C≡N	Nitril	2400-2200
-C=C-	Alkuna	2260-2100
COOR	Ester	1750-1700
COOH	Asam karboksilat	1740-1670
C=O	Aldehid dan keton	1740-1660
CONH ₂	Amida	1720-1640
C=C-	Alkana	1670-1610
C-O-C	Eter	1310-1020
C-N	Amina	1280-1180
R-O-R	Alifatik	1160-1060

Sumber : Skoog *et al* (1998)

2.8.1 Spektroskopi IR Dispersif

Instrumen pada spektrometer IR Dispersif terdiri dari sumber radiasi kompartemen sampel, monokromator, detektor, amplifier, dan rekorder. Spektroskopi IR Dispersif menggunakan suatu monokromator untuk memilih masing-masing bilangan gelombang secara berurutan untuk memantau intensitasnya setelah radiasi telah melewati sampel. Monokromator adalah alat yang berfungsi untuk menguraikan cahaya polikromatis menjadi beberapa komponen panjang gelombang tertentu (monokromatis) yang berbeda (terdispersi). Sumber radiasi dipanaskan untuk memancarkan sinar. Sumber radiasi harus cukup *intens* selama rentang bilangan gelombang dan jangkauan transmisi. Jika sinar telah melewati sampel, sinar tersebut akan didispersikan sehingga satu bilangan gelombang atau sedikit bilangan gelombang dapat dipantau secara berurutan oleh detektor yang melintasi rentang spektrum tersebut (Pavia, 2001).

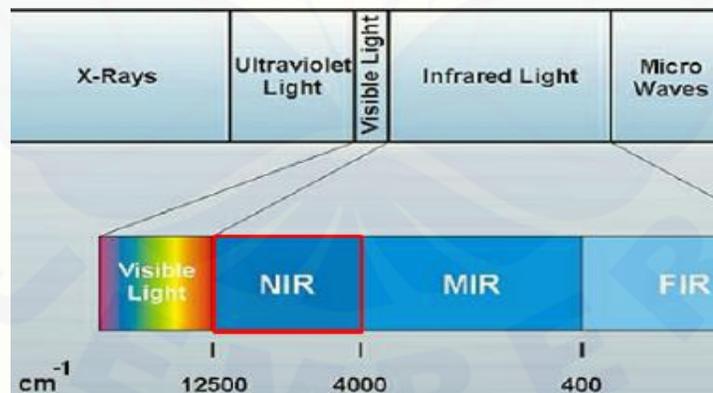
Masalah esensial dari spektrometer IR Dispersif terletak pada monokromator. Pada monokromator spektrometer IR Dispersif terdapat celah masuk dan keluar yang

sempit dimana akan membatasi jangkauan daerah panjang gelombang radiasi terhadap detektor (Stuart, 2004).

2.9 Spektrofotometri *Near-Infrared* (NIR)

Kisaran panjang gelombang NIR telah lama dipelajari dan digunakan sebagai metode analisis. Daerah inframerah dekat telah ditemukan sejak tahun 1800, namun keberadaannya tidak disadari bahwa NIR ini sangat berguna untuk spektroskopi, hal ini dikarenakan pita dari NIR sangat rumit dan bertumpang tindih sehingga sulit diinterpretasikan (Roggo *et al.*, 2007). Untuk mengatasi hal ini dapat dilakukan penghalusan atau penyaringan data spektra. Spektra NIR membaca senyawa organik maupun anorganik kimia yang memiliki pola serapan yang khas dan berbeda satu dengan lainnya pada setiap panjang gelombang infra merah yang diberikan (Karlinsari *et al.*, 2012).

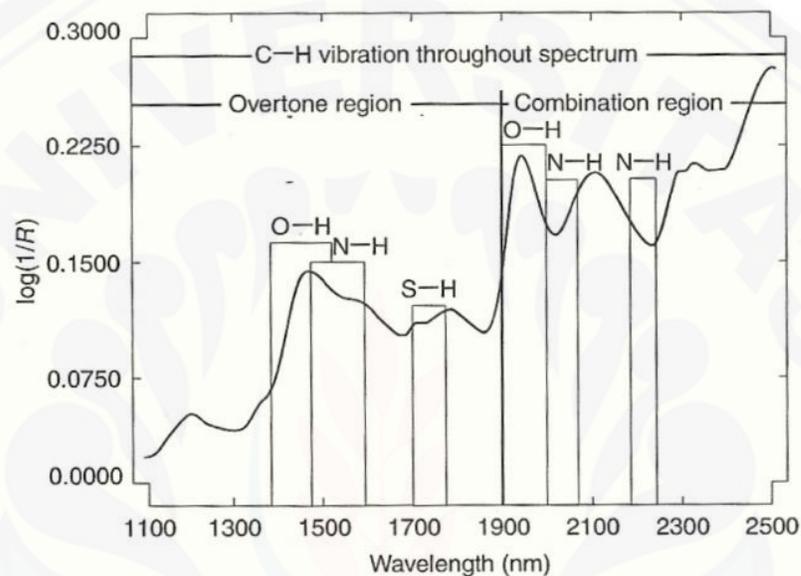
Spektroskopi NIR melingkupi rentang transisi daerah spektra nampak hingga daerah IR tengah. Pada daerah NIR (800-2500 nm) dapat teramati vibrasi dari ikatan-ikatan $-CH$, $-OH$, $-SH$, dan $-NH$ (Burns dalam Roggo, 2007). Daerah spektra NIR ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Daerah spektra NIR (Mantanus, 2012)

Teknologi NIR dikembangkan sebagai salah satu metode yang non destruktif,, dapat menganalisis dengan kecepatan tinggi, tidak menimbulkan polusi, penggunaan

preparat yang sederhana, dan tidak memerlukan bahan kimia. Penyerapan radiasi gelombang inframerah oleh molekul penyusun bahan menyebabkan ikatan tunggalnya bergetar (vibrasi). Getaran ini menyebabkan pita penyerapan naik sesuai kombinasi gugus fungsi kimianya (Karlinsari *et al.*, 2012). Tiap-tiap gugus kimia memiliki panjang gelombang tersendiri (Gambar 2.6).



Gambar 2.6 Daerah gugus fungsi dan panjang gelombang spektroskopi NIR pada hasil pertanian (Burns dan Ciurczak, 2007)

2.9.1. Prinsip

Spektrum NIR berasal dari energi radiasi yang ditransfer menjadi energi mekanik terkait oleh adanya gerakan atom yang dilakukan bersama oleh ikatan kimia dalam suatu molekul. Teknik ini didasarkan pada pengukuran cahaya yang dipantulkan atau ditransmisikan oleh sampel. Pertama-tama, sampel disinari oleh sumber cahaya dengan panjang gelombang berkisar antara 800 sampai 2500 nm. Kemudian cahaya yang dipantulkan atau ditransmisikan oleh sampel dikumpulkan oleh detektor dan diubah menjadi spektrum. Dengan cara inilah spektroskopi NIR memainkan perannya dalam identifikasi dan kuantitasi sampel (Patil *et al.*, 2007).

Spektrum sampel NIR terdiri dari pita yang timbul dari tumpang tindihnya serapan yang sesuai terutama untuk *overtones* dan kombinasi mode getaran yang

melibatkan ikatan kimia -CH, -OH dan -NH. Ikatan kimia ini berada diantara atom dalam molekul yang bergetar dan getaran ini berperan sebagai gerak harmonik sederhana. Ketika frekuensi radiasi telah cocok dengan molekul yang bergetar, maka akan terjadi transfer seluruh energi dari radiasi ke molekul yang dapat diukur sebagai sebidang energi versus panjang gelombang yang disebut sebagai spektrum (Patil *et al.*, 2007).

2.9.2. Instrumentasi

Secara umum instrumentasi NIR dapat dilihat pada Gambar 2.7, yang terdiri dari:

a. Sumber cahaya

Sumber cahaya biasanya lampu halogen tungsten (Reich, 2005). Lampu ini memiliki spektrum kontinyu yang mencakup seluruh daerah NIR. Selain itu, lampu ini murah dan kuat. Salah satu kelemahan dengan lampu halogen tungsten yaitu emisinya bergantung pada temperatur. Efek temperatur dapat diminimalkan dengan menggunakan stabilisasi suhu. Alternatif dari penggunaan lampu halogen tungsten adalah *light emitting diode* (LED). LED memiliki lebar pita spektrum terbatas sekitar 30-50 (Abrahamsson, 2005).

b. Penyeleksi panjang gelombang (monokromator)

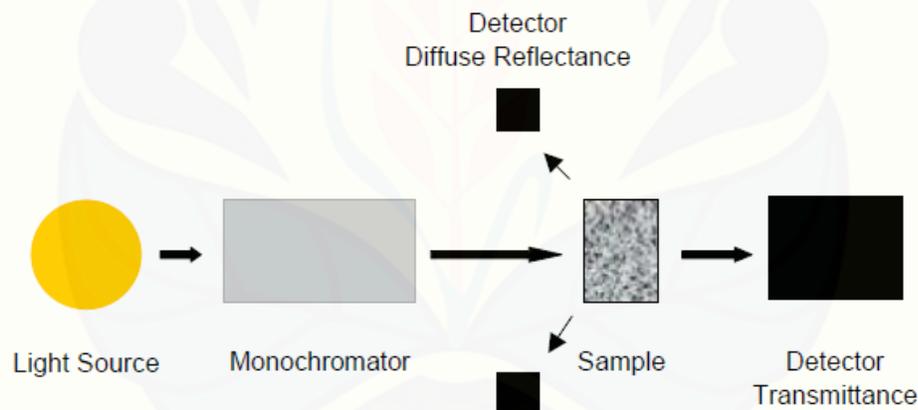
Menurut Abrahamsson (2005), pemilihan panjang gelombang pada NIR dilakukan berdasarkan sistem dispersif. Pada sistem dispersif, kebanyakan cahaya polikromatik dari sumber cahaya terbagi menjadi beberapa panjang gelombang melalui sebuah kisi. Dispersi panjang gelombang yang dicapai dari kisi tersebut berdasarkan pada jumlah alur yang menyala. Celah sempit yang mengarah ke difraksi cahaya besar berarti bahwa sebagian besar kisi-kisi akan diterangi. Jarak yang jauh antara celah dan kisi-kisi juga akan menyebabkan penerangan yang luas dari kisi-kisi.

Pada NIR, hasil yang baik biasanya memiliki ciri absorpsinya lebar, resolusi kisi yang rendah, dengan resolusi antara 1-5 nm.

c. Detektor

Menurut Reich (2005), pemilihan detektor yang digunakan bergantung pada kisaran panjang gelombang yang akan diukur. Adapun jenis detektor yang digunakan pada NIR meliputi:

- 1) Silikon memiliki keuntungan cepat, kebisingan rendah, kecil dan sangat sensitif pada daerah tampak sampai 1100 nm.
- 2) Sulfida Timbal (PbS) bersifat lebih lambat, tetapi sangat populer karena mereka sensitif pada 1100-2500 nm, memberikan rasio *signal-to-noise* yang baik.
- 3) Indium Gallium Arsenide (InGaAs) berharga paling mahal namun sensitif dalam kisaran 800-1700 nm.



Gambar 2.7 Instrumentasi NIR (Reich, 2005)

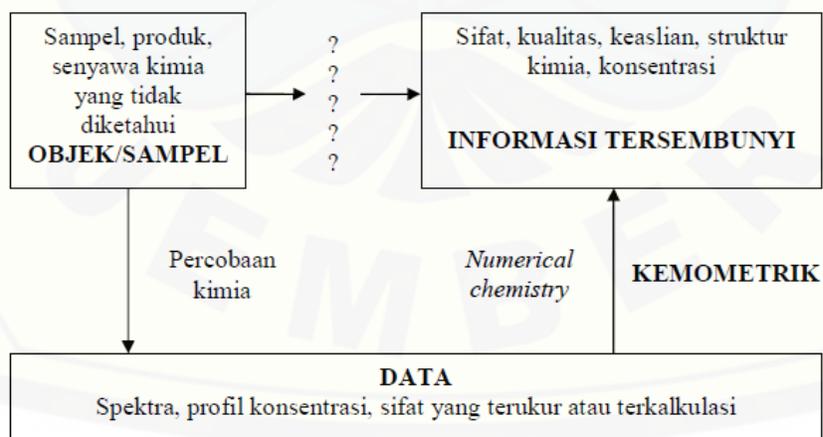
2.10 Analisis Kemometrik

Kemometrik adalah suatu disiplin ilmu di mana menggunakan metode matematika dan statistik untuk pemilihan eksperimental prosedur dari analisis kimia (Roggo *et al*, 2007). Metode kemometrik sering diaplikasikan pada kondisi di mana tidak ada teori yang cukup untuk menyelesaikan atau mendeskripsikan masalah. Pada permasalahan tersebut digunakan banyak variabel (multivariat) untuk

mendeskripsikan sistem, selanjutnya terdapat hubungan tersembunyi antara data yang tersedia dan informasi yang dihasilkan dan tujuan kemometrik adalah untuk menemukan hubungan tersebut (Gambar 2.8). Contoh masalah kimia yang berkembang adalah pengenalan struktur kimia dari data spektrum (klasifikasi spektrum) (Varmuza, 2001).

Analisis secara multivariat adalah analisis yang menggunakan banyak variabel untuk mendeskripsikan sistem. Keuntungan dari sistem multivariat adalah selektivitas sensor yang baik, model multivariat yang lebih memadai dan dapat menangani masalah yang tidak bisa dilakukan pada analisis univariat (Bro, 2003). Analisis multivariat menyediakan metode untuk mengurangi data berukuran besar yang diperoleh dari instrumen, seperti spektrofotometer.

Metode kalibrasi multivariat dapat dibagi berdasarkan kegunaan kualitatif atau kuantitatif. Untuk analisis kualitatif dapat menggunakan *Principal Component Analysis* (PCA), *Linear Discriminant Analysis* (LDA), *Support Vector Regression* (SVM), dan *Soft Independent Modelling of Class Analogy* (SIMCA). Sedangkan untuk analisis kuantitatif dapat diklasifikasikan menjadi *Multiple Linear Regression* (MLR), *Principal Component Regression* (PCR), *Partial Least Square* (PLS), dan *Artificial Neural Network* (ANN) (Roggo *et al.*, 2007).



Gambar 2.8 Bagan metode kemometrik (Varmuza, 2001)

2.10.1 *Principal Component Analysis (PCA)*

PCA merupakan suatu teknik statistik untuk mengubah dari sebagian besar variabel asli yang digunakan dan saling berkorelasi satu dengan yang lainnya menjadi satu set variabel baru yang lebih kecil dan tidak berkorelasi.

Setiap pengukuran multivariat (atau observasi), komponen utama merupakan kombinasi linier dari variabel p awal. Tujuan utama analisis komponen utama ialah untuk mengurangi dimensi peubah yang saling berhubungan dan cukup banyak variabelnya sehingga lebih mudah untuk menginterpretasikan data-data tersebut (Johnson dan Wichern, 2007).

Banyaknya komponen yang bisa diekstrak dari matriks data awal sebanyak variabel yang ada. Matriks 18 data awal (D) didekomposisi menjadi dua matriks lain, yaitu matriks *score* (P) dan matriks *loading* (T). Matriks D menggambarkan jumlah sampel (n) dan intensitas bilangan gelombang spektrum IR (m). Matriks P menggambarkan jumlah sampel (n) dan komponen utama (a) serta menjelaskan variasi dalam sampel. Sedangkan matriks T menggambarkan intensitas (m) dan komponen utama (a) serta menjelaskan pengaruh variabel terhadap komponen utama (Ritz *et al.*, 2011). Prinsip PCA dapat dilihat pada Gambar 2.9.

$$\begin{array}{c} \text{m} \\ \square \\ \text{D} \\ \square \\ \text{n} \end{array} = \begin{array}{c} \text{a} \\ \square \\ \text{P} \\ \square \\ \text{n} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{m} \\ \square \\ \text{T} \\ \square \\ \text{a} \end{array}$$

Gambar 2.9 Prinsip PCA

2.10.2 *Linear Discriminant Analysis (LDA)*

LDA adalah metode yang paling banyak digunakan dengan hasil terbaik. LDA didasarkan pada penentuan fungsi diskriminan linier yang memaksimalkan rasio antara kelas varians dan meminimalkan rasio dalam kelas varian. Pada LDA, kelas seharusnya mengikuti distribusi normal multivariat dan distribusi linier (Berrueta *et al.*, 2007).

Keberhasilan LDA dalam pengkategorian objek dapat diuji dengan beberapa cara. Cara yang paling sederhana adalah dengan menggunakan model klasifikasi yang telah dibuat untuk mengklasifikasikan objek dan menentukan apakah hasil pengklasifikasian tersebut benar atau tidak. Cara ini cenderung memberikan over optimistik karena objek yang diklasifikasi merupakan bagian dari set data yang digunakan untuk membentuk model. Metode yang lebih baik adalah dengan membagi data asli menjadi dua kelompok yang dipilih secara acak (Miller dan Miller, 2010).

Kelompok pertama disebut *training set* yang digunakan untuk menentukan fungsi diskriminan linier. Objek pada kelompok kedua disebut *test set* yang digunakan untuk mengevaluasi kinerja fungsi diskriminan linier dan mengetahui keberhasilan LDA. Cara ketiga adalah dengan menggunakan validasi silang dengan metode *Leave-One-Out (LOO)* dimana satu objek dihilangkan dan fungsi diskriminan linier diperiksa apakah objek yang telah dihilangkan dapat diklasifikasikan dengan benar atau tidak (Miller dan Miller, 2010).

2.10.3 *Partial Least Square (PLS)*

PLS merupakan salah satu teknik kalibrasi multivariat yang sangat luas digunakan dalam analisis kuantitatif data spektroskopi dan elektrokimia. PLS lebih umum digunakan dalam kalibrasi multivariat karena mutu model kalibrasi yang dihasilkan dan kemudahan penerapannya (Abdollahi *et al.*, 2003)

Dalam PLS, metode regresi dihitung menggunakan kuadrat algoritma. Tujuan dari PLS adalah untuk membangun hubungan linear antara dua matriks, yaitu spektral

data (X) dan nilai referensi (Y). Teknik ini merupakan pemodelan untuk X dan Y untuk mengetahui variabel pada matriks X yang menggambarkan matriks Y secara baik. Hal ini dapat dijelaskan dengan representasi dari spektra pada panjang gelombang untuk menunjukkan arah yang akan menjadi kombinasi linear dari panjang gelombang (Roggo *et al.*, 2007).

2.11 Validasi Silang

Metode validasi silang (*cross validation*) adalah metode untuk menguji validitas model regresi dengan menggunakan data uji diluar data yang digunakan dalam *fitting* regresi (Pranowo *et al.*, 2006). Validasi silang merupakan teknik untuk menilai suatu hasil analisis statistik seberapa jauh dapat diimplementasikan ke dalam set data independen. Hal ini terutama digunakan untuk tujuan prediksi, yaitu untuk memperkirakan seberapa akurat model prediksi yang dibuat untuk dapat diimplementasikan. Satu putaran validasi silang melibatkan partisi sampel data ke dalam himpunan bagian komplementer, lalu melakukan analisis terhadap satu subset (disebut *training set*), dan memvalidasi analisis terhadap subset lain (disebut *test set*).

Menurut Kohavi (1995), ada beberapa tipe dan cara validasi silang yaitu (a) *Leave-one-out*, (b) *K-fold cross validation*, dan (c) *2-fold cross validation*.

a. *Leave-one-out*

Seperti diketahui dari namanya, *leave-one-out* (LOOCV) yang berarti meninggalkan satu untuk validasi silang, yaitu dengan melibatkan sampel pengamatan tunggal dari sampel asli digunakan sebagai *training set*. Hal ini dilakukan berulang pada setiap observasi dalam sampel yang digunakan sekaligus sebagai data validasi. LOOCV akan menjadi sama dengan *k-fold*, bila jumlah k-lipatnya sama dengan jumlah sampel asli pengamatan.

b. *K-fold cross validation*

Di dalam validasi silang *k-fold*, seluruh sampel asli dibagi secara acak ke dalam k-sub sampel. dari sebanyak k-sub sampel, sebuah sub sampel tunggal dipertahankan sebagai validasi data untuk pengujian model, dan sisanya k-1 sub

sampel digunakan sebagai training set. Proses validasi silang yang kemudian berulang k-kali (lipatan), dengan masing-masing k-sub sampel digunakan tepat satu kali sebagai validasi data. Hasil k-kali dari lipatan kemudian didapat rata-rata (atau dikombinasi) untuk menghasilkan estimasi tunggal. Keuntungan dari metode ini adalah seluruh sampel pengamatan digunakan secara acak dan berulang sebagai data pelatihan dan validasi.

c. *2-fold cross validation*

Tipe ini merupakan variasi *k-fold cross validation* yang paling sederhana. Pada pelaksanaannya, metode ini biasanya dilakukan dengan membagi data sampel menjadi dua bagian yang sama yaitu *training set* yang digunakan untuk membuat model, sedangkan bagian yang lain untuk *test set* yang berfungsi untuk memvalidasi model yang telah terbentuk.

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember mulai bulan Maret 2015 sampai Oktober 2015.

3.2 Rancangan Penelitian

Langkah penelitian awal yang dilakukan yaitu melakukan ekstraksi pada simplisia tanaman. Ekstraksi simplisia tanaman dilakukan dengan cara ultrasonikasi dan maserasi menggunakan metanol 98%. Dari proses tersebut didapatkan ekstrak kental yang dikeringkan hingga menjadi ekstrak kering. Kadar fenol ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis menggunakan metode Folin Ciocalteu dengan standar asam galat.

Analisis profil fenol dilakukan dengan melihat pola spektra yang dihasilkan melalui spektroskopi NIR yang dikombinsi dengan analisis kemometrik yaitu PLS dan LDA. Dari model yang terbentuk kemudian dievaluasi menggunakan validasi silang dengan metode *Leave-One-Out-Cross Validation* (LOOCV) dan *2-fold-Cross Validation*. Model terpilih selanjutnya digunakan untuk menetapkan kadar fenol dalam sampel nyata. Kadar yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan data kadar yang diperoleh dari metode spektrofotometri UV-Vis.

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun (Tabel 3.1) yang berasal dari UPT Materia Medika, Kota Batu, Malang, ekstrak daun yang telah tersedia (Tabel 3.2), metanol 98% teknis, kertas saring, alumunium foil, aerosil (*pharmaceutical grade*), akuades, Folin Ciocalteu (Merck), Na_2CO_3 teknis (Brataco),

asam galat (Sigma-Aldrich), kapsul stimuno (Dexa Medica), dan kapsul ekstrak daun salam (Herbal Indo Utama).

Tabel 3.1 Simplisia tanaman yang digunakan

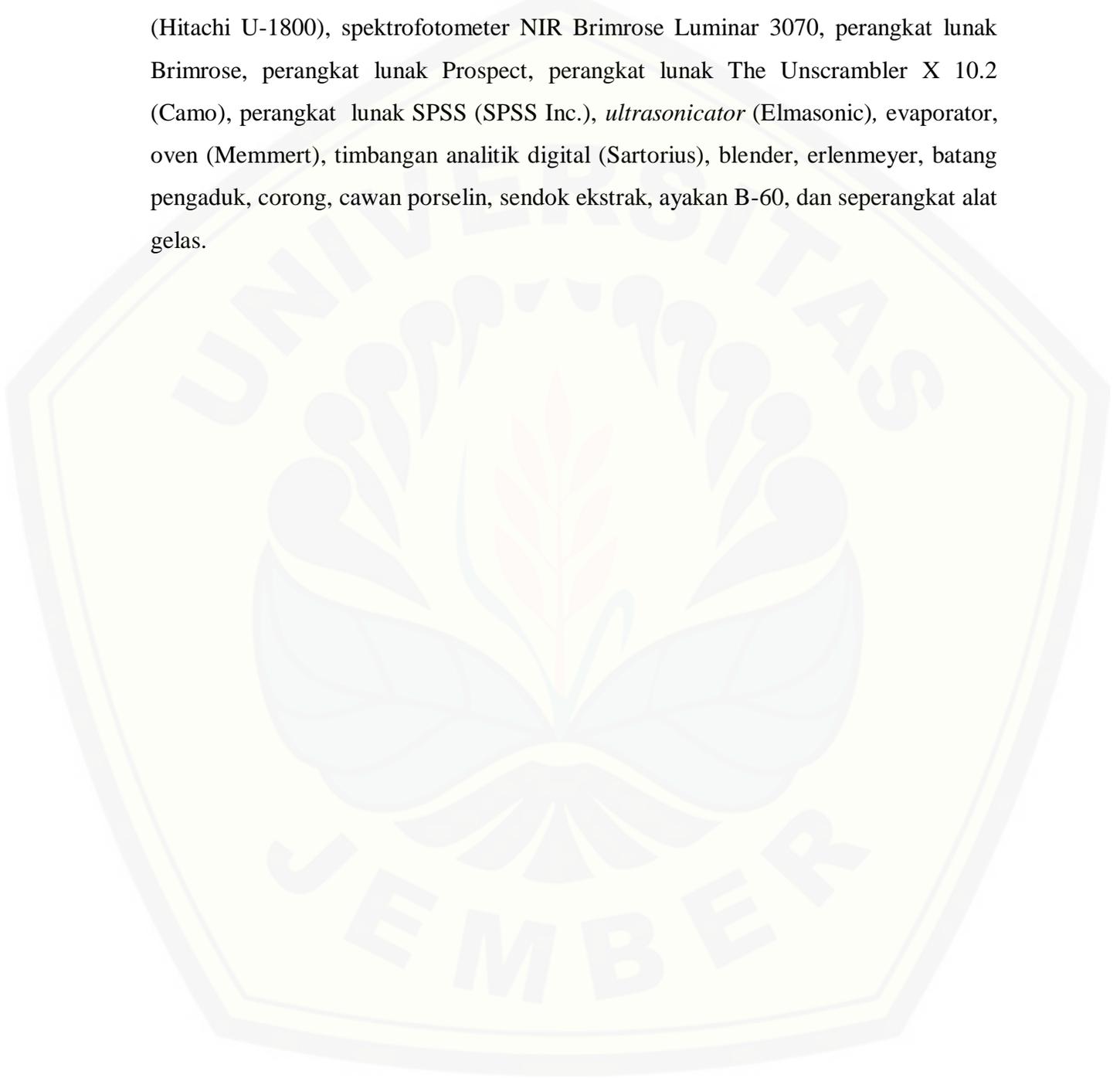
Spesies tanaman	Nama Ilmiah Tanaman
Daun mangga	<i>Mangifera indica</i>
Daun buncis	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Daun pepaya	<i>Carica papaya</i>
Daun sirih	<i>Piper betle</i>
Daun mengkudu	<i>Morinda citrifolia</i>
Daun binahong	<i>Anredera cordifolia</i>
Daun jambu biji	<i>Psidium guajava</i>
Daun lamtoro	<i>Leucaena glauca</i>
Daun sirsak	<i>Annona muricata</i>
Daun belimbing wuluh	<i>Averrhoa bilimbi</i>
Daun pandan	<i>Pandanus amaryllifolius</i>

Tabel 3.2 Ekstrak tanaman yang sudah jadi

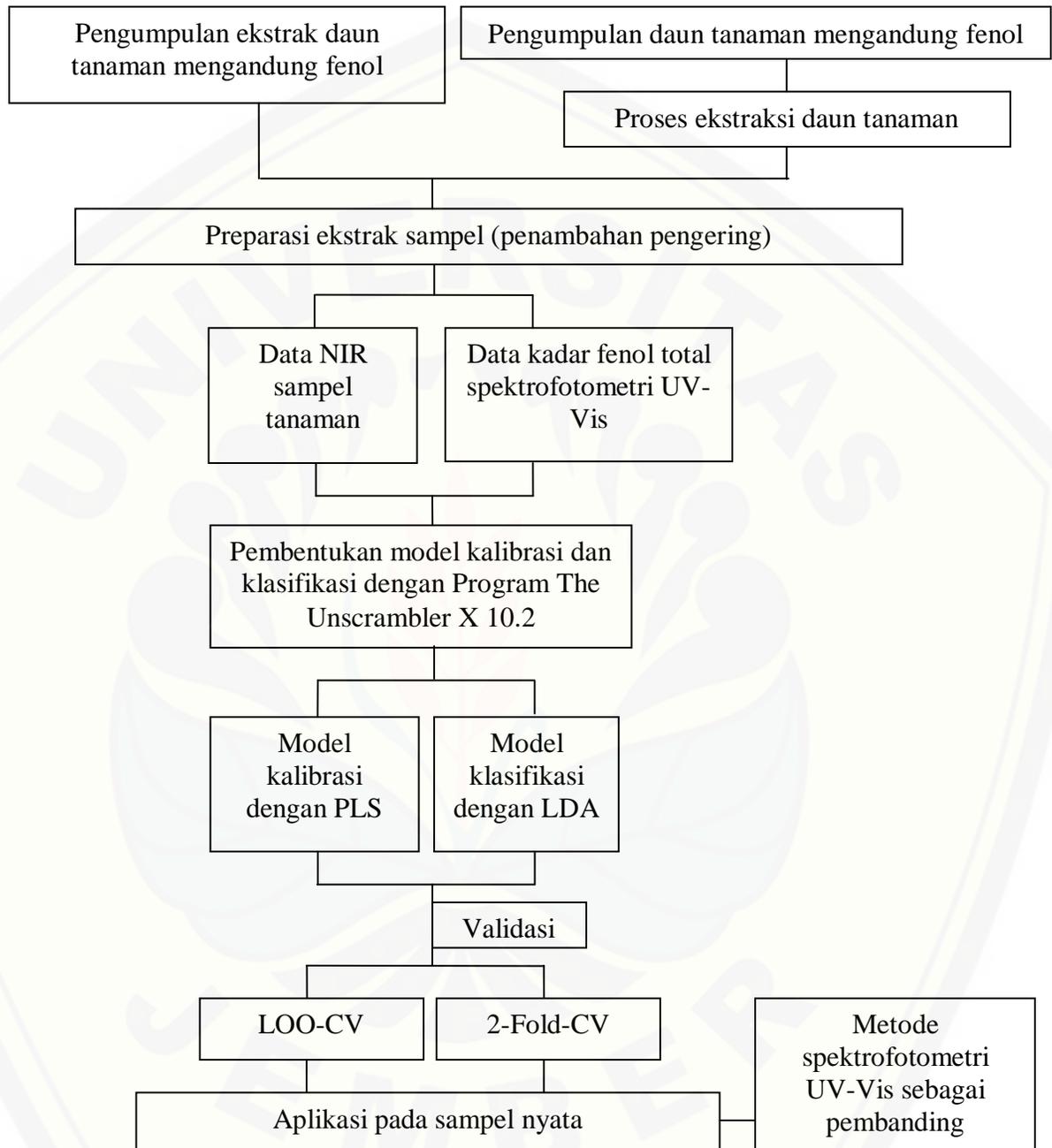
Ekstrak	Nama Ilmiah Tanaman
Daun sirih merah	<i>Piper crocatum</i>
Daun pletekan	<i>Ruellia tuberosa</i>
Daun kopi robusta	<i>Coffea canephora</i>
Daun kopi arabika	<i>Coffea arabica</i>
Daun kluwih	<i>Artocarpus altilis</i>
Daun pare	<i>Momordica charantia</i>
Daun kemangi	<i>Ocimum basilicum</i>

3.3.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-1800), spektrofotometer NIR Brimrose Luminar 3070, perangkat lunak Brimrose, perangkat lunak Prospect, perangkat lunak The Unscrambler X 10.2 (Camo), perangkat lunak SPSS (SPSS Inc.), *ultrasonicator* (Elmasonic), evaporator, oven (Memmert), timbangan analitik digital (Sartorius), blender, erlenmeyer, batang pengaduk, corong, cawan porselin, sendok ekstrak, ayakan B-60, dan seperangkat alat gelas.



3.4 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengumpulan Sampel untuk *Training Set* dan *Test Set*

Sampel diperoleh dari ekstrak daun yang sudah tersedia di laboratorium-laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember dan dari pembuatan ekstrak daun mangga, daun buncis, daun pepaya, daun sirih, daun mengkudu, daun binahong, daun jambu biji, daun lamtoro, daun sirsak, daun belimbing wuluh dan daun pandan.

Pemilihan teknik pengambilan sampel merupakan upaya penelitian untuk mendapat sampel yang representatif (mewakili), yang dapat menggambarkan populasinya. Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah sampel dengan maksud (*purposive sampling*). Pengambilan sampel dilakukan hanya atas dasar pertimbangan peneliti saja yang menganggap unsur-unsur yang dikehendaki telah ada dalam anggota sampel yang diambil (Rozaini, 2003).

Langkah awal dalam proses sampling adalah survei. Survei dilakukan di laboratorium-laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember. Survei dilakukan dengan mendata ekstrak daun yang tersedia dan menentukan ekstrak manakah yang akan digunakan berdasarkan jumlah masing-masing ekstrak. Pengambilan sampel matriks juga dilakukan secara *purposive*, dimana matriks yang dipilih adalah zat yang umum terdapat dalam ekstrak dan pengering yang umum digunakan serta tersedia di laboratorium, yaitu akuades dan aerosil.

Peneliti tidak melakukan identifikasi masing-masing sampel tanaman, sehingga untuk selanjutnya nama tanaman menggunakan identitas kode tanaman (Tabel 3.3). Dari tanaman-tanaman tersebut dipilih tanaman yang digunakan untuk *training set* dan *test set*. *Training set* terdiri dari objek/sampel yang diketahui pengkategorianya dan digunakan untuk membentuk model klasifikasi kemometrik. Sedangkan *test set* terdiri dari objek/sampel yang diketahui pengkategorianya namun digunakan untuk mengevaluasi reliabilitas model yang telah dibentuk oleh *training set* (Berrueta *et al.*, 2007). Tanaman yang digunakan untuk *training set* dan *test set* dapat dilihat pada Lampiran C1 dan C2.

Tabel 3.3 Identitas kode tanaman

No.	Kode	Nama Tanaman
1.	A	Daun kopi arabika muda
2.	B	Daun kopi arabika tua
3.	C	Daun buncis
4.	D	Daun jambu biji
5.	E	Daun kemangi
6.	F	Daun kluwih
7.	G	Daun mengkudu
8.	H	Daun pandan
9.	I	Daun pare
10.	J	Daun pletekan
11.	K	Daun kopi robusta muda
12.	L	Daun kopi robusta tua
13.	M	Daun sirih
14.	N	Daun sirih merah
15.	O	Daun sirsak
16.	P	Daun binahong
17.	Q	Daun belimbing wuluh
18.	R	Daun lamtoro
19.	S	Daun mangga
20.	T	Daun pepaya

3.5.2 Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 250 gram simplisia daun tanaman dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 45°C selama 10 menit untuk menghilangkan kelembaban. Kelembaban ini terjadi selama simplisia dalam proses pengiriman. Masing-masing daun tanaman dihancurkan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk untuk memperbesar luas permukaan. Sebanyak 80 gram serbuk tanaman ditambahkan dengan 800 ml metanol 98%. Kemudian dilakukan ultrasonikasi selama 60 menit pada suhu 25°C. Hasil ekstraksi tersebut kemudian didiamkan selama 24 jam. Ekstrak cair yang didapat kemudian disaring menggunakan kertas saring. Kemudian filtrat yang diperoleh

dipekatkan menggunakan evaporator pada suhu 60°C selama 1,5 jam untuk menguapkan pelarut dan diperoleh ekstrak kental.

3.5.3 Preparasi Sampel

Preparasi sampel yang dilakukan yaitu penambahan aerosil pada ekstrak kental yang diperoleh pada tahap ekstraksi hingga menjadi ekstrak kering. Kemudian ekstrak kering tersebut digerus sampai halus dan diayak dengan ayakan B-60 kemudian disimpan dalam vial yang telah diberi label.

3.5.4 Penentuan Data Spektra NIR dan Data Kadar Fenol Total Spektrofotometri

UV-Vis

a. Penentuan Data Spektra NIR

Metode pengukuran atau pengumpulan spektrum dengan instrumen NIR ini digunakan pada setiap pengukuran untuk memperoleh data NIR sampel *training set*, *test set* maupun sampel nyata yang diambil dari pasaran. Metode yang dilakukan adalah instrumen NIR “Luminar 3070” dihidupkan dan ditunggu selama 30 menit (*warming up*). Selanjutnya dibuka perangkat lunak Brimrose. Sampel yang telah dipreparasi diletakkan diatas plat tempat sampel secara merata. Setiap sampel dilakukan pemindaian 3 kali dan dilakukan 4 kali penembakan pada masing-masing pemindaian. Selanjutnya langkah-langkah tersebut diulangi untuk masing-masing sampel. Setelah selesai, perangkat lunak Brimrose ditutup, spektra hasil scanning kemudian diamati dengan perangkat lunak Prospect. Selanjutnya data yang telah diperoleh diolah dengan perangkat lunak The Unscrambler X 10.2.

b. Penentuan Kadar Fenol Total Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

1) Pembuatan Larutan Uji Ekstrak

Ekstrak metanol daun tanaman ditimbang masing-masing sebanyak 25 mg. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan metanol 98% sampai batas volume sehingga konsentrasi larutan uji ekstrak 2500 µg/ml.

2) Pembuatan Larutan Baku Asam Galat

Standar asam galat ditimbang sebanyak 25 mg, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan metanol 98% sampai batas volume sehingga konsentrasi larutan induk standar asam galat yaitu 1000 µg/ml. Selanjutnya dilakukan pengenceran larutan induk asam galat dengan memipet sejumlah tertentu larutan induk, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambahkan metanol 98% sejumlah tertentu sehingga konsentrasi larutan standar asam galat akhir yaitu 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml dan 120 µg/ml.

3) Pengujian akurasi metode spektrofotometri UV-Vis yang digunakan untuk penetapan kadar asam galat

Pengujian parameter akurasi pada penelitian ini menggunakan metode standar adisi. Pengujian akurasi dilakukan dengan penambahan standar sebanyak 30% dan 60% dari konsentrasi analit dalam sampel sesuai dengan hasil penetapan kadar. Pembuatan sampel akurasi dilakukan dengan menimbang sejumlah tertentu sampel, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml, kemudian dilarutkan dengan metanol (tidak sampai tanda batas). Selanjutnya dilakukan adisi dengan larutan standar dengan konsentrasi 30% dan 60% dari konsentrasi analit yang terkandung dalam sejumlah sampel yang ditimbang. Kemudian tambahkan metanol hingga tanda batas. Setelah itu sebanyak 400 µl larutan adisi ditambahkan dengan 400 µl Folin Ciocalteu dan didiamkan selama 6 menit. Setelah 6 menit, ditambahkan 3200 µl Na₂CO₃. Masing-masing sampel adisi dibuat sebanyak 3 replikasi. Persen perolehan kembali seharusnya tidak melebihi nilai presisi RSD dan berada pada rentang yang sesuai dengan konsentrasi yang digunakan (AOAC, 1998).

4) Penentuan Kadar (Wolfe *et al.*, 2003)

Penentuan kadar fenol total dilakukan dengan cara sampel sebanyak 400 μl dari masing-masing larutan uji ekstrak dan larutan standar ditambahkan dengan 400 μl Folin-Ciocalteu (1:10 v/v air). Setelah itu didiamkan selama 6 menit. Setelah 6 menit, ditambahkan 3200 μl Na_2CO_3 (75 g/L air). Campuran ini didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit dan selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 628 nm. Blangko yaitu semua reagen tanpa larutan ekstrak.

5) Perhitungan

Nilai absorbansi yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi larutan ekstrak dimasukkan ke dalam persamaan regresi larutan standar asam galat sehingga diperoleh kadar fenol total yang ditunjukkan dengan miligram asam galat ekuivalen per gram ekstrak (mg GAE/g ekstrak).

3.5.5 Pembentukan Model Klasifikasi dan Kalibrasi

Data yang diperoleh dari pengukuran spektroskopi NIR diolah dengan menggunakan perangkat lunak The Unscrambler versi X 10.2. Pembentukan model klasifikasi dilakukan dengan metode LDA, dengan langkah-langkah sebagai berikut: software The Unscrambler versi X 10.2 dibuka. Data dimasukkan dengan memilih *file, import data*, lalu dipilih OPUS sehingga akan muncul tampilan data dengan masing-masing panjang gelombang. Selanjutnya dibuat identitas kategori pengklasifikasian pada objek (Tabel 3.4). Objek dikelompokkan dengan memilih *define range* dan *column range* diisi dengan kategori pada kolom 1 dan absorbansi pada kolom yang lain. Selanjutnya, model dibuat dengan klik *task, analyze* lalu dipilih *Linear Discriminant Analysis*. Jika hasil prediksi dari model telah sesuai dengan klasifikasi yang sebenarnya, maka model klasifikasi tersebut dikatakan valid apabila persentase akurasi yang diperoleh sebesar 100%. Model klasifikasi yang terbentuk kemudian dapat digunakan untuk memprediksi klasifikasi dari sampel yang belum diketahui.

Tabel 3.4 Identitas kategori pengklasifikasian objek

No.	Kategori Objek	Keterangan
1.	Matriks	Sampel bukan ekstrak yang terdapat dalam ekstrak (aerosil dan akuades)
2.	Fenol	Sampel ekstrak daun

Pembentukan model kalibrasi dibuat dengan metode PLS. Data absorbansi dari spektrum NIR sampel yang mengandung fenol dianalisis dengan metode PLS untuk membentuk sebuah model kalibrasi. Nilai absorbansi ditandai sebagai prediktor (variabel x) dan konsentrasi ditandai sebagai respon (variabel y). Langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut: software The Unscrambler X 10.2 dibuka. Data dimasukkan dengan memilih *file, import data*, lalu dipilih OPUS sehingga akan muncul tampilan data dengan masing-masing panjang gelombang. Objek dikelompokkan dengan mengklik *define range* dan *column range* diisi dengan nilai konsentrasi pada kolom 1 dan absorbansi pada kolom lain yang tersisa. Selanjutnya, model dibuat dengan memilih *task, analyze*, lalu *Partial Least Square*. Kriteria dari PLS yang harus dipenuhi adalah nilai R^2 , RMSEC (*Root Mean Standart Error of Calibration*), RMSECV (*Root Mean Square Error Cross Validation*). Pemilihan set data spektrum didasarkan pada kemampuan prediksi yang terbaik dengan nilai korelasi R^2 semakin besar, nilai galat RMSEC dan RMSECV terbaik apabila nilai semakin kecil.

3.5.6 Validasi Model PLS dan LDA

Validasi bertujuan untuk memperkirakan seberapa akurat model prediksi yang dibuat untuk dapat diimplementasikan.

a. *Leave-One-Out-Cross-Validation*

Set validasi ini dibuat dengan meninggalkan satu dari masing-masing replikasi sampel untuk validasi silang, yaitu dengan melibatkan sampel pengamatan