



**PENENTUAN KADAR FLAVONOID PADA EKSTRAK DAUN TANAMAN  
MENGUNAKAN METODE SPEKTROKOPI INFRAMERAH DAN  
KEMOMETRIK**

**SKRIPSI**

Oleh

**Hilmia Lukman  
NIM 112210101034**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**PENENTUAN KADAR FLAVONOID PADA EKSTRAK DAUN TANAMAN  
MENGUNAKAN METODE SPEKTROKOPI INFRAMERAH DAN  
KEMOMETRIK**

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Hilmia Lukman**  
**NIM 112210101034**

**FAKULTAS FARMASI**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2015**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan untuk:

1. Ayahanda Lukman Al-Hakim dan Ibunda Muhassonah Ihsan, atas do'a, kasih sayang, motivasi, dan kepercayaan yang mengalir tiada henti kepada penulis.
2. Bapak dan ibu Guru di TK Bina Anaprasa, MI Nurul Mun'im, SMP Negeri 3 Peterongan, dan SMA Darul Ulum 2 Jombang yang telah memberikan fondasi untuk membangun masa depan penulis.
3. Seluruh orang yang peduli dan menyayangi penulis, akhirnya penulis bisa mencapai tahap ini.
4. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

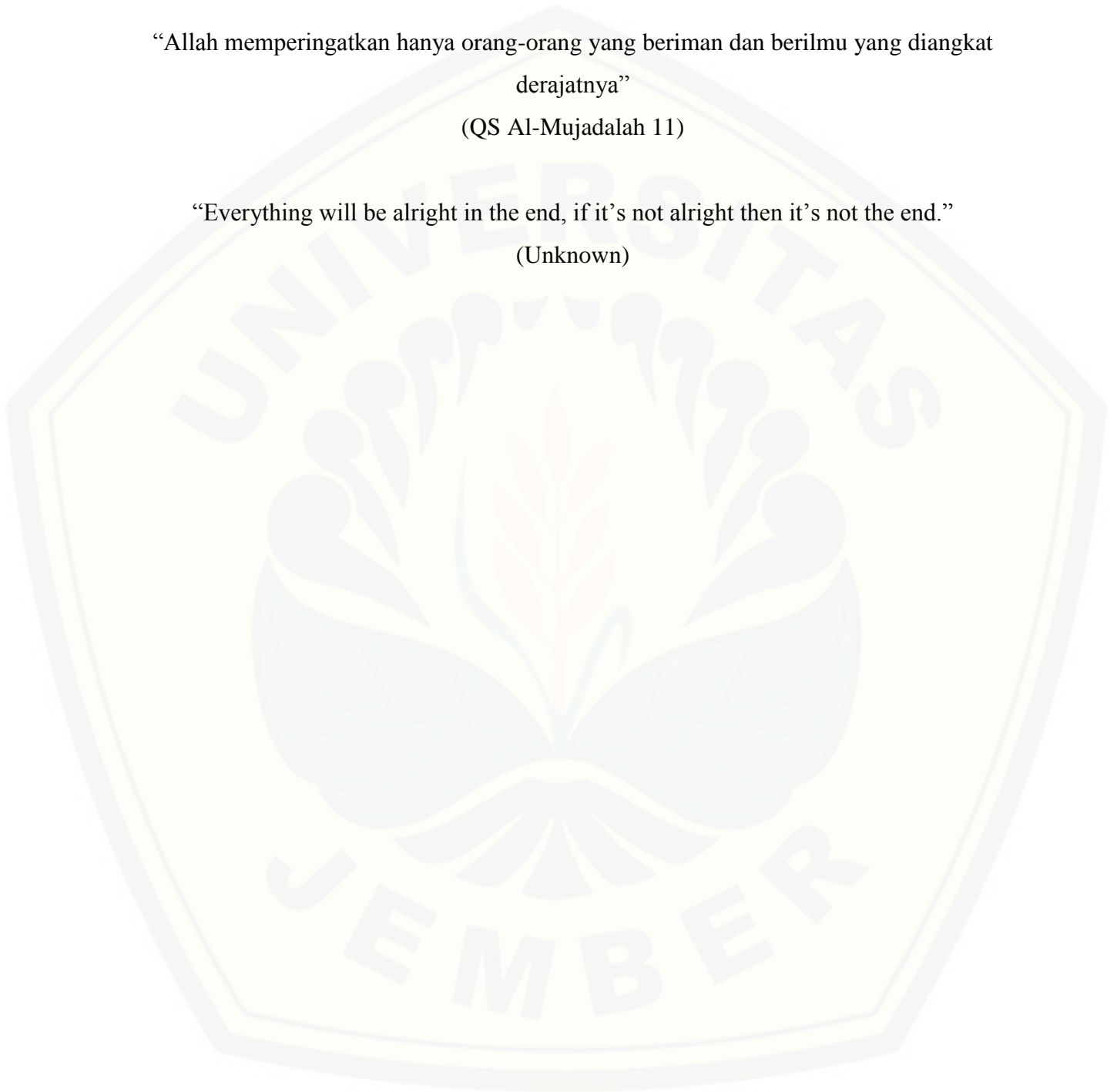
**MOTTO**

“Allah memperingatkan hanya orang-orang yang beriman dan berilmu yang diangkat derajatnya”

(QS Al-Mujadalah 11)

“Everything will be alright in the end, if it’s not alright then it’s not the end.”

(Unknown)



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Hilmia Lukman

NIM : 112210101034

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Penentuan Kadar Flavonoid pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektroskopi Inframerah 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 Oktober 2015

Yang menyatakan,

Hilmia Lukman

NIM. 112210101034

**SKRIPSI**

**PENENTUAN KADAR FLAVONOID PADA EKSTRAK DAUN TANAMAN  
MENGUNAKAN METODE SPEKTROKOPI INFRAMERAH DAN  
KEMOMETRIK**

Oleh

Hilmia Lukman

NIM 112210101034

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Lesty W., S.Farm., Apt., M.Farm.

Dosen Pembimbing Anggota : Yuni Retnaningtyas, S.Si., Apt., M.Si.

**PENGESAHAN**

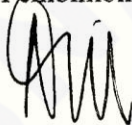
Skripsi berjudul “Penentuan Kadar Flavonoid pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektroskopi Inframerah dan Kemometrik” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Senin, 19 Oktober 2015

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

**Tim Pembimbing:**

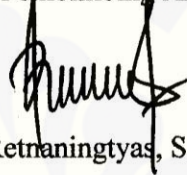
Dosen Pembimbing Utama,



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

NIP 197604142002122001

Dosen Pembimbing Anggota,

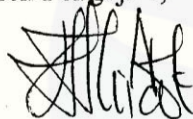


Yuni Retnaningtyas, S.Si., Apt., M.Si.

NIP 197806092005012004

**Tim Penguji :**

Dosen Penguji I,



Nia K., S.Farm., Apt., M.Farm.

NIP 198204062006042001

Dosen Penguji II,

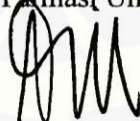


Indah Yulia N., S.Farm., Apt., M. Farm.

NIP 198407122008122002

**Mengesahkan**

**Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember**



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

NIP 197604142002122001

**RINGKASAN**

**Penentuan Kadar Flavonoid pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektroskopi Inframerah dan Kemometrik:** Hilmia Lukman, 112210101034; 2015; 58 halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang paling banyak ditemukan dalam tumbuhan, terdapat di beberapa bagian tanaman, terutama pada sel tanaman yang mengalami fotosintesis. Flavonoid diketahui memiliki aktivitas biologis diantaranya sebagai antivirus, antibakteri, antikanker, antioksidan, antiinflamasi, dan hepatoprotektor. Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar flavonoid dengan menggunakan instrumen spektroskopi inframerah karena metode analisis yang umum digunakan untuk menentukan kadar flavonoid 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 teknik hampir tidak memerlukan pelarut kimia sehingga lebih ramah lingkungan.

Penetapan kadar dengan metode spektroskopi inframerah dan kemometrik ini memerlukan suatu analisis data multivariat (kemometrik) untuk mengekstrak 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 dengan prinsip kolorimetri menggunakan pereaksi  $\text{AlCl}_3$  dengan standar kuersetin. Berdasarkan hasil penelitian, model PLS dengan spektroskopi NIR memberikan hasil terbaik dengan nilai  $R^2$  kalibrasi sebesar 0,9916499;  $R^2$  validasi sebesar 0,9893221; RMSEC sebesar 2,1521897, dan RMSECV sebesar 2,460588. Validasi model juga memberikan nilai yang baik dengan  $R^2$  LOOCV sebesar 0,9986664 dan  $R^2$  *2-Fold-Cross-Validation* sebesar 0,9823225. Model klasifikasi LDA yang digunakan pada pengkategorian antara matriks dengan sampel yang mengandung flavonoid memiliki akurasi sebesar 100%. Sedangkan penentuan kadar flavonoid dengan spektroskopi FTIR memberikan hasil yang kurang baik, karena nilai  $R^2$  kalibrasi sebesar 0,8653689 dan RMSEC sebesar 8,8958149, serta nilai LDA memiliki akurasi sebesar 86,84%.

Model PLS dan LDA dengan spektroskopi NIR yang telah terbentuk dan tervalidasi kemudian diterapkan pada sampel nyata sehingga diperoleh kadar flavonoid dalam sampel nyata. Kadar flavonoid pada sampel nyata yang diperoleh dari spektroskopi inframerah sebesar 36,3053 mg QE/g ekstrak untuk kapsul Stimuno dan 17,1862 mg QE/g untuk kapsul Daun salam. Hasil analisis ini kemudian dibandingkan dengan kadar yang diperoleh dari metode spektrofotometri UV-Vis. Hasil penetapan kadar sampel 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 0,202, sedangkan pengkategorian sampel nyata dengan model LDA memberikan % kemampuan prediksi sebesar 100%.

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Penentuan Kadar Flavonoid pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektroskopi Inframerah 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 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., dan Ibu Yuni Retnaningtyas, S.Si., Apt., M.Si., selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran, perhatian, dan saran kepada penulis selama penyusunan skripsi ini sehingga bisa terlaksana dengan baik.
3. Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm., dan Ibu Indah Yulia Ningsih, S.Farm., Apt., M. Farm., selaku Dosen penguji yang dengan sabar memberikan masukan untuk penulis.
4. Ibu Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa.
5. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi banyak ilmu dan selalu memotivasi penulis selama masa perkuliahan.
6. Abi dan Ummy ku tersayang, Lukman Al-Hakim dan Muhassonah Ihsan. Terima kasih untuk setiap untaian do'a yang selalu mengalir bagiku, untuk cinta dan kasih sayang yang tak pernah kering untukku, dan seluruh motivasi untukku.
7. Kedua saudaraku tersayang, Malisa Lukman dan Nihayah Lukman. Terima kasih untuk seluruh do'a dan dukungan yang terus mengalir untukku.

8. Keponakanku tercinta, Azura Himada Fauzi. Terimakasih atas motivasi yang telah kau berikan demi terwujudnya skripsi ini.
9. Partner skripsiku Fracilia Arinda, Maulana F. S, dan Nurul Aini, Terimakasih atas kerjasamanya selama penelitian.
10. Sahabat luar biasaku “*Happy family*”, Lilycung, Okta, Ninis, dan Bunda, terimakasih atas semuanya, suka dan duka yang kita lalui bersama.
11. Teman-teman seperjuanganku di laboratorium kimia: Ani, Dewi, Yeni, mbak Inge, Nora, dan Hiday yang selalu siap memberi bantuan tenaga dan pikiran.
12. Pengasuh Pondok Mahasiswi Al-Husna, KH. Hamam dan Hj. Isniatul U, serta teman-temanku Tutus, Elok, A’yun, Zakiyah, Fitiya, Ifa, Hilya, Nurul, Wardah, Farid, Anis, Vivi, dan Dewi, terimakasih telah menjadi keluargaku di Jember.
13. Saudara mentoringku, Rara, Fitri, Prisma, mbak Rosa, Olyv, Kiki, mbak Dija, dan mbak Oni, terimakasih atas ilmu yang telah diberikan kepadaku.
14. Teman-teman seperjuangan Angkatan 2011 (ASMEF) yang berjuang bersama demi sebuah gelar Sarjana Farmasi yang akan selalu menjadi keluarga.
15. Teknisi Laboratorium Kimia Farmasi Bu Wayan dan Mbak Hani yang telah membantu dan memberi masukan selama penelitian.
16. Seluruh staf dan karyawan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas seluruh bantuan yang telah diberikan.
17. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

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

Jember, 19 Oktober 2015

Penulis

**DAFTAR ISI**

|                                      | Halaman       |
|--------------------------------------|---------------|
| <b>HALAMAN JUDUL</b> .....           | ii            |
| <b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....     | iii           |
| <b>HALAMAN MOTTO</b> .....           | iv            |
| <b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....      | v             |
| <b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....    | vi            |
| <b>HALAMAN</b>                       |               |
| <b>PENGESAHAN</b> .....              | <b>Error!</b> |
| <b>Bookmark not defined.</b>         |               |
| <b>RINGKASAN</b> .....               | viii          |
| <b>PRAKATA</b> .....                 | x             |
| <b>DAFTAR ISI</b> .....              | xii           |
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....            | xv            |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....           | xvi           |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....         | xvii          |
| <b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....      | 1             |
| <b>1.1 Latar Belakang</b> .....      | 1             |
| <b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....     | 4             |
| <b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....   | 4             |
| <b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....  | 4             |
| <b>1.5 Batasan Penelitian</b> .....  | 4             |
| <b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> ..... | 5             |
| <b>2.1 Daun</b> .....                | 5             |
| <b>2.2 Flavonoid</b> .....           | 6             |
| <b>2.3 Simplisia</b> .....           | 8             |
| <b>2.4 Ekstrak</b> .....             | 8             |

|  |    |
|--|----|
| <b>2.5 Metode Ekstraksi</b> .....  | 9  |
| <b>2.6 Spektroskopi Inframerah atau <i>Infrared</i> (IR)</b> .....           | 10 |
| 2.6.1 Spektroskopi Inframerah Dispersif (Konvensional).....                  | 12 |
| 2.6.2 Spektroskopi <i>Fourier Transformed Infrared</i> (FTIR).....           | 13 |
| 2.6.3 Spektroskopi Infra Merah Dekat (NIR).....                              | 14 |
| <b>2.7 Analisis Kemometrik dan Multivariat</b> .....                         | 16 |
| 2.7.1 <i>Principal Component Analysis</i> (PCA).....                         | 17 |
| 2.7.2 <i>Partial Least Square</i> (PLS).....                                 | 18 |
| 2.7.3 <i>Principal Component Regression</i> (PCR).....                       | 18 |
| 2.7.4 <i>Multiple Linear Regression</i> (MLR).....                           | 19 |
| 2.7.5 <i>Artificial Neural Network</i> (ANN).....                            | 19 |
| 2.7.6 <i>Linear Discriminant Analysis</i> (LDA).....                         | 19 |
| <b>2.8 Validasi Silang</b> .....   | 20 |
| <b>2.9 Spektrofotometer UV-Vis</b> .....                                     | 21 |
| <b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN</b> .....                                    | 23 |
| <b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....                                 | 23 |
| <b>3.2 Rancangan Penelitian</b> .....  | 23 |
| <b>3.3 Alat dan Bahan Penelitian</b> .....                                   | 23 |
| 3.3.1 Alat.....  | 23 |
| 3.3.2 Bahan.....   | 24 |
| <b>3.4 Alur Penelitian</b> .....   | 25 |
| <b>3.5 Prosedur Penelitian</b> .....   | 26 |
| 3.5.1 Pengumpulan Sampel untuk <i>Training Set</i> dan <i>Test Set</i> ..... | 26 |
| 3.5.2 Pembuatan Ekstrak.....   | 27 |
| 3.5.3 Akuisisi Spektrum Menggunakan FTIR.....                                | 28 |
| 3.5.4 Pengukuran Pantulan Spektrum NIR.....                                  | 28 |
| 3.5.5 Penentuan Kadar Flavonoid Total dengan Spektrofotometer<br>UV-Vis..... | 28 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.5.6 Pembentukan model klasifikasi dan kalibrasi.....                             | 30        |
| 3.5.7 Validasi model PLS dan LDA .....   | 31        |
| 3.5.8 Aplikasi pada sampel ekstrak nyata.....                                      | 31        |
| <b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4.1 Pembuatan Ekstrak Sampel .....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4.2 Penetapan Kadar Flavonoid Total dengan Metode Spektrofotometri</b>          |           |
| <b>UV-Vis.....</b>   | <b>34</b> |
| 4.2.1 Penetapan panjang gelombang maksimum.....                                    | 34        |
| 4.2.2 Penentuan waktu inkubasi.....  | 35        |
| 4.2.3 Pengujian akurasi metode spektrofotometri UV-Vis yang                        |           |
| digunakan untuk penetapan kadar kuersetin.....                                     | 36        |
| 4.2.4 Penetapan kadar sampel <i>training set</i> dan <i>test set</i> dengan metode |           |
| spektrofotometri UV-Vis.....   | 37        |
| <b>4.3 Pembentukan Model Kalibrasi dan Klasifikasi .....</b>                       | <b>40</b> |
| 4.3.1 Pembentukan Model Kalibrasi dan Klasifikasi dengan                           |           |
| Spektroskopi FTIR.....   | 42        |
| 4.3.2 Pembentukan Model Kalibrasi dan Klasifikasi dengan                           |           |
| Spektroskopi NIR.....  | 44        |
| <b>4.4 Validasi model PLS dan LDA.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>4.5 Penerapan Model PLS dan LDA terhadap Sampel .....</b>                       | <b>48</b> |
| <b>BAB 5. PENUTUP.....</b>   | <b>50</b> |
| <b>5.1 Kesimpulan.....</b>   | <b>50</b> |
| <b>5.2 Saran .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>DAFTAR PUSTAKA</b>  |           |
| <b>LAMPIRAN</b>  |           |

**DAFTAR TABEL**

|  | Halaman |
|--|---------|
| 2.1 Spektrum inframerah .....  | 7       |
| 2.2 Identifikasi gugus fungsi pada inframerah .....  | 12      |
| 3.1 Simplisia yang digunakan.....  | 24      |
| 3.2 Ekstrak daun yang sudah jadi.....  | 24      |
| 3.2 Identitas kode tanaman .....   | 27      |
| 4.1 Hasil uji akurasi kuersetin .....  | 36      |
| 4.2 Hasil penetapan kadar sampel <i>training set</i> .....   | 38      |
| 4.3 Hasil penetapan kadar sampel <i>test set</i> .....   | 39      |
| 4.4 Model kalibrasi dengan teknik PLS menggunakan FTIR .....   | 41      |
| 4.5 Hasil perhitungan mg QE/g ekstrak sampel nyata dengan spektroskopi<br>NIR dan dengan metode pembandingan (metode spektrofotometri<br>UV-Vis) ..... | 47      |

**DAFTAR GAMBAR**

|  | Halaman |
|--|---------|
| 2.1 Kerangka dasar senyawa flavonoid .....   | 6       |
| 2.2 Diagram pembagian spektrum elektromagnetik.....  | 11      |
| 2.3 Komponen dasar spektrofotometer FTIR .....   | 14      |
| 2.4 Dasar konfigurasi Spektrometer NIR .....   | 15      |
| 2.5 Prinsip PCA .....  | 18      |
| 3.1 Skema alur penelitian .....  | 25      |
| 4.1 Spektra panjang gelombang penetapan kadar flavonoid total .....  | 35      |
| 4.2 Absorbansi larutan standar dengan penambahan etanol, AlCl <sub>3</sub> , kalium<br>asetat, dan aquadest mulai menit ke-10 hingga ke-60 ..... | 36      |
| 4.3 Kurva standar kuersetin .....  | 38      |
| 4.4 Pemetaan model LDA menggunakan FTIR .....  | 43      |
| 4.5 Data korelasi model kalibrasi teknik PLS menggunakan NIR .....   | 44      |
| 4.6 Pemetaan model LDA menggunakan NIR .....   | 45      |
| 4.7 Hasil validasi LOOCV model PLS dengan NIR .....  | 46      |
| 4.8 Hasil validasi teknik LOOCV model LDA dengan NIR .....   | 47      |
| 4.9 Hasil validasi teknik <i>2-fold cross validation</i> model PLS dengan NIR ....   | 48      |



DAFTAR LAMPIRAN

|  | Halaman |
|--|---------|
| A. Alat dan Bahan yang Digunakan.....  | 59      |
| A.1 Sampel <i>Training Set</i> dan <i>Test Set</i> .....   | 59      |
| A.2 Sampel Nyata.....  | 59      |
| A.3 Instrumen.....   | 59      |
| A.4 Kompartemen Sampel .....   | 59      |
| B. Spektrum Hasil <i>Scanning</i> dengan Spektroskopi Inframerah.....  | 60      |
| B.1 Spektroskopi FTIR.....   | 60      |
| B.2 Spektroskopi NIR .....   | 61      |
| C. Identitas Sampel Ekstrak .....  | 63      |
| C.1 Sampel <i>Training Set</i> .....   | 63      |
| C.2 Sampel <i>Test Set</i> .....   | 64      |
| C.3 Sampel Nyata.....  | 64      |
| D. Perhitungan % Rendemen .....  | 64      |
| E. Data Absorbansi Penetapan Kadar Flavonoid Total.....  | 65      |
| E.1 Kuersetin 15,670 µg/ml.....  | 65      |
| E.2 Standar Kuersetin.....   | 68      |
| F. Pembuatan Larutan pada Penetapan Kadar Flavonoid Total .....  | 68      |
| F.1 Larutan Kuersetin.....   | 68      |
| F.2 Larutan Ekstrak .....  | 69      |
| G. Pembuatan Larutan AlCl <sub>3</sub> 10% .....   | 70      |
| H. Pembuatan Larutan Kalium Asetat 1M.....   | 70      |
| I. Hasil Spektra Optimasi Panjang Gelombang Maksimum Flavonoid .....   | 71      |
| J. Pengujian Akurasi .....   | 71      |
| K. Hasil Pengukuran Kadar Flavonoid Total Sampel <i>Training Set</i> ,<br><i>Test Set</i> , dan Sampel Nyata dengan Spektrofotometer UV-vis..... | 74      |

|   |    |
|---|----|
| K.1 Contoh Perhitungan .....  | 74 |
| K.2 Hasil Perhitungan mg QE/g Ekstrak Seluruh <i>Training Set</i> .....   | 76 |
| K.3 Hasil Perhitungan mg QE/g Ekstrak Seluruh <i>Test Set</i> .....   | 77 |
| K.4 Hasil Perhitungan mg QE/g Ekstrak Sampel Nyata.....   | 77 |
| L. Hasil Analisis Statistik Uji T dengan Program <i>Statistical Product<br/>and Service Solutions</i> (SPSS)..... | 78 |
| M. Hasil Analisis Kuantitatif Dengan Metode Kemometrik PLS.....   | 79 |
| M.1 Dengan Spektroskopi FTIR .....  | 79 |
| M.2 Dengan Spektroskopi NIR.....  | 82 |
| N. Hasil Analisis Kualitatif dengan Metode Kemometrik LDA.....  | 85 |
| N.1 Dengan Spektroskopi FTIR.....   | 85 |
| N.2 Dengan Spektroskopi NIR.....  | 86 |

## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Indonesia memiliki beraneka ragam kekayaan hayati yang bermanfaat bagi kehidupan. Kekayaan alam tumbuhan di Indonesia meliputi 30.000 jenis tumbuhan dari total 40.000 jenis tumbuhan di dunia, 940 jenis di antaranya merupakan tumbuhan berkhasiat obat. Jumlah ini merupakan 90% dari jumlah tumbuhan obat di Asia. Berdasarkan hasil penelitian, dari sekian banyak jenis tanaman obat, baru 20 - 22% yang dibudidayakan (Kementrian Kehutanan RI, 2010). Masih banyak tumbuhan Indonesia yang belum diteliti untuk mengetahui potensinya sebagai sumber pengobatan. Dengan melihat kenyataan tersebut, maka usaha untuk mencari informasi kandungan senyawa kimia melalui penelitian ilmiah menjadi sangat penting.

Kandungan senyawa kimia aktif yang terdapat pada tanaman secara umum adalah alkaloida, flavonoida, terpenoida, steroida, tanin dan saponin yang dapat diketahui dengan cara skrining fitokimia (Cody, 1985). 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 merupakan suatu bagian tumbuhan yang penting dan pada umumnya tiap tumbuhan mempunyai sejumlah besar daun. Daun umumnya tipis melebar, kaya akan suatu zat warna hijau yang dinamakan klorofil, oleh karena itu daun umumnya berwarna hijau (Tjitrosoepomo, 2005). Fungsi utama daun adalah membuat makanan melalui fotosintesis. Hal ini terjadi dalam helaian daun yang tipis (Cutter, 1989). Pada beberapa bagian tanaman, terutama pada sel tanaman yang mengalami fotosintesis, banyak ditemukan senyawa fenolik terutama flavonoid (Kumar and Pandey, 2013).

Flavonoid adalah golongan senyawa polifenol yang diketahui memiliki sifat antioksidan, antimikroba, antialergi, antivirus, antiinflamasi, dan vasodilator (Pietta, 2000). Flavonoid dapat dibagi menjadi beberapa golongan seperti flavon (flavon, apigenin, dan luteolin), flavonol (kuersetin, kaempferol, myricetin, dan fisetin), flavanon (flavanon, hesperetin, dan naringenin), dan lainnya (Middleton, 1998). Kuersetin adalah senyawa kelompok flavonol terbesar. Kuersetin berada dalam jumlah sekitar 60 - 75% dari flavonoid. Para ilmuwan telah melakukan penelitian untuk mengidentifikasi dan mengetahui jumlah kandungan flavonoid dari berbagai jenis makanan. Konsentrasi tertinggi dari flavonol ditemukan dalam sayuran seperti pada bawang dan brokoli, dalam buah seperti apel, ceri, beri, dan pada minuman seperti anggur merah (Resi and Surgani, 2009).

Berbagai tahapan pengerjaan untuk memperoleh kandungan kimia dari suatu tanaman dimulai dari ekstraksi, skrining, dan identifikasi komponen kimia (Harborne, 1987). Sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimum dari zat aktif dan yang seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000). Flavonoid merupakan senyawa polar sehingga dapat diekstraksi dengan pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), air dan lain-lain (Markham, 1988). Pembuatan sediaan ekstrak dimaksudkan agar zat berkhasiat yang terdapat pada simplisia terdapat dalam bentuk yang mempunyai kadar tinggi (Anief, 1987). Keuntungan penggunaan ekstrak dibandingkan dengan simplisia asalnya adalah lebih sederhana, dari segi bobot pemakaiannya lebih sedikit dengan bobot tumbuhan aslinya (Badan POM RI, 2005).

Metode analisis yang umum digunakan untuk menentukan kadar flavonoid antara lain kromatografi gas, spektrometri massa, kromatografi lapis tipis, metode kolorimetrik, spektrofotometri ultraviolet (UV), kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), dan elektroforesis kapiler (Bankova *et al.*, 1992; Markham *et al.*, 1996;

Park *et al.*, 1997; Woisky and Salatino, 1998; Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000; Merken and Beecher, 2000; Marchart *et al.*, 2003). Metode-metode tersebut membutuhkan tahapan analisis yang panjang dan waktu analisis yang cukup lama (Chang *et al.*, 2002).

Spektrofotometri inframerah merupakan teknik analisis yang berdasarkan pada vibrasi atom pada molekul. Spektrum inframerah dihasilkan dengan cara melewatkan radiasi inframerah pada sampel dan menentukan radiasi yang diabsorpsi pada energi tertentu. Salah satu keuntungan dari spektroskopi inframerah adalah non-destruktif, jumlah sampel yang dibutuhkan sedikit, dan hampir semua bentuk sampel dapat diteliti. Cairan, larutan, pasta, serbuk, film, serat, dan gas dapat diidentifikasi dengan teknik pemilihan sampel yang sesuai (Stuart, 2004). Selain itu, teknik spektroskopi inframerah hampir tidak memerlukan pelarut kimia sehingga lebih ramah lingkungan (Rohman and Che Man, 2010).

Teknik spektroskopi inframerah berpotensi sebagai metode analisis cepat karena analisis dapat dilakukan secara langsung pada serbuk kering sampel tanpa tahapan pemisahan terlebih dahulu. Spektrum infra merah yang dihasilkan merupakan hasil interaksi antara senyawa-senyawa kimia dalam matriks sampel yang sangat kompleks. Spektrum ini sangat rumit dan perbedaan antara spektrum dari tanaman yang sejenis tidak tampak dengan jelas dan pada umumnya tidak dapat diinterpretasikan secara visual (Chew *et al.*, 2004).

Teknik kemometrik seperti analisis multivariat dapat digunakan untuk memudahkan analisa data yang dihasilkan oleh spektrum inframerah (Gad *et al.*, 2012). Keuntungan dari penggunaan teknik kemometrik untuk interpretasi spektrum inframerah adalah kemampuannya dalam menghubungkan profil spektrum dengan informasi yang terdapat pada sampel (Zou *et al.*, 2005). Mengacu pada uraian tersebut, maka dalam penelitian ini akan dilakukan penentuan kadar flavonoid pada ekstrak daun tanaman menggunakan metode spektroskopi inframerah dan kemometrik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah metode spektroskopi inframerah dan kemometrik dapat digunakan untuk menentukan kadar flavonoid?
2. Berapakah kadar flavonoid pada sampel nyata dan bagaimanakah signifikansi kadar flavonoid dengan spektrum inframerah dibandingkan dengan metode pembanding?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui apakah metode spektroskopi inframerah dan kemometrik dapat digunakan untuk menentukan kadar flavonoid
2. Mengetahui kadar flavonoid pada sampel nyata dan mengidentifikasi signifikansi kadar flavonoid dengan spektrum inframerah dibandingkan dengan metode pembanding

## 1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan pengetahuan tentang metode analisis flavonoid yang lebih sederhana, cepat, dan mudah
2. Bagi mahasiswa dapat mengasah kemampuan, kreativitas dan keahlian di bidang kimia analisis

## 1.5 Batasan Penelitian

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Sampel nyata yang digunakan adalah ekstrak daun yang tidak termasuk dalam *training set* maupun *test set*
2. Model kalibrasi yang digunakan adalah PLS dan model klasifikasi yang digunakan adalah LDA

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Daun

Daun (*folium*) merupakan salah satu organ penting bagi tumbuhan. Organ ini hanya terdapat pada batang saja dan tidak pernah terdapat pada bagian lain pada tubuh tumbuhan (Tjitrosoepomo, 2005). Daun mempunyai fungsi-fungsi antara lain : memungkinkan terjadinya asimilasi, memungkinkan berlangsungnya respirasi (pernapasan), dan memungkinkan berlangsungnya transpirasi (Sutedjo, 1989).

Daun dibagi menjadi dua bagian, yaitu daun dengan bagian yang lengkap dan daun dengan bagian yang tidak lengkap. Daun lengkap adalah apabila bagian-bagian tertentu pada sehelai daunnya mempunyai pelepah atau upih daun (vagina), tangkai daun (petiolus) dan lembaran daun (lamina). Sebagian besar tumbuhan hanya mempunyai bagian-bagian di atas antara satu sampai dua bagian saja, sehingga disebut daun tidak lengkap (Sutedjo, 1989).

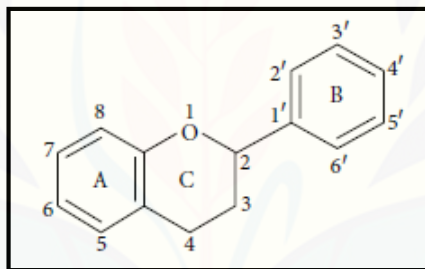
Daun terdiri dari sistem jaringan dermal, yakni jaringan epidermis, jaringan pembuluh, dan jaringan dasar yang disebut mesofil. Daun umumnya tidak mengalami penebalan sekunder sehingga epidermis bertahan sebagai sistem dermal, namun pada sisik tunas yang bertahan lama ada kemungkinan dibentuk periderm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

Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang paling banyak ditemukan dalam tumbuhan, terdapat di beberapa bagian tanaman, terutama pada sel tanaman yang mengalami fotosintesis (Kumar and Pandey, 2013). Flavonoid umumnya ditemukan pada tumbuhan dalam bentuk glikosida dan memberikan warna biru, merah, dan oranye pada daun, bunga, dan buah. Flavonoid terbentuk pada tumbuhan dari asam amino aromatik fenilalanin, tirosin, dan malonat (Pietta, 2000).

Struktur dasar flavonoid adalah 15 atom karbon yang terdiri dari dua cincin benzena, yakni cincin A dan B (Gambar 2.1) yang terhubung melalui cincin piran (C). Flavonoid dapat dibagi menjadi beberapa golongan seperti flavon (flavon, apigenin, dan luteolin), flavonol (kuersetin, kaempferol, myricetin, dan fisetin), flavanon (flavanon, hesperetin, dan naringenin), dan lainnya (Middleton, 1998).



Gambar 2.1. Kerangka dasar senyawa flavonoid (Middleton, 1998)

Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi. Kebanyakan senyawa terkonjugasi pada umumnya berwarna cerah sehingga menunjukkan pita serapan yang kuat pada daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak (Harborne, 1987). Analisis dengan menggunakan infra merah dapat diketahui gugus fungsi yang terdapat di dalam senyawa organik. Senyawa flavonoid memiliki ciri umum yaitu adanya gugus karbonil (C=O) (Sukadana, 2010). Menurut Silverstein *et al.* (1986), pita-pita khas yang teramati dalam spektrum senyawaan fenol dihasilkan oleh vibrasi ulur O-H dan ulur C-O. Data bilangan gelombang dan gugus fungsi dapat dilihat pada Tabel 2.1.



Tabel 2.1. Spektrum inframerah (Silverstein *et al.*, 1986)

| No | Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> ) | Gugus Fungsi  |
|----|--|---------------|
| 1. | 3500-3000                              | -OH           |
| 2. | 3150-3050                              | -CH aromatik  |
| 3. | 2950-2800                              | -CH alifatik  |
| 4. | 1850-1730                              | -C=O          |
| 5. | 1650-1400                              | -C=C aromatik |
| 6. | 1300-1000                              | -C-O alkohol  |
| 7. | 840-800                                | -CH aromatik  |

Banyak penelitian mengungkapkan flavonoid mempunyai aktivitas biologis diantaranya sebagai antivirus, antibakteri, antikanker, antioksidan, antiinflamasi, dan hepatoprotektor (Li *et al.*, 2000; Cushnie and Lamb, 2005; Koen *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2012).

Kuersetin adalah senyawa kelompok flavonol terbesar. Kuersetin berada dalam jumlah sekitar 60 - 75% dari flavonoid. Para ilmuwan telah melakukan penelitian untuk mengidentifikasi dan mengetahui jumlah kandungan flavonoid dari berbagai jenis makanan. Konsentrasi tertinggi dari flavonol ditemukan dalam sayuran seperti pada bawang dan brokoli, dalam buah seperti apel, ceri, beri, dan pada minuman seperti anggur merah (Resi and Surgani, 2009). Gugus-gugus dalam molekul kuersetin yang dapat memberikan serapan, antara lain C=C dan C-C aromatik, C-C, C-O, O-H, C=O, dan C-H (Kurniasari, 2006).

Penentuan kadar flavonoid dalam sampel herbal dapat dilakukan dengan berbagai metode, antara lain kromatografi gas, spektrometri massa, kromatografi lapis tipis, spektrofotometri ultraviolet, kromatografi cair kinerja tinggi, dan elektroforesis kapiler. Metode yang umum digunakan adalah spektrofotometri UV yang berdasar pada prinsip kolorimetri. Metode kolorimetri untuk struktur flavonoid adalah metode yang baik dan cocok untuk analisis rutin. Namun, metode kolorimetri tidak dapat mendeteksi semua jenis flavonoid, hanya untuk jenis flavon dan flavonol.

Metode kolorimetri untuk menentukan kadar flavonoid dalam tumbuhan dibagi menjadi dua macam. Metode pertama merupakan metode kolorimetri

menggunakan aluminum klorida berdasarkan pada pembentukan kompleks antara aluminum klorida dengan gugus keton C-4 dan gugus hidroksil C-3 atau C-5 kelompok flavon dan flavonol yang menghasilkan warna kuning, serta membentuk kompleks asam labil dengan gugus orto-dihidroksil dalam cincin A atau B flavonoid. Metode kedua merupakan metode kolorimetri dengan DNP (2,4-dinitrophenylhydrazine). Prinsip metode ini adalah reagen 2,4-dinitrophenylhydrazine yang bereaksi dengan karbonil keton dan aldehyd untuk 2,4-dinitrophenylhydrazone sehingga menghasilkan warna merah (Chang *et al.*, 2002). Metode kolorimetri menggunakan Aluminum klorida dipilih karena sederhana, cepat, dan mudah dilakukan.

### 2.3 Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang digunakan sebagai obat, belum mengalami pengolahan apapun juga kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang dikeringkan (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000). Berdasarkan sumbernya simplisia dibedakan menjadi tiga, yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan (mineral). 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 murni. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan atau bagian hewan berupa zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan adalah simplisia yang berupa bahan-bahan pelikan (mineral) yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b).

### 2.4 Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau 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 (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995a). Ekstrak dapat dikelompokkan atas dasar sifatnya, antara lain:

- a. Ekstrak encer, merupakan sediaan yang memiliki konsistensi seperti madu dan dapat dituang.
- b. Ekstrak kental, sediaan ini kuat dalam keadaan dingin dan tidak dapat dituang, kandungan airnya berjumlah sampai 30%. Tingginya kandungan air menyebabkan ketidakstabilan sediaan obat karena cemaran bakteri (merupakan medium tumbuh yang baik untuk bakteri).
- c. Ekstrak kering, memiliki konsistensi kering dan mudah digoyangkan yang sebaiknya memiliki kelembaban tidak kurang dari 5%.
- d. Ekstrak cair, diartikan sebagai ekstrak yang dibuat sedemikian hingga satu bagian simplisia sesuai dengan dua bagian (kadang-kadang satu bagian) ekstrak cair (Voight, 1995).

## 2.5 Metode Ekstraksi

*Ekstraksi* adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstraksi mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa aktif yang tidak larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000). Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harborne, 1987).

Metode ekstraksi berdasarkan tingkat kesulitannya dikelompokkan menjadi dua cara yaitu ekstraksi sederhana dan ekstraksi khusus (Harborne, 1987). Ekstraksi sederhana terdiri atas :

- a. Maserasi, yaitu metode ekstraksi dengan cara merendam sampel dalam pelarut dengan atau tanpa pengadukan.
- b. Perkolasi, yaitu metode ekstraksi secara berkesinambungan.
- c. Reperkolasi, yaitu perkolasi dimana hasil perkolasi digunakan untuk melarutkan sampel di dalam perkolator sampai senyawa kimianya terlarutkan.
- d. Diakolasi, yaitu perkolasi dengan penambahan tekanan udara.

Sedangkan ekstraksi khusus terdiri atas:

- a. Soxhletasi, yaitu metode ekstraksi secara berkesinambungan untuk melarutkan sampel kering dengan menggunakan pelarut bervariasi.
- b. Arus balik, yaitu metode ekstraksi secara berkesinambungan dimana sampel dan pelarut saling bertemu melalui gerakan aliran yang berlawanan.
- c. Ultrasonik, yaitu metode ekstraksi dengan alat yang menghasilkan frekuensi bunyi atau getaran antara 25 - 100 KHz.

Prinsip ekstraksi menggunakan pelarut organik adalah bahan yang akan diekstrak kontak langsung dengan pelarut pada waktu tertentu, kemudian diikuti dengan pemisahan bahan yang diekstrak (Harborne, 1987).

## **2.6 Spektroskopi Inframerah atau *Infrared* (IR)**

Spektrofotometri inframerah merupakan teknik analisis yang berdasarkan pada pengukuran vibrasi dari molekul yang tereksitasi oleh radiasi inframerah pada rentang panjang gelombang tertentu. Bila radiasi inframerah dilewatkan melalui suatu sampel, maka molekul-molekulnya dapat menyerap energi dan terjadi transisi diantara tingkat vibrasi dasar (*ground state*) dan tingkat vibrasi tereksitasi (*excited state*) (Hendayana *et al.*, 1994).

Daerah radiasi inframerah berkisar pada bilangan gelombang 12880 - 10  $\text{cm}^{-1}$ , atau panjang gelombang 0,78 - 1000  $\mu\text{m}$ . Umumnya daerah radiasi IR dibagi menjadi tiga bagian, yaitu daerah IR dekat ( $14000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ), daerah IR tengah ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ), dan daerah IR jauh ( $400 - 4 \text{ cm}^{-1}$ ). Daerah yang paling banyak digunakan untuk analisis adalah daerah IR tengah karena semua molekul memiliki absorbansi karakteristik dan vibrasi molekul utama dalam daerah ini (Davis and Mauer, 2010). Diagram pembagian spektrum elektromagnetik dapat dilihat pada Gambar 2.2.

|                           |                                 |                              |                           |                        |
|---------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------|
| $>14.000 \text{ cm}^{-1}$ | $14.000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ | $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ | $400 - 4 \text{ cm}^{-1}$ | $<4 \text{ cm}^{-1}$   |
| <b>UV Vis</b>             | <b>IR dekat</b>                 | <b>IR tengah</b>             | <b>IR jauh</b>            | <b>Gelombang mikro</b> |
| Transisi elektron         | Vibrasi molekuler               | Vibrasi molekuler            | Vibrasi molekuler         | Rotasi molekuler       |

|                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Bilangan gelombang semakin tinggi | Bilangan gelombang semakin rendah |
| Frekuensi semakin tinggi          | Frekuensi semakin rendah          |
| Energi semakin tinggi             | Energi semakin rendah             |
| Panjang gelombang semakin pendek  | Panjang gelombang semakin panjang |

Gambar 2.2. Diagram pembagian spektrum elektromagnetik (Smith, 2011)

Daerah spektrum inframerah dapat dibagi menjadi 2, yaitu (Mudasir and Candra, 2008):

a. Daerah frekuensi gugus fungsional

Terletak pada daerah radiasi  $4000 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ . Bagian dari spektrum ini menunjukkan absorpsi yang timbul karena ikatan dan gugus. Kebanyakan puncak absorpsi dalam daerah spektrum ini dengan mudah dikenal berasal dari gugus fungsional yang khas.

b. Daerah sidik jari (*fingerprint*)

Yaitu daerah yang terletak pada 1400 - 400  $\text{cm}^{-1}$ . Pita-pita absorpsi pada daerah ini berhubungan dengan vibrasi molekul secara keseluruhan. Setiap atom dalam molekul akan saling mempengaruhi sehingga dihasilkan pita-pita absorpsi yang khas untuk setiap molekul.

Secara umum digunakan diagram korelasi dalam mengidentifikasi gugus fungsi (Tabel 2.2)

Tabel 2.2. Identifikasi gugus fungsi pada inframerah (Skoog *et al.*, 1998)

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

### 2.6.1 Spektroskopi Inframerah Dispersif (Konvensional)

Elemen dispersif dalam instrumen IR dispersif berada dalam monokromator. Dispersi terjadi ketika sinar radiasi IR masuk melalui celah masuk lalu menuju elemen dispersif dan radiasi yang terdispersi direfleksi kembali menuju celah keluar. Radiasi terdispersi menjadi dua berkas, yaitu sinar menuju sampel dan sinar menuju larutan pembanding. Informasi dari berkas tersebut menghasilkan spektrum sampel. Spektrum terdispersi tersebut *discan* melalui celah keluar dalam monokromator (Stuart, 2004).

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). Adanya pembatasan tersebut, panjang gelombang diukur satu demi satu. Hal ini menyebabkan informasi dari suatu panjang gelombang tidak terukur saat waktu berakhir dan proses *scanning* berjalan lambat (Pomeranz and Meloan, 1994).

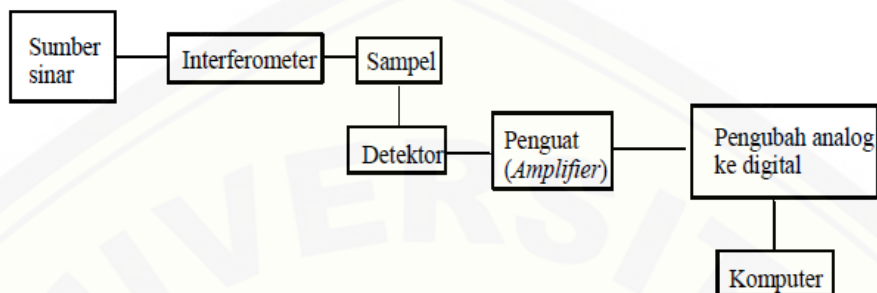
### **2.6.2 Spektroskopi *Fourier Transformed Infrared* (FTIR)**

FTIR memberikan keuntungan pada sensitifitas yang tinggi, resolusi dan kecepatan akuisisi data. Namun, FTIR memerlukan biaya yang lebih tinggi karena membutuhkan komputer untuk mengolah data yang dihasilkan (Skoog *et al.*, 1998).

Perbedaan antara FTIR dan spektrometer dispersif terletak pada monokromator (penyeleksi panjang gelombang). Monokromator pada spektrometer dispersif klasik mempunyai celah yang kecil untuk jalan keluar dan masuknya sinar sehingga membatasi panjang gelombang radiasi mencapai detektor. Ini merupakan salah satu kelemahan dari spektrometer dispersif klasik. Berbeda dengan spektrometer dispersif, FTIR tidak mengukur panjang gelombang satu demi satu, melainkan dapat mengukur intensitas transmisi pada berbagai panjang gelombang secara bersamaan. Pada FTIR, monokromator digantikan dengan interferometer. Interferometer membuat spektrometer mampu mengukur semua frekuensi optik secara serempak dengan mengatur intensitas dari setiap frekuensi tunggal sebelum sinyal sampai ke detektor (Skoog *et al.*, 1998).

Komponen dasar spektrofotometer FTIR (Gambar 2.3) adalah sumber sinar, interferometer, sampel, detektor, penguat (amplifier), pengubah analog ke digital, dan komputer (Stuart, 2004). Ketika radiasi inframerah melewati sampel, beberapa radiasi diserap dan sisanya ditransmisikan ke detektor. Detektor mengukur interferogram total dari semua panjang gelombang inframerah. Fungsi matematis

yang disebut transformasi fourier mengubah interferogram (intensitas vs waktu) menjadi spektrum inframerah (intensitas vs frekuensi) (Davis and Mauer, 2010).



Gambar 2.3. Komponen dasar spektrofotometer FTIR (Stuart, 2004)

Keuntungan utama spektrofotometer FTIR dibandingkan dengan spektrofotometer dispersif adalah bahwa spektrofotometer FTIR mampu menawarkan sensitivitas yang tinggi, mampu memberikan energi yang lebih tinggi serta mampu meningkatkan kecepatan pembacaan spektra IR secara drastis (Stuart, 2004).

### 2.6.3 Spektroskopi Infra Merah Dekat (NIR)

NIR merupakan instrumen yang dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Instrumen ini bekerja berdasarkan adanya vibrasi molekul yang berkorespondensi dengan panjang gelombang yang terdapat pada daerah IR dekat pada spektrum elektromagnetik. Vibrasi inilah yang dimanfaatkan dan diterjemahkan untuk mengetahui karakteristik kandungan kimia dari suatu bahan (Patil *et al.*, 2007).

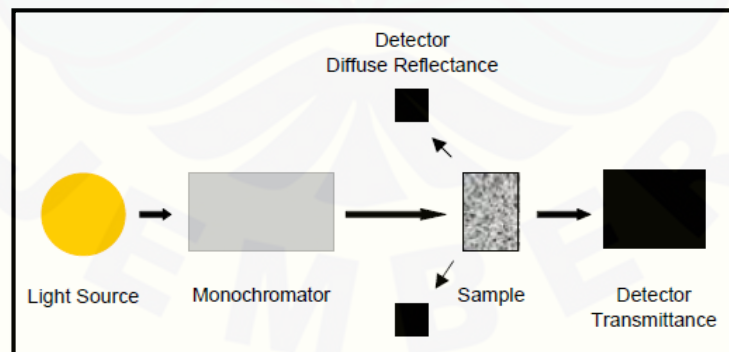
Spektrum NIR berasal dari energi radiasi yang ditransfer menjadi energi mekanik terkait oleh adanya gerakan atom yang dilakukan bersama oleh ikatan kimia dalam suatu molekul. Teknik ini didasarkan pada pengukuran cahaya yang dipantulkan atau ditransmisikan oleh sampel. Pertama-tama, sampel yang akan dipelajari harus 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).

Semua sistem spektroskopi memiliki komponen dasar yang sama. Bagian yang berbeda adalah sumber cahaya, perangkat pemilihan panjang gelombang, optik sampel antarmuka dan detektor. Perangkat pemilihan panjang gelombang dapat ditempatkan di depan atau di belakang sampel. Sebuah spektrometer NIR umumnya terdiri dari sumber cahaya, monokromator, tempat sampel, dan detektor yang memungkinkan untuk pengukuran transmitansi atau reflektansi (Reich, 2005). Prinsip kerja dan Gambar skematis dari NIR dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Dasar konfigurasi Spektrometer NIR (Reich, 2005)

## 2.7 Analisis Kemometrik dan Multivariat

Spektrum IR memiliki informasi struktur molekular yang terdiri atas gerak rotasi dan vibrasi. Banyaknya gerakan molekular dari molekul poliatom akan membentuk serangkaian pita serapan yang spesifik untuk masing-masing molekul. Hal ini membuat spektroskopi IR menjadi metode analisis kualitatif yang sangat berguna, tetapi sulit dilakukan akibat adanya kemiripan dari setiap respon spektrum. Analisis kuantitatif spektrum IR juga sangat sulit karena adanya tumpang tindih spektrum serapan dari molekul-molekul dalam sampel. Untuk dapat mengekstraksi informasi dari data spektrum IR tersebut, diperlukan suatu metode kemometrik berupa analisis multivariat (Stchur *et al.*, 2002).

Kemometrika adalah bidang interdisipliner yang menggunakan matematika dan statistik multivariat untuk memproses, mengekstraksi, dan memahami informasi yang relevan dari data analitis. Ahli kimia analitik adalah pengguna utama kemometrika, namun ada beberapa bidang yang didukung kuat dengan penggunaan kemometrika dari kimia fisik, seperti kinetika dan studi keseimbangan, kimia organik seperti optimasi reaksi, dan lain-lain (Brereton, 2003).

Saat ini kemometrika memungkinkan untuk menganalisis data multivariat. Data multivariat merupakan suatu data yang memiliki banyak variabel dan dari setiap variabel tersebut dapat saling berkorelasi. Keuntungan dari analisis multivariat adalah informasi yang didapat akan lebih banyak karena analisis multivariat mempertimbangkan banyak variabel secara bersamaan, dibandingkan jika hanya mempertimbangkan masing-masing variabel secara individual. Selain itu, keuntungan lainnya adalah bahwa analisis multivariat dapat mereduksi noise, lebih selektif dalam suatu pengukuran, dan bisa mendeteksi adanya sampel palsu (Bro, 2003).

Fungsi kemometrika dalam spektroskopi digunakan untuk meningkatkan kualitas data. Kemometrika memungkinkan adanya pengukuran data multivariat,

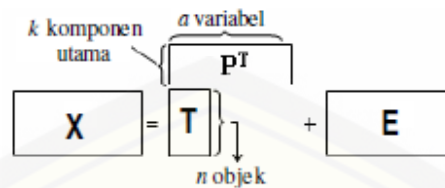
yang mana beberapa variabel (absorbansi dalam banyak bilangan gelombang) diukur untuk suatu sampel yang dituju (Miller and Miller, 2000).

Analisis multivariat menyediakan metode untuk mengurangi data berukuran besar yang diperoleh dari instrumen, seperti spektrofotometer. Metode kalibrasi multivariat dapat berupa *multiple linear regression*, *principal component regression*, PLS dan *artificial neural network* (ANN) (Brereton, 2000). Selain itu, analisis multivariat dapat digunakan untuk pengenalan pola dalam sampel melalui metode PCA, *discriminant analysis*, *K-nearest neighbour*, *soft independent modelling of class analogy*, dan *cluster analysis* (Miller and Miller, 2000).

### 2.7.1 *Principal Component Analysis* (PCA)

PCA secara umum dikenal sebagai teknik interpretasi multivariat. PCA digunakan sebagai alat statistik melalui penggunaan komponen-komponen yang diturunkan dalam sebuah model regresi untuk memprediksi variabel respon yang tidak teramati menggunakan komponen utama. Komponen utama bertujuan untuk menjelaskan sebanyak mungkin keragaman data dengan kombinasi linier yang ditemukan yang saling bebas satu sama lain dan di dalam arah keragaman paling besar. Tiap-tiap komponen utama merupakan kombinasi linier dari semua variabel. Komponen utama pertama menjelaskan variasi terbesar dari data diikuti dengan komponen utama kedua dan seterusnya (Varmuza, 2000).

Teknik PCA berdasar pada dekomposisi matriks data  $\mathbf{X}$  ( $N \times K$ ) menjadi dua matriks  $\mathbf{T}$  ( $N \times A$ ) dan matriks  $\mathbf{P}$  ( $K \times A$ ) yang saling tegak lurus (Gambar 2.5). Matriks  $\mathbf{T}$  yang disebut dengan matriks *scores* menggambarkan variansi dalam objek, sedangkan matriks  $\mathbf{P}$  yang disebut dengan matriks *loading* menjelaskan pengaruh variabel terhadap komponen utama. Matriks  $\mathbf{P}$  terdiri atas data asli dalam sistem koordinat baru. *Error* dari model yang terbentuk dinyatakan dalam  $\mathbf{E}$  (Lohninger, 2004).



Gambar 2.5. Prinsip PCA (Lohninger, 2004)

### 2.7.2 *Partial Least Square (PLS)*

PLS merupakan salah satu metode kalibrasi multivariat yang paling sering digunakan dalam kemometrik. Hal ini dikarenakan mutu model kalibrasi yang dihasilkan dan kemudahan penerapannya. PLS mampu menganalisis data dengan jumlah yang cukup banyak, memiliki tingkat kolinearitas tinggi, sejumlah besar variabel X, dan beberapa variabel respon Y (Kuno and Matsuo, 2000).

Metode ini adalah sebuah metode reduksi dimensi data, sejenis dengan PCA, untuk mencari faktor-faktor yang paling relevan dalam memprediksi dan menginterpretasi data. Regresi PLS meningkatkan kemampuan model dari PCA dengan menggunakan variabel respon secara aktif dalam dekomposisi bilinear prediktor. PCA terfokus pada keragaman di dalam prediktor, sedangkan PLS fokus pada kovarian diantara respon dan prediktor-prediktor. Dengan jalan menyeimbangkan informasi antara prediktor dan respon, PLS mereduksi dampak dari banyaknya prediktor yang tidak relevan dengan keragaman data. Estimasi kesalahan prediktor ditingkatkan dengan cara validasi silang. PCA yang dilanjutkan dengan membentuk model regresi dan PLS-R dapat diterapkan untuk kalibrasi yang melibatkan dimensi prediktor relatif besar dengan respon yang relatif sedikit (Rohman *et al.*, 2011).

### 2.7.3 *Principal Component Regression (PCR)*

PCR merupakan teknik analisis multivariat yang dilakukan dengan terlebih dahulu mereduksi komponen dengan teknik PCA dilanjutkan dengan teknik analisis regresi antara komponen utama yang baru terhadap respon (Miller and Miller, 2005).

PCR hampir sama dengan teknik PLS. Perbedaan antara keduanya terletak pada proses penentuan komponen utama atau *principal component* (PC). Pada PCR penentuan PC hanya berdasarkan variasi maksimum data spektrum dan data respon secara bersamaan (Miller and Miller, 2005).

#### 2.7.4 *Multiple Linear Regression* (MLR)

MLR merupakan salah satu metode regresi multilinier atau regresi yang melibatkan prediktor (variabel) dalam jumlah yang banyak. Regresi ini membutuhkan beberapa data berupa satu set variabel bebas (prediktor) untuk memperkirakan harga variabel tergantung prediksi. Dalam hal ini, analisis korelasi sangat penting untuk mengetahui hubungan antarvariabel. Untuk membentuk suatu model regresi, jumlah sampel dalam kalibrasi harus lebih besar dari jumlah prediktor (Miller and Miller, 2005).

#### 2.7.5 *Artificial Neural Network* (ANN)

ANN didefinisikan sebagai sistem pemrosesan informasi yang mempunyai karakteristik performansi yang didasarkan pada pemodelan sistem syaraf biologis melalui pendekatan dari sifat-sifat komputasi biologis. ANN terdiri dari beberapa neuron atau node atau elemen pemrosesan (PE), dan terdapat hubungan antara neuron-neuron tersebut. Neuron akan mentransformasikan (*signals*) yang diterima melalui jalur keluarannya menuju neuron yang lain, hubungan ini dikenal dengan istilah bobot (*weight*) (Fauzi and Trilita, 2005).

#### 2.7.6 *Linear Discriminant Analysis* (LDA)

Analisis diskriminan adalah salah satu teknik statistik yang bisa digunakan pada hubungan depensi (hubungan antar variabel yang sudah bisa dibedakan variabel respon dan variabel penjelas). Variabel respon berupa data kualitatif dan variabel penjelas berupa data kuantitatif (Varmuza, 2000).

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 data set yang digunakan untuk membentuk model. Metode yang lebih baik adalah dengan membagi data asli menjadi dua kelompok yang dipilih secara acak. Kelompok pertama disebut *training set* dan digunakan untuk menentukan fungsi diskriminan linier. Objek pada kelompok kedua disebut *test set* dan digunakan untuk mengevaluasi kinerja fungsi diskriminan linier dan keberhasilan LDA dapat diketahui. Cara ketiga adalah dengan menggunakan validasi silang dengan metode *leave-one-out* (LOO) yang mana satu objek dihilangkan dan fungsi diskriminan linier diperiksa apakah objek yang telah dihilangkan dapat diklasifikasikan dengan benar atau tidak (Miller and Miller, 2010).

## 2.8 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), 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.

## 2.9 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrum tampak terdapat pada rentang panjang gelombang 400 nm (ungu) sampai 750 nm (merah), sedangkan spektrum ultraviolet terdapat pada rentang panjang gelombang 200 nm sampai 400 nm. Absorbansi cahaya ultraviolet atau

cahaya tampak mengakibatkan suatu transisi elektronik yaitu promosi elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi yang berenergi lebih tinggi. Energi yang terserap selanjutnya terbuang sebagai kalor, sebagai cahaya, atau tersalurkan dalam reaksi kimia (Fessenden and Fessenden, 1995).

Absorpsi energi direkam sebagai absorban. Absorban pada suatu panjang gelombang tertentu didefinisikan sebagai :

$$A = \log \frac{I^0}{I}$$

Dengan:

A = absorbansi

$I^0$  = Intensitas sinar yang datang

I = Intensitas sinar yang ditransmisikan

Absorban suatu senyawa pada suatu panjang gelombang tertentu bertambah dengan molekul yang mengalami transisi. Oleh karena itu absorban bergantung pada struktur elektronik senyawanya dan juga pada kepekatan sampel (Fessenden and Fessenden, 1995).

Output dari spektrofotometri UV-Vis dapat berupa spektra UV-Vis yang dapat digunakan sebagai informasi kualitatif dan dapat digunakan untuk analisis kuantitatif. Dari aspek kualitatif spektroskopi UV-Vis menghasilkan data berupa panjang gelombang maksimal, intensitas, efek pH dan pelarut yang kesemuanya dapat dibandingkan dengan data yang sudah dipublikasikan sebelumnya. Dari aspek kuantitatif suatu berkas radiasi dikenakan pada larutan sampel (cuplikan) yang akan diukur dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan tersebut kemudian diukur besarnya. Intensitas atau kekuatan radiasi cahaya sebanding dengan jumlah foton melalui satu satuan luas penampang per detik (Gandjar and Rohman, 2007).



## 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 September 2015.

### 3.2 Rancangan Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah flavonoid dalam beberapa daun tanaman yang diekstraksi. Ekstraksi dilakukan dengan metode ultrasonikasi dan metode maserasi menggunakan metanol 98%. Kadar flavonoid ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis menggunakan pereaksi aluminium klorida dengan standar kuersetin. Analisis profil flavonoid dilakukan dengan melihat pola spektrumnya melalui spektroskopi inframerah 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 flavonoid dalam sampel nyata. Kadar yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan data kadar spektrofotometri UV-Vis.

### 3.3 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.3.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (UV-Vis Hitachi U 1800), spektrometer FTIR (Bruker Alpha) dengan asesoris ATR (*attenuated total reflectance*), perangkat lunak OPUS, spektroskopi 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), *rotavapour*, oven (Memmert), timbangan analitik digital

(Sartorius), blender, *beaker glass*, gelas ukur, erlenmeyer, batang pengaduk, mortir, stamper, corong, cawan porselin, botol vial, sendok ekstrak, dan ayakan B-60.

### 3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun (Tabel 3.1) yang berasal dari UPT Materia Medica Kecamatan Batu Kabupaten Malang, ekstrak daun yang telah tersedia (Tabel 3.2), kapsul stimuno, kapsul daun salam, metanol 98% teknis, etanol 96% teknis, kuersetin (Sigma-Aldrich), aluminum klorida (Merck), kalium asetat (UPT BPPTK LIPI), aquadest, aerosil (*pharmaceutical grade*), kertas saring, dan alumunium foil.

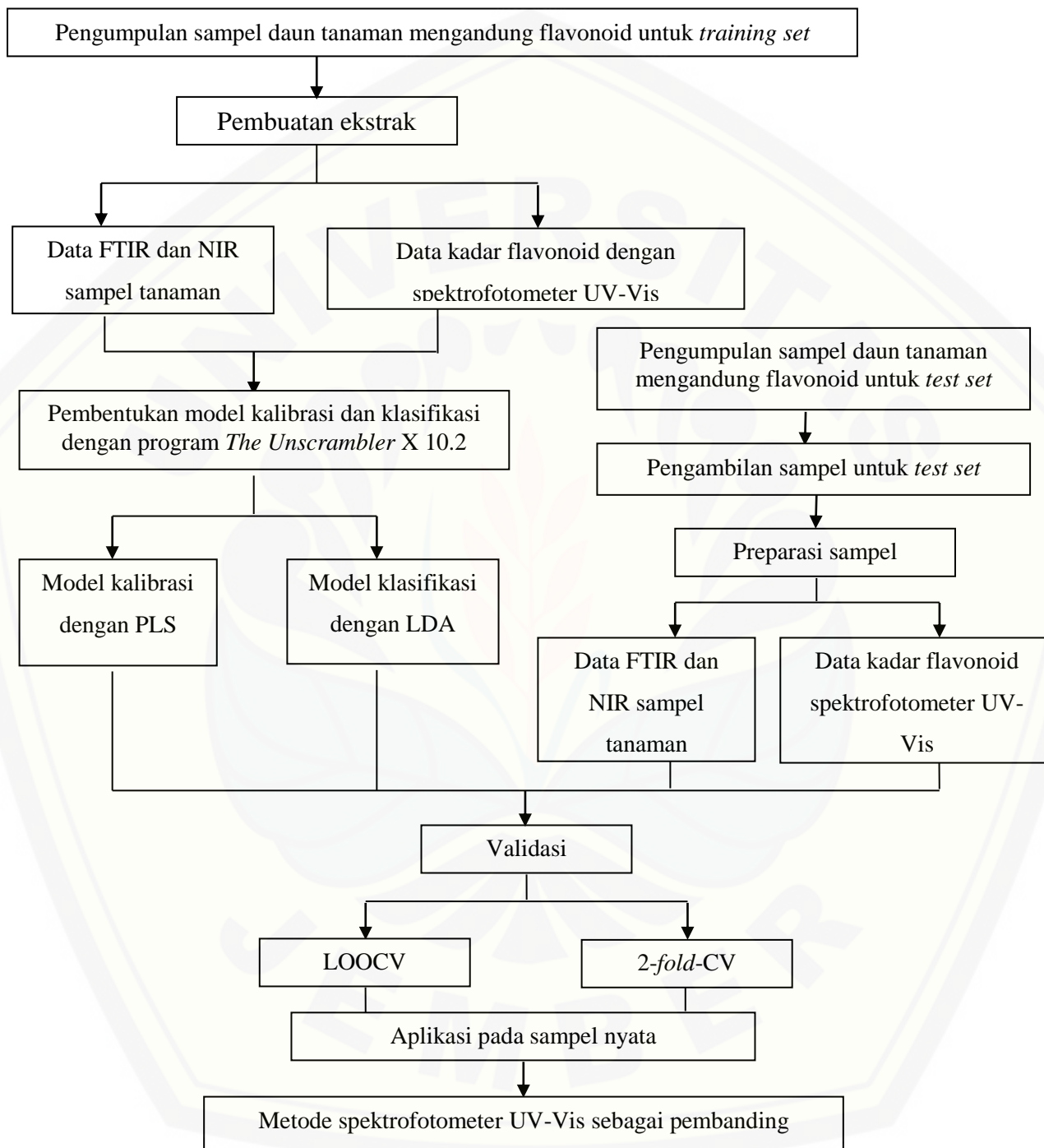
Tabel 3.1. Simplisia yang digunakan

| No  | Spesies Tanaman    | Nama Ilmiah                    |
|-----|--------------------|--------------------------------|
| 1.  | Daun Kembang bulan | <i>Tithonia diversifolia</i>   |
| 2.  | Daun Kunir putih   | <i>Kaempferia rotunda</i>      |
| 3.  | Daun Mangga        | <i>Mangifera indica</i>        |
| 4.  | Daun Pepaya        | <i>Carica papaya</i>           |
| 5.  | Daun Mengkudu      | <i>Morinda citrifolia</i>      |
| 6.  | Daun Binahong      | <i>Anredera cordifolia</i>     |
| 7.  | Daun Patikan kebo  | <i>Euphorbiae hirtae</i>       |
| 8.  | Daun Katuk         | <i>Sauropus androgynus</i>     |
| 9.  | Daun Sirih         | <i>Piper betle</i>             |
| 10. | Daun Jambu biji    | <i>Psidium guajava</i>         |
| 11. | Daun lamtoro       | <i>Leucaena glauca</i>         |
| 12. | Daun Sirsak        | <i>Annona muricata</i>         |
| 13. | Daun Pandan        | <i>Pandanus amaryllifolius</i> |

Tabel 3.2. Ekstrak daun yang sudah jadi

| No | Ekstrak                | Nama Ilmiah                    |
|----|------------------------|--------------------------------|
| 1. | Daun pare              | <i>Momordica charantia</i>     |
| 2. | Daun putri malu        | <i>Mimosa pudica</i>           |
| 3. | Daun sambiloto         | <i>Andrographis paniculata</i> |
| 4. | Daun sirih merah       | <i>Piper ornatum</i>           |
| 5. | Daun kopi arabika muda | <i>Coffea arabica</i>          |
| 6. | Daun kopi arabika tua  | <i>Coffea arabica</i>          |
| 7. | Daun kopi robusta muda | <i>Coffea canephora</i>        |

### 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 kembang bulan, daun kunir putih, daun mangga, daun pepaya, daun mengkudu, daun binahong, daun patikan kebo, daun katuk, daun sirih, daun jambu biji, daun lamtoro, daun sirsak, 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 aquadest dan aerosil.

Peneliti tidak melakukan identifikasi masing-masing sampel tanaman, sehingga untuk selanjutnya nama tanaman menggunakan identitas kode tanaman (Tabel 3.3).

Tabel 3.3. Identitas kode tanaman

| No  | Kode | Nama Tanaman      |
|-----|------|-------------------|
| 1.  | A    | Kopi arabika muda |
| 2.  | B    | Kopi arabika tua  |
| 3.  | C    | Jambu biji        |
| 4.  | D    | Katuk             |
| 5.  | E    | Kembang bulan     |
| 6.  | F    | Mangga            |
| 7.  | G    | Pandan            |
| 8.  | H    | Pare              |
| 9.  | I    | Patikan kebo      |
| 10. | J    | Pepaya            |
| 11. | K    | Putri malu        |
| 12. | L    | Sambiloto         |
| 13. | M    | Sirih merah       |
| 14. | N    | Sirih             |
| 15. | O    | Sirsak            |
| 16. | P    | Binahong          |
| 17. | Q    | Kunir putih       |
| 18. | R    | Lamtoro           |
| 19. | S    | Mengkudu          |
| 20. | T    | Kopi robusta muda |

### 3.5.2 Pembuatan Ekstrak

Daun yang telah kering diangin-anginkan di oven terlebih dahulu. Daun yang sudah kering diblender hingga halus. Serbuk daun ditimbang sebanyak 80 gram diletakkan di dalam erlenmeyer. Serbuk dibagi menjadi 2 bagian sehingga masing-masing erlenmeyer berisi 40 gram serbuk. Sebanyak 400 ml metanol 98% ditambahkan pada masing-masing erlenmeyer kemudian di ekstraksi dengan ultrasonikasi selama 1 jam. Hasil ekstraksi dengan ultrasonikasi kemudian didiamkan selama 24 jam (metode maserasi). Ekstrak cair yang didapat kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu 60 °C selama 1,5 jam untuk menguapkan pelarut dan diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian dikeringkan dengan aerosil. Selanjutnya ekstrak yang sudah kering digerus sampai halus dan diayak dengan ayakan B-60, kemudian disimpan dalam vial yang telah diberi label.

### 3.5.3 Akuisisi Spektrum Menggunakan FTIR

Metode akuisisi atau pengumpulan spektrum dengan spektroskopi FTIR digunakan pada setiap pengukuran sampel. Setiap scan sampel dilakukan pengukuran *background* dengan tidak ada sampel diatas plat ATR. Sampel serbuk dimasukkan pada *ring* dan diletakkan pada plat. Sampel discan pada frekuensi 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$  dengan 32 kali scan dan resolusi sebesar 4  $\text{cm}^{-1}$ . Setiap penggantian sampel, plat ATR dibersihkan dengan isopropil 70% sebelum diisi dengan sampel berikutnya. Spektrum direkam sebagai nilai absorbansi.

### 3.5.4 Pengukuran Pantulan Spektrum NIR

Instrumen NIR dihidupkan dan ditunggu selama 30 menit. Selanjutnya dibuka perangkat lunak Brimrose. Sampel yang telah dipreparasi diletakkan diatas plat tempat sampel secara merata. Satu sampel di-*scan* 4 kali dan dilakukan 3 kali penembakan pada masing-masing *scanning*. 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 (Camo software)*.

### 3.5.5 Penentuan Kadar Flavonoid Total dengan Spektrofotometer UV-Vis (Chang *et al.*, 2002).

#### a. Pembuatan kurva kalibrasi kuersetin

Larutan baku dibuat dengan menimbang 10 mg kuersetin, dilarutkan dengan etanol 10 mL. Satu seri konsentrasi larutan kuersetin dalam etanol dibuat dari larutan baku, yaitu dengan rentang konsentrasi 100 - 300  $\mu\text{g/mL}$ . Selanjutnya dilakukan pengenceran larutan induk kuersetin dengan memipet sejumlah tertentu larutan induk, dilarutkan dengan 3 mL etanol ditambahkan 0,2 mL  $\text{AlCl}_3$  10% ditambahkan 0,2 mL kalium asetat 1M ditambahkan aquadest sampai tanda, didiamkan 30 menit

(hasil optimasi), diukur absorbansinya pada panjang gelombang 432 nm. Blangko yaitu semua reagen tanpa larutan standar. Dari data ini dibuat persamaan regresi antara konsentrasi kuersetin dengan serapan.

b. Pengujian akurasi metode spektrofotometri UV-Vis yang digunakan untuk penetapan kadar kuersetin

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 etanol. Sebanyak 0,5 ml larutan dilarutkan dengan etanol (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 sebanyak 0,5 ml larutan adisi dilarutkan 3 mL etanol, ditambahkan 0,2 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, ditambahkan 0,2 mL kalium asetat 1M, ditambakan aquadest sampai tanda, kemudian kocok sampai homogen. 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).

c. Penentuan kadar flavonoid total

Ekstrak ditimbang sebanyak 40 mg, dilarutkan dengan etanol 10 mL. Sebanyak 0,5 ml larutan ekstrak dilarutkan 3 mL etanol, ditambahkan 0,2 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, ditambahkan 0,2 mL kalium asetat 1M, ditambakan aquadest sampai tanda, didiamkan 30 menit (hasil optimasi), diukur absorbansinya pada panjang gelombang 432 nm. Blangko yaitu semua reagen tanpa larutan ekstrak.

### 3.5.6 Pembentukan model klasifikasi dan kalibrasi

Data yang diperoleh dari pengukuran spektroskopi FTIR diolah dengan perangkat lunak *The Unscrambler versi X 10*. Pembentukan model klasifikasi dilakukan dengan metode *Linear Discriminant Analysis*, 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 kategori objek. Kategori tersebut yaitu “matriks” dan “flavonoid”. Dimana “matriks” adalah sampel bukan ekstrak yang terdapat dalam ekstrak (aquadest dan aerosil), sedangkan “flavonoid” adalah sampel ekstrak daun. 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*. Model klasifikasi dikatakan valid apabila % akurasi yang diperoleh sebesar 100%. Model klasifikasi yang terbentuk kemudian dapat digunakan untuk memprediksi klasifikasi dari sampel yang belum diketahui.

Pembentukan model kalibrasi dibuat dengan metode *Partial Least Square* (PLS). Data absorbansi dari spektrum FTIR sampel yang mengandung flavonoid dianalisis untuk membentuk sebuah model kalibrasi, nilai absorbansi ditandai sebagai prediktor (variabel  $x$ ) dan konsentrasi sebagai respon (variabel  $y$ ). Langkah-langkah yang dilakukan adalah: 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. Objek dikelompokkan dengan mengklik *define range* dan *column range* diisi dengan nilai konsentrasi pada kolom 1 dan absorbansi pada kolom lain. 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  $R^2 \geq 0,90$ , nilai galat RMSEC dan RMSECV terbaik apabila nilai semakin kecil.

Data yang diperoleh dari pengukuran spektroskopi NIR juga diolah dengan perangkat lunak *The Unscrambler versi X 10.2*. Yang membedakan dengan pengolahan data yang diperoleh dari pengukuran spektroskopi FTIR adalah data yang dimasukkan formatnya berupa Brimrose. Selanjutnya dilakukan prosedur yang sama seperti pada pengolahan data yang diperoleh dari pengukuran spektroskopi FTIR.

### 3.5.7 Validasi model PLS dan LDA

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

#### 1) *Leave-One-Out-Cross Validation (LOOCV)*

Set validasi ini dibuat dengan meninggalkan satu data dari masing-masing replikasi sampel untuk validasi silang, yaitu dengan melibatkan sampel pengamatan tunggal dari 15 sampel ekstrak *training set* yang terdiri dari 6 sampel ekstrak yang sudah jadi dan dari 9 sampel ekstrak yang diekstraksi oleh peneliti. Hal ini dilakukan berulang pada setiap observasi dalam sampel yang digunakan sebagai data validasi.

#### 2) *2-Fold Cross-Validation (Test set)*

*Test set* terdiri dari objek/sampel yang diketahui pengkategoriannya namun digunakan untuk mengevaluasi reliabilitas model yang telah dibentuk oleh *training set* (Berrueta *et al.*, 2007). Sebanyak lima sampel ekstrak disiapkan sebagai *test set* yang terdiri dari 1 sampel ekstrak yang sudah jadi dan dari 4 sampel ekstrak yang diekstraksi oleh peneliti.

### 3.5.8 Aplikasi pada sampel ekstrak nyata

Tahap ini bertujuan untuk mengaplikasikan model kemometrik yang telah dibentuk pada ekstrak daun (sediaan kapsul) yang beredar dipasaran. Dilakukan

preparasi sampel dengan menimbang 10 kapsul dari masing-masing sampel dan dihitung berat rata-ratanya. Masing-masing sampel kemudian di-*scan* dengan instrumen spektroskopi IR sehingga diperoleh data spektrum dengan absorbansi sebagai prediktor pada model kalibrasi PLS untuk analisis secara kuantitatif dan pada model LDA untuk menentukan klasifikasi komponen matriks dan flavonoid secara kualitatif. Sebagai data pembandingan untuk penetapan kadar, digunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Hasil analisis kadar flavonoid dengan metode spektroskopi IR dan kemometrik yang dibandingkan dengan metode pembandingan spektrofotometri UV-Vis kemudian diuji dengan analisis statistik Uji T Dua Sampel Berpasangan.

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan penentuan kadar flavonoid pada ekstrak daun tanaman menggunakan metode spektroskopi inframerah dan kemometrik. Adapun tahapan yang dilakukan adalah pengumpulan sampel, pembuatan ekstrak, preparasi sampel *training set*, *test set* dan sampel nyata, penentuan data FTIR dan NIR, dan penentuan kadar dengan spektrofotometri UV-Vis. Data spektrum IR yang telah diperoleh pada Lampiran B digunakan untuk membentuk model klasifikasi dan kalibrasi kemometrik. Kemudian dilakukan validasi dan diaplikasikan pada sampel ekstrak daun (sediaan kapsul) yang beredar dipasaran.

### 4.1 Pembuatan Ekstrak Sampel

Tahap pertama dalam proses ekstraksi yaitu pengeringan daun. Proses pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air dalam simplisia sehingga proses penghalusan serbuk menjadi lebih mudah. Proses penghalusan serbuk bertujuan untuk memperluas permukaan bahan yang kontak dengan pelarut sehingga proses ekstraksi menjadi lebih efektif (Harborne, 1987).

Ekstraksi dilakukan dengan cara ultrasonikasi dan maserasi. Ultrasonikasi yaitu ekstraksi dengan alat yang menghasilkan frekuensi bunyi atau getaran antara 25 - 100 KHz (Harborne, 1987). Metode ekstraksi ultrasonikasi digunakan karena ultrasonikasi memanfaatkan gelombang ultrasonik dengan frekuensi rendah 20 - 40 kHz menyebabkan terjadi proses kavitasi. Proses kavitasi disini dapat membantu difusi pelarut ke dalam dinding sel tanaman sehingga proses perpindahan masa senyawa bioaktif dari dalam sel tanaman ke pelarut menjadi lebih cepat. Hal tersebut menyebabkan waktu ekstraksi menjadi lebih singkat (Ashley *et al.*, 2001). Setelah diultrasonikasi, serbuk didiamkan selama 24 jam, yang disebut juga metode ekstraksi maserasi. Maserasi, yaitu metode ekstraksi dengan cara merendam sampel dalam

pelarut dengan atau tanpa pengadukan (Harborne, 1987). Tujuan digunakan kombinasi metode ekstraksi ultrasonikasi dan maserasi yaitu meningkatkan efektivitas metode ekstraksi, sehingga kombinasi dua metode akan lebih baik dibandingkan dengan satu metode. Selain itu, metode ultrasonikasi dan maserasi dipilih karena kedua metode tersebut tidak memerlukan pemanasan, sehingga sesuai digunakan untuk ekstraksi flavonoid (kuersetin) yang pada suhu 60 °C selama 2 jam akan turun aktivitasnya (Ewald *et al.*, 1999).

Pelarut yang digunakan pada kedua metode ekstraksi adalah metanol 98%. Metanol 98% digunakan sebagai pelarut karena metanol memiliki struktur molekul kecil yang mampu menembus semua jaringan tanaman untuk menarik senyawa aktif keluar. Metanol dapat melarutkan hampir semua senyawa organik, baik senyawa polar maupun non-polar. Selain itu metanol mudah menguap sehingga mudah dipisahkan dari ekstrak (Resi and Surgani, 2009).

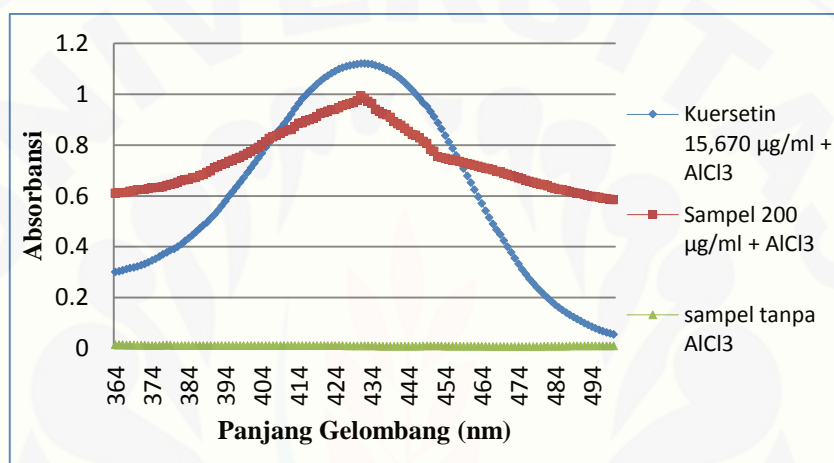
Ekstrak yang diperoleh kemudian ditimbang untuk menghitung rendemennya. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000). Perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran D. Dari hasil ekstraksi diketahui bahwa persen rendemen yang paling besar yaitu ekstrak etanol daun mangga, sedangkan persen rendemen yang paling rendah adalah ekstrak etanol daun pandan.

## **4.2 Penetapan Kadar Flavonoid Total dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis**

### **4.2.1 Penetapan panjang gelombang maksimum**

Sebelum dilakukan penetapan kadar flavonoid total, dilakukan scanning panjang gelombang maksimum. Pengukuran panjang gelombang maksimum ini dilakukan dengan mengukur absorbansi sampel dan standar setelah direaksikan dengan etanol,  $AlCl_3$ , kalium asetat, dan aquadest (Chang *et al.*, 2002). Konsentrasi kuersetin yang digunakan pada pengukuran adalah sebesar 15,670  $\mu g/ml$  karena pada konsentrasi tersebut menghasilkan absorbansi yang optimal. Konsentrasi ekstrak

yang digunakan adalah 200 µg/ml berdasarkan penimbangan ekstrak yang dilakukan. Panjang gelombang maksimum terpilih adalah 432 nm karena pada panjang gelombang tersebut memberikan intensitas spektrum paling tinggi. Hasil penetapan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Lampiran I dan Gambar 4.1. Panjang gelombang terpilih ini selanjutnya digunakan untuk pengukuran kadar flavonoid total.

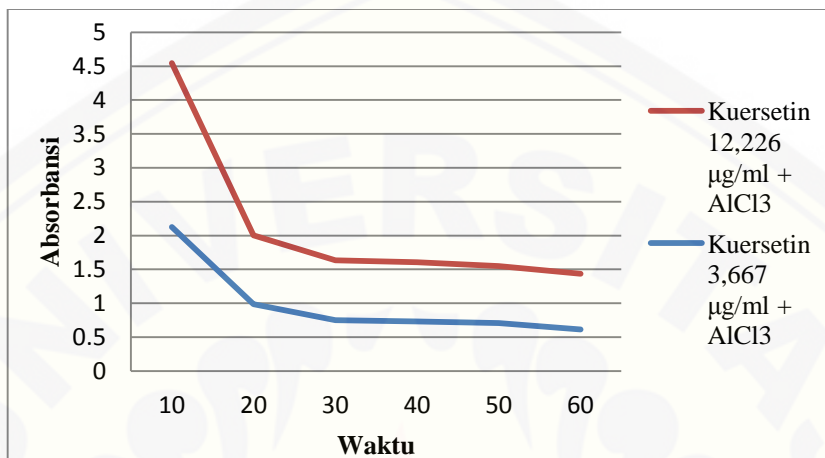


Gambar 4.1 Spektra panjang gelombang penetapan kadar flavonoid total

#### 4.2.2 Penentuan waktu inkubasi

Pada tahap ini ditentukan waktu optimum inkubasi standar dan sampel setelah ditambahkan dengan etanol, AlCl<sub>3</sub>, kalium asetat, dan aquadest untuk bereaksi sempurna. Standar direaksikan dengan etanol, AlCl<sub>3</sub>, kalium asetat, dan aquadest kemudian diamati absorbansinya pada panjang gelombang 432 nm mulai menit ke-0 sampai menit ke-60 dengan selang waktu 10 menit. Waktu reaksi dikatakan optimum jika penurunan absorbansi yang dihasilkan relatif stabil (Molyneux, 2004). Nilai waktu optimum inkubasi selama 30 menit merupakan waktu yang digunakan dalam metode kolorimetri menggunakan AlCl<sub>3</sub> (Chang *et al.*, 2002). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada menit ke-30 absorbansi larutan standar

relatif konstan, sehingga pada penentuan kadar flavonoid semua sampel selanjutnya dilakukan pada menit ke-30 (Gambar 4.2).



Gambar 4.2 Absorbansi larutan standar dengan penambahan etanol, AlCl<sub>3</sub>, kalium asetat, dan aquadest mulai menit ke-10 hingga ke-60

#### 4.2.3 Pengujian akurasi metode spektrofotometri UV-Vis yang digunakan untuk penetapan kadar kuersetin

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Pada penelitian ini uji akurasi dilakukan dengan metode penambahan standar (*standard addition method*). Ekstrak yang digunakan untuk uji akurasi adalah ekstrak dengan kadar kuersetin paling tinggi, yaitu ekstrak C dengan kadar kuersetin 51,4856 mg QE/g ekstrak (5,14856%).

Uji akurasi dengan metode penambahan standar dilakukan dengan menghitung % *recovery* yang dihasilkan dari penambahan standar sebanyak 30% dan 60% dari kadar analit dalam sampel yang didapat dari hasil uji presisi. Data perhitungan akurasi dapat dilihat pada Lampiran H dan hasil uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil uji akurasi kuersetin

| Adisi | Penimbangan sampel (mg) | Penambahan standar adisi (mg) | Massa teoritis (mg) | Massa hasil percobaan (mg) | Recovery (%) | Rata-rata (%) | RSD (%) |
|-------|-------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------------|--------------|---------------|---------|
| 30%   | 40,2                    | 0,618                         | 53,7544             | 52,3976                    | 97,4759      | 97,6318       | 0,37    |
|       | 40,2                    | 0,618                         | 53,7544             | 52,3447                    | 97,3775      |               |         |
|       | 40,0                    | 0,618                         | 53,5484             | 52,5000                    | 98,0421      |               |         |
| 60%   | 40,1                    | 0,620                         | 66,0914             | 65,2623                    | 98,7455      | 98,2419       | 0,46    |
|       | 40,2                    | 0,620                         | 66,1944             | 64,9413                    | 98,1069      |               |         |
|       | 40,4                    | 0,620                         | 66,4004             | 64,9884                    | 97,8735      |               |         |
|       |                         |                               |                     |                            | Rata-rata    | 97,8937       | 0,42    |

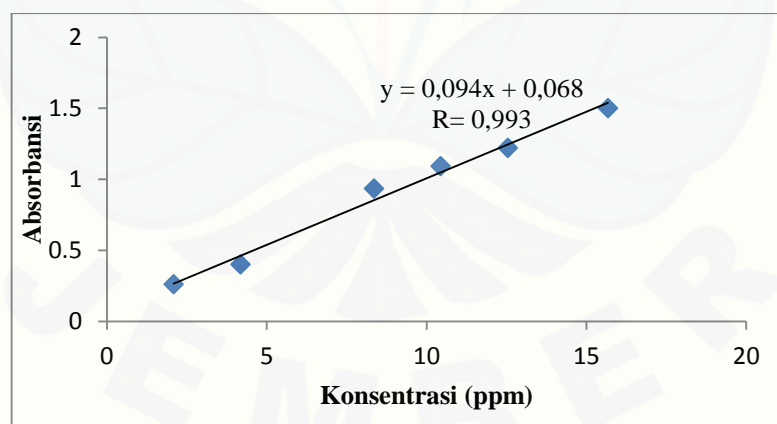
Kriteria penerimaan untuk uji akurasi dengan kadar analit lebih dari 1% adalah *mean recovery* yang diperoleh berada pada rentang 97% - 103% dengan RSD kurang dari 2,7% (AOAC, 1998). Berdasarkan Tabel 4.1, *mean recovery* yang diperoleh dari penelitian ini adalah 97,8937% dengan RSD 0,42%. Hasil yang diperoleh telah memenuhi kriteria penerimaan uji akurasi yang digunakan. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan dapat memberikan hasil yang akurat.

#### 4.2.4 Penetapan kadar sampel *training set* dan *test set* dengan metode spektrofotometri UV-Vis

Sampel yang digunakan untuk *training set* dan *test set* dipilih berdasarkan teknik pengambilan sampel *purposive sampling*. Sampel ekstrak daun dipilih berdasarkan jumlah yang tersedia di laboratorium-laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember dan sampel simplisia dipilih berdasarkan studi pustaka dan ketersediaan simplisia di UPT Materia Medica Kecamatan Batu Kabupaten Malang.

*Training set* terdiri dari objek atau sampel yang diketahui pengkategorinya dan digunakan untuk membentuk model klasifikasi kemometrik (Berrueta *et al.*, 2007). Pada penelitian ini dibuat 15 sampel *training set* yang terdiri dari 6 sampel ekstrak yang sudah jadi dan dari 9 sampel ekstrak yang diekstraksi oleh peneliti.

Pada penetapan kadar flavonoid total, masing-masing ekstrak direaksikan dengan  $\text{AlCl}_3$  dan kalium asetat menghasilkan larutan berwarna kuning. Warna kuning larutan disebabkan karena terbentuknya kompleks asam yang stabil dengan gugus keton pada C-4 atau gugus hidroksil pada C-3 atau C-5 dari flavon dan flavonol (Chang *et al.*, 2002). Kandungan flavonoid total dinyatakan dalam masa ekuivalen kuersetin tiap gram ekstrak. Kuersetin dipilih sebagai standar dalam penetapan kadar flavonoid total karena kuersetin merupakan senyawa kelompok flavonol terbesar dan berada dalam jumlah sekitar 60 - 75% dari flavonoid (Resi and Surgani, 2009). Penetapan kadar dilakukan oleh peneliti dengan mengukur absorbansi larutan kerja kuersetin yang telah direaksikan pada panjang gelombang 432 nm. Nilai absorbansi yang didapatkan diplotkan dengan konsentrasi 2,089; 4,178; 8,357; 10,44; 12,536; dan 15,67  $\mu\text{g/ml}$ , sehingga didapatkan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,993 dan kurva kalibrasi standar kuersetin  $y = 0,094x + 0,068$ , dengan  $y$  merupakan nilai absorbansi dan  $x$  merupakan konsentrasi kuersetin. Konsentrasi kuersetin dan absorbansi yang dihasilkan dapat dilihat pada Lampiran E.2. Kurva standar kuersetin yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Kurva standar kuersetin

Penetapan kadar flavonoid total ekstrak daun dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan uji ekstrak daun yang telah direaksikan seperti standar kuersetin.



Selanjutnya, nilai absorbansi yang diperoleh dimasukkan ke dalam kurva kalibrasi standar kuersetin. Kadar flavonoid total dalam sampel ditunjukkan dengan miligram ekuivalen kuersetin per gram ekstrak (mg QE/g ekstrak). Perhitungan kadar flavonoid total dapat dilihat pada Lampiran K. Hasil penetapan kadar sampel *training set* dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil penetapan kadar sampel *training set*

| <b>Sampel <i>training set</i></b> | <b>Rata-rata mg QE/g ekstrak</b> |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| <b>A</b>                          | 9,8728                           |
| <b>B</b>                          | 11,2329                          |
| <b>C</b>                          | 51,4856                          |
| <b>D</b>                          | 31,5279                          |
| <b>E</b>                          | 24,1696                          |
| <b>F</b>                          | 35,6115                          |
| <b>G</b>                          | 9,7357                           |
| <b>H</b>                          | 32,7400                          |
| <b>I</b>                          | 27,8700                          |
| <b>J</b>                          | 32,5536                          |
| <b>K</b>                          | 15,0597                          |
| <b>L</b>                          | 39,2250                          |
| <b>M</b>                          | 26,4079                          |
| <b>N</b>                          | 36,4585                          |
| <b>O</b>                          | 40,2475                          |

Kinerja model dievaluasi dengan membandingkan prediksi klasifikasi terhadap kategori sebenarnya dari validasi sampel. Sampel yang telah diketahui pengkategorianya dan digunakan untuk mengevaluasi reliabilitas model yang telah dibentuk oleh *training set* disebut dengan *test set* (Berrueta *et al.*, 2007). Pada penelitian ini dibuat 5 sampel *test set* dari 1 sampel ekstrak yang sudah jadi dan dari 4 sampel ekstrak yang diekstraksi oleh peneliti. Hasil penetapan kadar sampel *test set* dapat dilihat pada Tabel 4.3

Tabel 4.3 Hasil penetapan kadar sampel *test set*

| Sampel <i>test set</i> | Rata-rata mg QE/g ekstrak |
|------------------------|---------------------------|
| P                      | 14,3892                   |
| Q                      | 20,2946                   |
| R                      | 46,0695                   |
| S                      | 26,2316                   |
| T                      | 4,0275                    |

Nilai rata-rata kadar mg QE/g ekstrak sampel *training set* dan *test set* yang diperoleh dari perhitungan pada Lampiran K dimasukkan dalam set data pada perangkat lunak *The Unscramble X 10.2* sebagai data pembanding ketika menentukan kadar dengan spektroskopi inframerah.

### 4.3 Pembentukan Model Kalibrasi dan Klasifikasi

Pembentukan model kalibrasi dan klasifikasi dilakukan dengan mengambil data spektrum menggunakan data set kalibrasi (*training set*). Dari data spektrum yang terkumpul, dilakukan pembentukan model dengan mengkalibrasikan data spektrum menggunakan teknik kemometrik. Untuk dapat mengekstraksi informasi dari data spektrum IR tersebut, diperlukan suatu metode dari kemometrik berupa analisis multivariat (Stchur *et al.*, 2002). Analisis multivariat yang digunakan pada penelitian ini yaitu analisis secara kuantitatif menggunakan PLS (*Partial Least Square*) dan analisis secara kualitatif dengan mengklasifikasikan sampel menggunakan Analisis Diskriminan (LDA).

Model PLS memberikan informasi spektrum yang relevan dengan suatu karakter kimia tertentu yang dibutuhkan. Sebagai salah satu model pengenalan dengan pola *supervised* (dengan pengawasan), pola spektrum dikenali dengan proses pengelompokan terlebih dahulu, model regresi PLS mencari korelasi linear antara variabel x hasil pengukuran spektrum (variabel prediktor) dan variabel y hasil penampakan kimiawi atau aktivitas biologis (variabel respon) (Mantanus, 2012). Tujuan digunakannya model PLS adalah untuk mereduksi dampak dari banyaknya

prediktor yang tidak relevan dengan keragaman data sehingga dapat mengestimasi kesalahan prediktor sehingga dapat meningkatkan kemampuan dari model (Amin, 2011). Pada analisis kadar flavonoid dengan spektroskopi inframerah ini, variabel  $x$  (prediktor) merupakan nilai absorbansi sampel yang telah di *scan* dengan menggunakan spektroskopi inframerah sedangkan variabel  $y$  (respon) merupakan kadar flavonoid yang telah ditentukan dengan spektrofotometri UV-Vis. Model yang prediktif terbentuk dari rentang konsentrasi yang nantinya harus dapat mencakup kadar sampel yang akan dikuantitasi (Mantanus, 2012).

Pemilihan set data yang digunakan harus memenuhi spesifikasi berdasarkan nilai  $R^2$ , RMSEC, dan RMSECV. Suatu model PLS dikategorikan sebagai model yang dapat dipercaya bila nilai korelasi dan nilai galat yang memiliki kedekatan untuk setiap tahapan pembuatan model. Korelasinya harus bernilai tinggi sedangkan galatnya bernilai rendah (Baranska, 2005).

Parameter yang dipertimbangkan dalam pembentukan model yang baik adalah berdasarkan nilai  $R^2$  kalibrasi dan  $R^2$  validasi yang merupakan nilai korelasi dimana pemilihan model terbaik apabila nilai korelasi yang diperoleh semakin besar, dan nilai galat yaitu nilai RMSEC (*Root Mean Square Error of Calibration*), dan RMSECV (*Root Mean Square Error Cross Validation*) dengan nilai yang paling rendah (Baranska, 2005).

Analisis multivariat yang digunakan pada penelitian ini untuk analisis secara kualitatif adalah menggunakan LDA (*Linear Discriminant Analysis*). Kemampuan model dalam membedakan sampel yang mengandung flavonoid (“flavonoid”) dengan sampel yang tidak mengandung flavonoid (“matriks”) dapat dilihat berdasarkan nilai % akurasi terhadap sampel dalam *training set* dan *test set*, serta % kemampuan prediksi terhadap sampel nyata.

#### 4.3.1 Pembentukan Model Kalibrasi dan Klasifikasi dengan Spektroskopi FTIR

Dalam penelitian ini, model PLS dibentuk dari 15 set kalibrasi (*training set*) dan seluruh data set kalibrasi yang digunakan tertera pada Lampiran M.1.5. Selain menggunakan seluruh data absorbansi spektrum inframerah sampel, analisis ini juga dilakukan terhadap spektrum pada daerah bilangan gelombang tertentu. Segmentasi dilakukan untuk melihat keberadaan konstituen-konstituen penting yang berperan secara signifikan dalam analisis kemometrik. Pada penelitian ini, dilakukan segmentasi untuk daerah yang mempunyai perbedaan absorbansi puncak secara visual untuk kuersetin dan sampel. Dari alasan tersebut, maka pada penelitian ini menggunakan empat daerah bilangan gelombang, yaitu daerah bilangan gelombang 4000 - 500  $\text{cm}^{-1}$  (spektrum utuh), daerah bilangan gelombang 3500 - 3000  $\text{cm}^{-1}$  (segmen A), daerah bilangan gelombang 1300 - 1000  $\text{cm}^{-1}$  (segmen B), dan daerah bilangan gelombang 1650 - 1400  $\text{cm}^{-1}$  (segmen C). Hasil analisis keempat model yang diperoleh dengan metode PLS ditunjukkan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4. Model kalibrasi dengan teknik PLS menggunakan FTIR

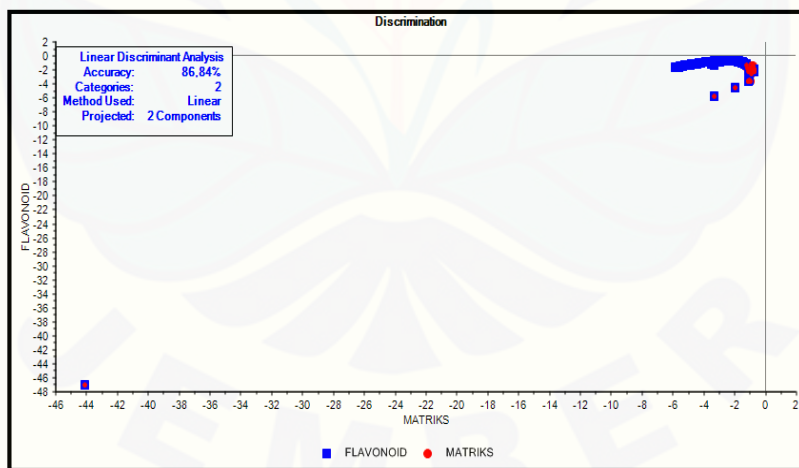
| Bilangan Gelombang           | R <sup>2</sup> Kalibrasi | R <sup>2</sup> Validasi | RMSEC     | RMSECV    |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------|-----------|
| 4000 - 500 $\text{cm}^{-1}$  | 0,8558883                | 0,5403671               | 9,2037029 | 16,860432 |
| 3500 - 3000 $\text{cm}^{-1}$ | 0,8527114                | 0,5758341               | 11,093782 | 18,985434 |
| 1300 - 1000 $\text{cm}^{-1}$ | 0,8234164                | 0,7321395               | 10,187981 | 12,915498 |
| 1650 - 1400 $\text{cm}^{-1}$ | 0,8653689                | 0,8201284               | 8,8958149 | 10,315225 |

Berdasarkan data pada Tabel 4.4, dapat diketahui bahwa model kalibrasi terbaik diperoleh pada bilangan gelombang 1650-1400  $\text{cm}^{-1}$  atau segmen C. Berdasarkan parameter R<sup>2</sup>, pada daerah tersebut mempunyai nilai yang paling baik. Nilai R<sup>2</sup> kalibrasi dari segmen C sebesar 0,8653689 dan R<sup>2</sup> validasi sebesar 0,8201284. Nilai ini merupakan nilai yang paling besar dibandingkan dengan model kalibrasi lainnya. Selain itu, nilai galat yang ditampilkan dari model tersebut paling kecil dibandingkan dengan model kalibrasi lainnya, yaitu RMSEC sebesar 8,8958149

dan RMSECV sebesar 10,315225. Parameter ini menunjukkan bahwa model mempunyai kesalahan (*error*) yang paling rendah.

Menurut Sun (2008), nilai  $R^2$  untuk menunjukkan kemampuan prediksi yang baik harus memiliki nilai yang tinggi yaitu  $\geq 0,90$  sementara dengan nilai yang rendah  $\leq 0,64$  tidak mungkin untuk memberikan akurasi yang tinggi dan konsisten dengan analisis spektroskopi IR. Lengkey *et al.* (2013) menyatakan apabila  $R^2 > 0,8 - 0,95$  maka analisis dapat dinyatakan baik, sedangkan  $R^2$  pada selang  $0,7 - 0,8$  maka analisis dapat dinyatakan cukup baik. Menurut Rohman and Che Man (2011), nilai RMSE adalah nilai kesalahan dalam model. Semakin kecil nilai RMSE, maka semakin baik model tersebut.

Pemetaan model LDA yang telah terbentuk dapat dilihat pada Gambar 4.4. Gambar tersebut menunjukkan bahwa nilai % akurasi adalah 86,84% yang artinya bahwa model tersebut tidak dapat mengklasifikasikan ke-15 sampel *training set* dengan benar, karena nilai % akurasi yang menunjukkan model dapat mengklasifikasikan semua sampel *training set* dengan benar adalah nilai 100%.

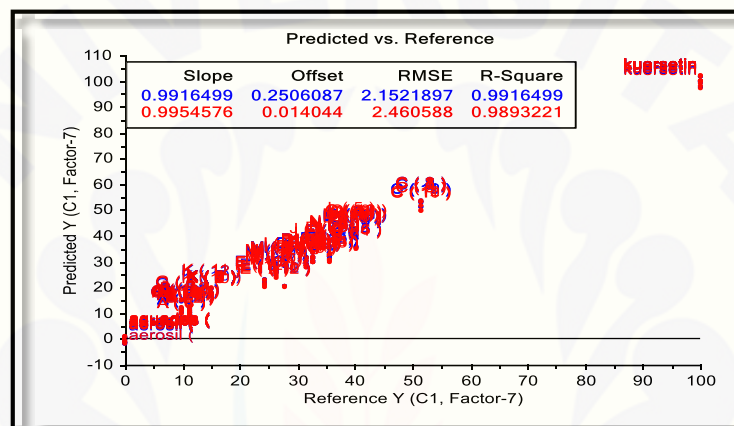


Gambar 4.4 Pemetaan model LDA menggunakan FTIR

Dari data yang telah ditunjukkan, maka dapat disimpulkan bahwa pembentukan model kalibrasi dan klasifikasi dengan FTIR belum cukup baik.

#### 4.3.2 Pembentukan Model Kalibrasi dan Klasifikasi dengan Spektroskopi NIR

Dalam penelitian ini, model PLS dibentuk dari 15 set kalibrasi (*training set*) dan seluruh data set kalibrasi yang digunakan tertera pada lampiran M.2.2. Seluruh set kalibrasi telah diperoleh data absorbansinya pada panjang gelombang 850-2000 nm. Data korelasi model kalibrasi yang dibentuk oleh metode PLS ditunjukkan pada Gambar 4.5.

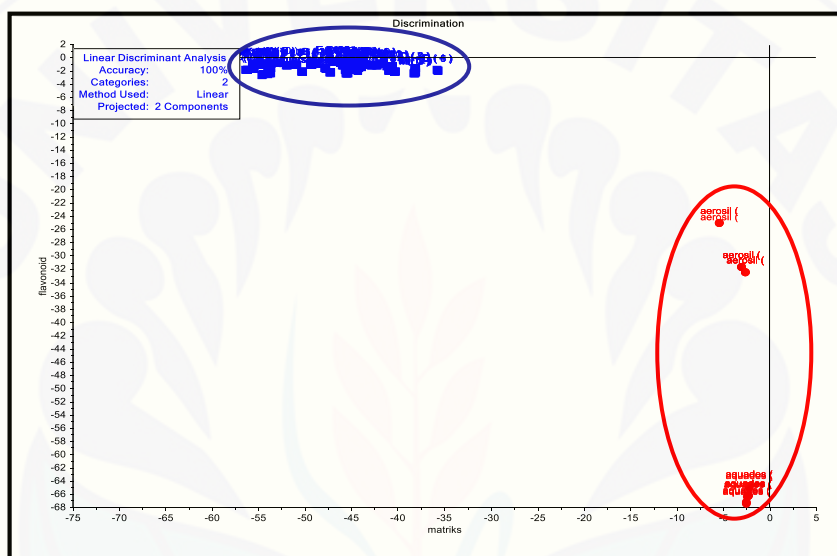


Gambar 4.5. Data korelasi model kalibrasi teknik PLS menggunakan NIR

Pada Gambar 4.4 terdapat data nilai *slope*, *Offset*, RMSE dan *R-square* yang berwarna merah dan biru. Data merah (validasi) merupakan data yang menunjukkan pengujian pada model kalibrasi, sedangkan data biru (kalibrasi) merupakan data yang menunjukkan pengujian terhadap model kalibrasi menggunakan data yang tidak digunakan untuk membentuk model kalibrasi, semakin dekat nilai antara data merah dan data biru maka persamaan semakin baik. Nilai  $R^2$  menunjukkan seberapa dekat hubungan antara nilai real atau kenyataan dengan nilai prediksi dari instrumen NIR. Pada Gambar 4.5 dapat dilihat bahwa model tersebut memiliki nilai  $R^2$  kalibrasi sebesar 0,9916499 dan  $R^2$  validasi sebesar 0,9893221. Hal ini membuktikan bahwa model tersebut mempunyai tingkat linieritas yang baik. Nilai galat yang ditampilkan dari model tersebut juga baik yang artinya model yang terbentuk tidak memiliki penyimpangan dalam memprediksi konsentrasi hasil prediksi dengan konsentrasi

sebenarnya dimana nilai galat yang ditampilkan dari model tersebut menghasilkan nilai RMSEC sebesar 2,1521897 dan RMSECV sebesar 2,460588.

Pemetaan model LDA yang telah terbentuk dapat dilihat pada Gambar 4.6. Gambar tersebut menunjukkan bahwa nilai % akurasi adalah 100% yang artinya bahwa model tersebut dapat mengklasifikasikan ke-15 sampel *training set* dengan benar.



Gambar 4.6 Pemetaan model LDA menggunakan NIR

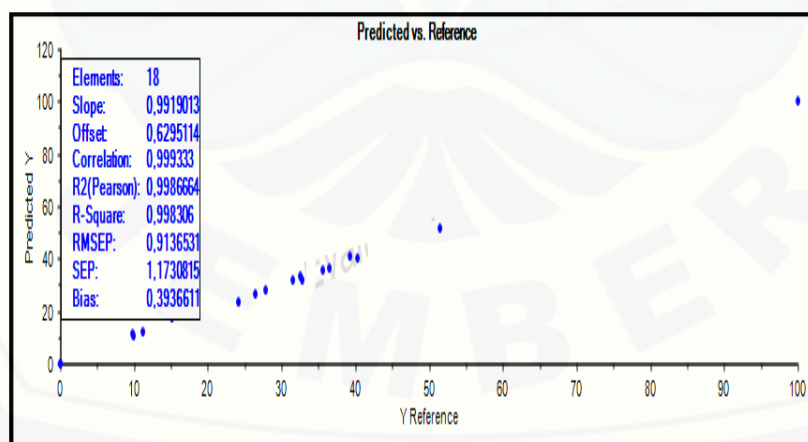
#### 4.4 Validasi model PLS dan LDA

Validasi silang perlu dilakukan dalam suatu analisis statistik, seperti analisis dengan menggunakan teknik kemometrik dalam penelitian ini. Validasi silang digunakan untuk memprediksi atau memperkirakan seberapa akurat model prediksi yang dibuat untuk dapat diimplementasikan. Kebenaran model kalibrasi dan klasifikasi yang terbentuk akan diuji dengan validasi silang. Teknik validasi silang bermanfaat untuk melakukan tes secara independen (Stchur *et al.*, 2002). Untuk memvalidasi model kalibrasi yang telah terbentuk, dilakukan validasi yaitu *Leave One Out Cross Validation* (LOOCV) dan *2-Fold Cross Validation* dengan sampel

independen (menggunakan sampel baru diluar sampel *training set*). LOOCV mengevaluasi data dengan mengambil satu data dari data kalibrasi dimana data tersebut digunakan sebagai set validasi. Sedangkan data yang tersisa digunakan untuk membentuk model baru, demikian seterusnya hingga semua data kalibrasi digunakan sebagai set validasi. Parameter yang digunakan adalah nilai  $R^2$  LOOCV.

Model kalibrasi terbentuk yang divalidasi adalah model PLS menggunakan NIR. Hal ini karena model PLS dengan NIR lebih baik dibandingkan model PLS dengan FTIR seperti yang ditunjukkan pada lampiran M.1.

Setelah memprediksi semua sampel satu per satu dengan teknik LOOCV, maka diperoleh data seperti yang tertera pada Gambar 4.7, berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa validasi LOOCV untuk model yang terpilih menunjukkan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) validasi yang baik, yaitu sebesar 0,9986664. Nilai  $R^2$  menunjukkan hubungan antara kadar flavonoid dalam sampel *training set* yang sebenarnya dibandingkan dengan kadar yang diprediksi oleh model berdasarkan variabel respon dari metode pembanding. Nilai  $R^2$  dalam penelitian ini tergolong mempunyai korelasi yang baik karena lebih dari 0,99 sehingga model dapat disimpulkan mempunyai kemampuan yang baik dalam memprediksi konsentrasi dari sampel (Rohman and Che Man, 2009).



Gambar 4.7 Hasil validasi LOOCV model PLS dengan NIR

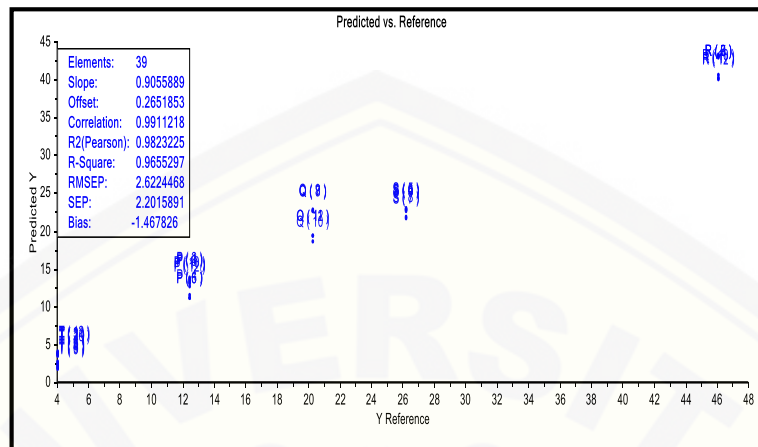


Model klasifikasi dengan LDA yang telah terbentuk divalidasi dengan teknik LOOCV dan memberikan hasil seperti yang tertera dalam Gambar 4.8. Dari data set validasi LOOCV diketahui bahwa tidak ada satupun kelompok sampel yang masuk dalam kelas yang salah, artinya bahwa model dapat mengkategorikan sampel pada kategori yang benar.

| Classified_ae   |    | matriks  |          | flavonoid | Class |
|-----------------|----|----------|----------|-----------|-------|
|                 |    | 1        | 2        | 3         |       |
| aerosil ( 12 )  | 1  | -2,6335  | -32,5050 | matriks   |       |
| aquades ( 1 )   | 2  | -2,3437  | -66,4404 | matriks   |       |
| A ( 7 )         | 3  | -53,8322 | -0,8957  | flavonoid |       |
| B ( 10 )        | 4  | -54,9094 | -1,0432  | flavonoid |       |
| C ( 12 )        | 5  | -55,4298 | -1,6750  | flavonoid |       |
| D ( 3 )         | 6  | -42,2287 | -1,2490  | flavonoid |       |
| E ( 10 )        | 7  | -46,9869 | -0,7060  | flavonoid |       |
| kuersetin ( 1 ) | 8  | -45,4901 | -2,4095  | flavonoid |       |
| F ( 6 )         | 9  | -73,5659 | -3,5332  | flavonoid |       |
| G ( 10 )        | 10 | -45,9373 | -1,1518  | flavonoid |       |
| H ( 7 )         | 11 | -60,7055 | -1,7625  | flavonoid |       |
| I ( 8 )         | 12 | -44,0617 | -1,5239  | flavonoid |       |
| J ( 9 )         | 13 | -50,8442 | -1,0940  | flavonoid |       |
| K ( 7 )         | 14 | -52,6472 | -0,8093  | flavonoid |       |
| L ( 10 )        | 15 | -38,1784 | -2,2764  | flavonoid |       |
| M ( 11 )        | 16 | -44,4144 | -1,9156  | flavonoid |       |
| N ( 9 )         | 17 | -53,7021 | -2,4320  | flavonoid |       |
| O ( 3 )         | 18 | -46,0874 | -0,7219  | flavonoid |       |

Gambar 4.8 Hasil validasi teknik LOOCV model LDA dengan NIR

Adapun metode validasi kedua yang digunakan adalah *2-fold cross validation*. Pada penelitian ini, validasi dengan *2-fold cross validation* menggunakan 5 sampel independen (*test set*) dengan konsentrasi yang telah diketahui. Sampel tersebut kemudian diprediksi menggunakan model kalibrasi terpilih. Korelasi antara konsentrasi hasil prediksi model dengan konsentrasi teoritis diketahui dengan melihat nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) prediksi. Nilai  $R^2$  yang diperoleh adalah 0,9823225 seperti yang tertera dalam Gambar 4.9. Nilai  $R^2$  ini menunjukkan bahwa model kalibrasi dari sampel *training set* yang telah dibentuk memiliki reliabilitas yang baik untuk diimplementasikan.



Gambar 4.9 Hasil validasi teknik *2-fold cross validation* model PLS dengan NIR

#### 4.5 Penerapan Model PLS dan LDA terhadap Sampel

Model PLS dengan NIR yang telah terbentuk dalam perangkat lunak *The Unscramble X 10.2* diterapkan dalam analisis kuantitatif sampel, yaitu untuk menentukan kadar sampel flavonoid dengan metode spektroskopi NIR. Nilai rata-rata kadar flavonoid total dalam sampel yang ditunjukkan dengan mg QE/g ekstrak dimasukkan dalam set data pada perangkat lunak *The Unscramble X 10.2* sebagai data pembanding (kadar teoritis) ketika menentukan kadar dengan spektroskopi NIR. Data kadar hasil percobaan dengan NIR tercantum pada Tabel 4.5.

Tabel. 4.5 Hasil perhitungan mg QE/g ekstrak sampel nyata dengan spektroskopi NIR dan dengan metode pembanding (metode spektrofotometri UV-Vis)

| Sampel Nyata | Hasil Pengukuran mg QE/g ekstrak dengan NIR $\pm$ SD | Hasil Pengukuran mg QE/g ekstrak dengan Spektrofotometri UV-Vis $\pm$ SD |
|--------------|--|--|
| Stimuno      | 36,3053 $\pm$ 2,78                                   | 35,9433 $\pm$ 0,14   |
| Daun salam   | 17,1862 $\pm$ 0,06                                   | 15,1241 $\pm$ 0,02   |

Hasil penetapan kadar dengan menggunakan dua metode yang berbeda ini kemudian dihitung nilai signifikansinya dengan analisis statistik “Uji T Dua Sampel Berpasangan” untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna antara kadar

sampel nyata yang ditetapkan dengan spektroskopi NIR terhadap kadar sampel nyata yang ditetapkan dengan spektrofotometri UV-Vis. Hasil pengolahan data dengan program SPSS tertera pada lampiran L. Dari data tersebut dapat ditarik kesimpulan bahwa tidak ada perbedaan bermakna pada kadar sampel nyata yang ditetapkan dengan kedua metode tersebut, dimana nilai signifikansi yang diperoleh adalah 0,202 dengan tingkat kepercayaan 95%. Nilai signifikansi tersebut  $> 0,05$  sehingga pengambilan keputusan hipotesis dinyatakan  $H_0$  diterima (tidak ada perbedaan bermakna) dan  $H_a$  ditolak (ada perbedaan) (Sari, 2013).

Analisis sampel secara kualitatif dilakukan dengan metode LDA. Model yang telah terpilih digunakan untuk memprediksi sampel yang belum diketahui klasifikasinya dimana hasil dari analisis klasifikasi ini dapat dilihat pada lampiran N.2.3. Berdasarkan hasil prediksi menggunakan LDA, dapat diketahui bahwa seluruh sampel diklasifikasikan dalam kategori yang benar dengan perhitungan % kemampuan prediksi sebesar 100% (Stanimirova *et al.*, 2010).

## BAB 5. PENUTUP

### 4.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang peneliti dapatkan dari keseluruhan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Metode spektroskopi inframerah dekat (NIR) dan kemometrik dapat digunakan untuk menentukan kadar flavonoid. Model kalibrasi analisis data multivariat secara kemometrik dengan PLS menggunakan spektroskopi NIR memberikan hasil terbaik dari 15 set kalibrasi dengan  $R^2$  kalibrasi sebesar 0,9916499;  $R^2$  validasi sebesar 0,9893221; RMSEC sebesar 2,1521897, dan RMSECV sebesar 2,460588, serta model klasifikasi LDA yang digunakan sebagai model klasifikasi pada pengkategorian antara matriks dengan sampel yang mengandung flavonoid memiliki akurasi sebesar 100%. Sedangkan penentuan kadar flavonoid dengan spektroskopi FTIR memberikan hasil yang kurang baik, karena nilai  $R^2$  kalibrasi sebesar 0,8653689 dan RMSEC sebesar 8,8958149, serta nilai LDA memiliki akurasi sebesar 86,84%.
2. Kadar flavonoid pada sampel nyata yang diperoleh dari spektroskopi inframerah sebesar 36,3053 mg QE/g ekstrak untuk sampel Stimuno dan 17,1862 mg QE/g ekstrak untuk sampel Daun salam. Hasil analisis kadar flavonoid dengan metode spektroskopi NIR dan kemometrik yang dibandingkan dengan metode pembanding spektrofotometri UV-Vis telah sesuai dan tidak memiliki perbedaan yang bermakna setelah diuji dengan menggunakan analisis statistik Uji T Dua Sampel Berpasangan dengan nilai signifikansi 0,202.

### 4.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, maka saran yang dapat disampaikan dalam penelitian ini meliputi sebagai berikut:

1. Perlu dikembangkan analisis kadar flavonoid pada ekstrak daun menggunakan metode kemometrik lainnya selain analisis secara kuantitatif dengan PLS dan analisis kualitatif dengan LDA.
2. Perlu dibentuk sebuah model kalibrasi dengan PLS dengan nilai  $R^2$ , RMSEC, dan RMSECV yang lebih baik dan lebih prediktif dengan jumlah sampel lebih banyak sehingga cakupan rentang konsentrasi lebih luas untuk kadar sampel yang akan dikuantitasi.
3. Perlu dibentuk model kalibrasi sampel tanaman untuk penentuan beberapa kandungan fitokimia.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Amin, M. S. (2011). *Pengkajian Metode Near Infrared (NIR) untuk Evaluasi Mutu Pakan Ayam Broiler secara Cepat dan Akurat*. Bogor: IPB.
- Anief, M. (1987). *Ilmu Meracik Obat: Teori dan Praktek*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- AOAC. (1998). *Peer-Verified Methods Program Manual on Policies and Procedures*. USA: Arlington, Virginia.
- Ashley, K., Andrews, R. N., Cavazos, L. and Demange, M. (2001). Ultrasonic extraction as a sampel preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry. *Journal of Analytic Spectrometry*, 16, p.1147–1153.
- Badan POM RI. (2005). InfoPOM. 6 (4).
- Bankova, V., Christov, R., Stoev, G. and Popov, S. (1992). Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr*, 607, p.150–153.
- Baranska, W. (2005). Quality control of harpagophytum procumbens and its related phytopharmaceutical products by means of NIR-FT-raman spectroscopy. *Biopolymers*, 77, p.1–8.
- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M. and Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography*, 1158, p.196–214.
- Brereton, R. (2000). Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analyst*, 125, p.2125–2154.
- Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics, Data Analysis For The Laboratory and Chemical Plant*. England: John Wiley & Sons Ltd.
- Bro, R. (2003). Multivariate calibration : What is in chemometrics for the analytical chemist? *Analytica Chimica Acta*, 500, p.185–194.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10 (3), p.178–182.

- Chew, O., Hamdan, M., Ismail, Z. and Ahmad, M. (2004). Assessment of herbal medicines by chemometrics – assisted interpretation of FTIR spectra. *Journal Of Analytica Chimica Acta*, 570, p.116–123.
- Cody, V. (1985). *Flavonoid in Biology And Medicine II, Biochemical Celluler and Medicinal Properties*. New York: Liss Inc.
- Cushnie, T. P. and Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (5), p.343–356.
- Cutter, E. (1989). *Plant Anatomy: Experiment and Interpretation Part 2 Organs*. London: The English Language Book Society and Edward Arnold (Publishers) Ltd.
- Davis, R. and Mauer, L. J. (2010). Fourier transforme infrared (FT-IR) spectroscopy : a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Formatex J*, p.1582–1594.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995a). *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia Medika Indonesia Volume VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Ewald, C., Modig, S. F., Johansson, K., Sjöholm, I. and Akesson, B. (1999). Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry*, 64, p.231–235.
- Fauzi, M. and Trilita, M. N. (2005). Aplikasi artificial neural network untuk peramalan aliran sungai blega. *Jurnal Rekayasa Perencanaan*, 1 (3).
- Fessenden, R. J. and Fessenden, J. S. (1995). *Kimia Organik, Jilid II*. 3rd ed. Jakarta: Erlangga.
- Gad, H., El-Ahmady, S., Abou-Shoer, M. and Al-Azizi, M. (2012). Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: A review. *Phytochemical Analysis*, 24, p.1–24.
- Gandjar, I. G. and Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Harborne, J. (1987). *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB Press.
- Harmita. (2004). Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1, p.117–135.
- Hendayana, S., Kadarohman, A., Sumarna, A. A. and Supriatna, A. (1994). *Kimia Analitik Instrumen*. 1st ed. Semarang: IKIP Semarang press.
- Hidayat, E. B. (1995). *Anatomi Tumbuhan Berbiji*. Bandung: ITB Press.
- Hornok, L. (1992). *Cultivation and Processing of Medicinal Plants*. New York: John Wiley and Sons.
- Kang, J., Li, Z., Wub, T., Jensen, G. S., Schauss, A. and Xianli, W. (2010). Antioxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chemistry*, 122, p.610–617.
- Kementrian Kehutanan RI. (2010). *Lokakarya Nasional Tanaman Obat Indonesia*. [Online]. Available at: <http://www.dephut.go.id/index.php?q=id/node/6603>. [Accessed: 23 April 2015].
- Koen, B., Ruth, V., Guido, V. and Johannes, V. S. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (7), p.5636–5645.
- Kohavi, R. (1995). A study of cross validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection. *Internatioanl Joint Conference on Artificial Intelligence (IJCAI)*, 14 (2), p.1137–1145.
- Kumar, S. and Pandey, A. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Kuno, A. and Matsuo, M. (2000). Nondestructive speciation of solid mixtures by multivariate calibration of x-ray absorption near edge structure using artificial neural networks and partial least square. *Analytic Sci*, 16, p.597–602.
- Kurniasari, I. (2006). *Metode Cepat Penentuan Flavonoid Total Meniran (Phyllanthus Niruri L.) Berbasis Teknik Spektrometri Inframerah dan Kemometrik*. *Skripsi*, Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Lengkey, L. C. E. C., Budiastra, I. W., Seminar, K. B. and Purwoko, B. S. (2013). Prediction model of moisture, fat, and free fatty acid content of physic nut



- (*Jatropha curcas* L.) seed using near infrared (NIR) Spectroscopy and partial least square (PLS) method. *Jurnal Littri*, 19 (4).
- Li, B. Q., Fu, T., Dongyan, Y., Mikovits, J. A., Ruscetti, F. W. and Wang, J. M. (2000). Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276 (2), p.534–538.
- Lohninger, H. (2004). *Multivariate Calibration* [terhubung berkala]. [Online]. Available at: [http://www.vias.org/tmdatanaleng/cc\\_multivarcal.html](http://www.vias.org/tmdatanaleng/cc_multivarcal.html) [Accessed: 23 April 2015].
- Mantanus, J. (2012). New Pharmaceutical Applications Involving Near Infrared Spectroscopy as A PAT Compliant Process Analyzer. *Thesis*, Belgium: University of Liege.
- Marchart, E., Krenn, L. and Kopp, B. (2003). Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis. *Planta Med*, 69, p.452–456.
- Markham, K., Mitchell, K., Wilkins, A., Daldy, J. and Lu, Y. (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*, 42, p.205–211.
- Markham, K. R. (1988). *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: ITB Press.
- Merken, H. and Beecher, G. (2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *J Chromatogr A*, 897, p.177–184.
- Middleton, E. J. (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 439, p.175–182.
- Miller, J. and Miller, J. (2000). *Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Fourth ed. Harlow: Pearson Education.
- Miller, J. and Miller, J. (2005). *Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Fifth ed. Harlow: Pearson Education.
- Miller, J. and Miller, J. (2010). *Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Sixth ed. Harlow: Pearson Education.

- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*, 26 (2), p.211–219.
- Mudasir and Candra, M. (2008). *Spektrometri*. Yogyakarta: Penerbit FMIPA UGM.
- Pan, M. H., Lai, C. S. and Ho, C. T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food and Function*, 1 (1), p.15–31.
- Park, Y., Koo, M., Ikegaki, M. and Contado, J. (1997). Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arq. Biol. Tecnol*, 40, p.97–106.
- Patil, S., Kondawar, M. S., Pore, Y. V. and Kuchekar, B. S. (2007). *Near Infra Red Spectroscopy: A Growing Technique in Material Analysis*. [Online]. Available at: <http://www.pharmainfo.net/reviews/near-infra-red-spectroscopy-growing-technique-materialanalysis> [Accessed: 6 September 2015].
- Pietta, P. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod*, 63, p.1035–1042.
- Pomeranz, Y. and Meloan, C. E. (1994). *Food Analysis: Theory and Practice*. Third ed. USA: Chapman & Hall.
- Pranowo, H., Tahur, I. and Widiatmoko, A. (2006). Hubungan kuantitatif struktur elektronik dan aktivitas inhibisi senyawa kurkumin pada reaksi etoksiresorufin o-dealkilasi (EROD). *Indo. J. Chem*, 7 (1), p.78–82.
- Reich, G. (2005). Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, p.1109–1143.
- Resi, A. W. and Surgani, A. (2009). *Flavonoida (Quercetin) dalam Makalah Kimia Organik*, Program S2 Kimia. Makassar: Universitas Hassanudin Indonesia.
- Rohman, A. and Che Man, Y. (2010). FTIR Spectroscopy combined with chemometrics for analysis of lard in the mixtures with body fat of lamb, cow, and chicken. *Int.l Food Res.J*, 17, p.519–526.
- Rohman, A. and Che Man, Y. (2011). The use of Fourier transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy for detection and quantification of adulteration in virgin coconut oil. *Food Chemistry*, 129, p.583–588.

- Rohman, A. and Che Man, Y. B. (2009). Analysis of cod-liver oil adulteration using fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc*, 86, p.1149–1153.
- Rohman, A., Sismindari, Erwanto, Y. and Che Man, Y. B. (2011). Analysis of pork adulteration in beef meatball using fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Meat Science*, p.91–95.
- Rozaini, N. (2003). *Teknik Sampling*. Medan: Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sumatera Utara.
- Sari, I. W. A. (2013). Analisis Kadar Siprofloksasin dalam Sediaan Tablet dengan Metode Spektroskopi Near-Infrared dan Kemometrik. *Skripsi*, Universitas Jember.
- Silverstein, Bassler and Moril. (1986). *Penyidikan Spktrofotometrik Senyawa Organik*. 4th ed. Jakarta: Erlangga.
- Skoog, D. A., Holler, F. J. and Nieman, T. A. (1998). *Principles of Instrumental Analysis*. Fifth ed. Philadelphia: Harcourt Brace.
- Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. London: CRC press.
- Stanimirova, I., Ustun, B., Cajka, T., Riddlelova, K., Hajslova, J., Buydens, L. M. and Walczak, B. (2010). Tracing the geographical origin of honeys using the GCxGC-MS and pattern recognition techniques. *Food Chemistry*, 118, p.171–176.
- Stchur, P., Cleveland, D., Zhou, J. and Michel, R. (2002). A review of recent applications of near infrared spectroscopy, and the characteristics of a novel PbS CCD array - based near infrared spectrometer. *Appl Spect Rev*, 37, p.383–428.
- Stuart, B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamental and Applications*. Philadelphia: Saunders College Publishing.
- Sukadana, I. M. (2010). Aktivitas antibakteri senyawa flavonoid dari kulit akar awar-awar (*Ficus septica* Burm F). *Jurnal Kimia*, 4 (1), p.63–67.
- Sun, D. W. (2008). *Modern Techniques For Food Authentication*. Academic Press.
- Sutedjo. (1989). *Fotosintesis Tumbuhan*. Bandung: Rineka Cipta.

- Tjitrosoepomo, G. (2005). *Morfologi Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Varmuza, K. (2000). Applied chemometrics: from chemical data to relevant information. *1st Conference on Chemistry Cairo University*.
- Voight, R. (1995). *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Fifth ed. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Woisky, R. and Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res*, 37, p.99–105.
- Zhu, W., Jia, Q., Wang, Y., Zhang, Y. and Xia, M. (2012). The anthocyanin cyanidin- 3-O- $\beta$ -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: involvement of a cAMPK- dependent signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 52 (2), p.314–327.
- Zou, H., Yang, G., Qin, Z., Jiang, W., Du, A. and Aboul-Enein, H. (2005). Progress in quality control of herbal medicine with IR fingerprint spectra. *Analytical Letters*, 38, p.1457–1475.

**LAMPIRAN**

**LAMPIRAN A. ALAT DAN BAHAN YANG DIGUNAKAN**

**A.1 Sampel Training Set dan Test Set**



**A.2 Sampel Nyata**



**A.3 Instrumen**

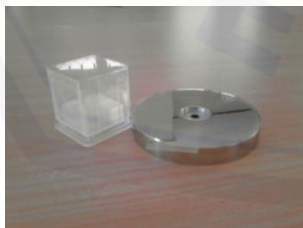


**a. Spektrofotometer NIR**



**b. Spektrofotometer FTIR**

**A.4 Kompartemen Sampel**



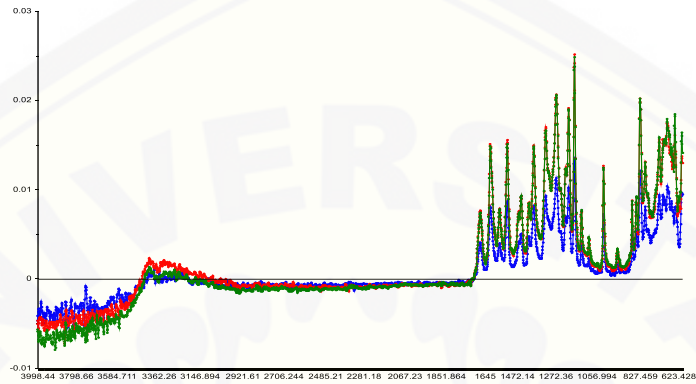
**a. NIR**



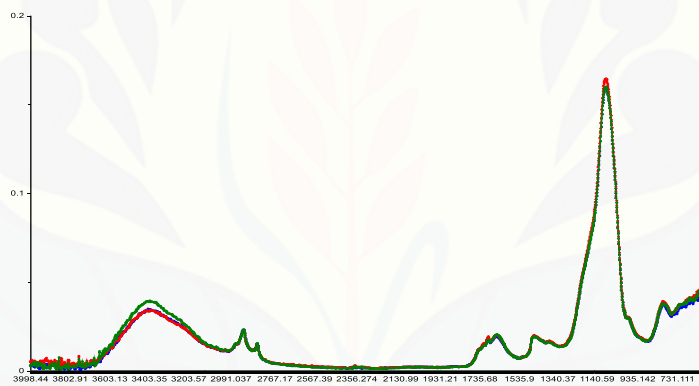
**b. FTIR**

**LAMPIRAN B. Spektrum Hasil *Scanning* dengan Spektroskopi Inframerah****B.1 Spektroskopi FTIR**

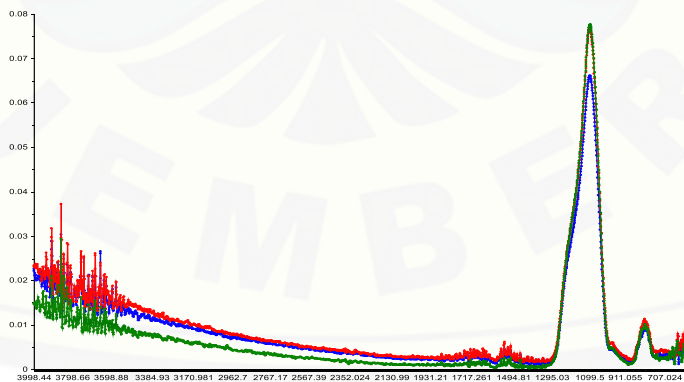
## 1. Spektrum Standar Kuersetin



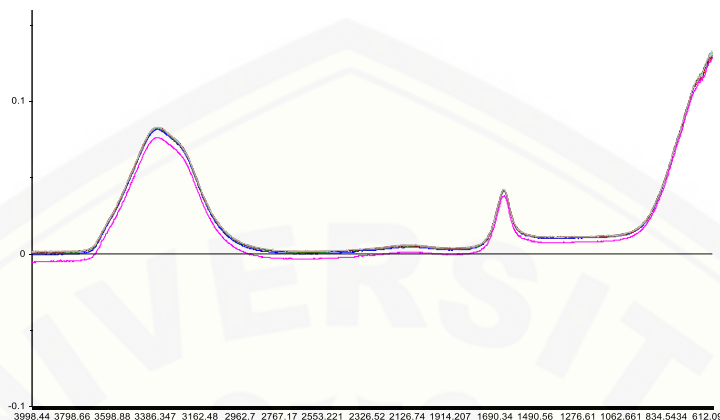
## 2. Contoh Spektrum Sampel



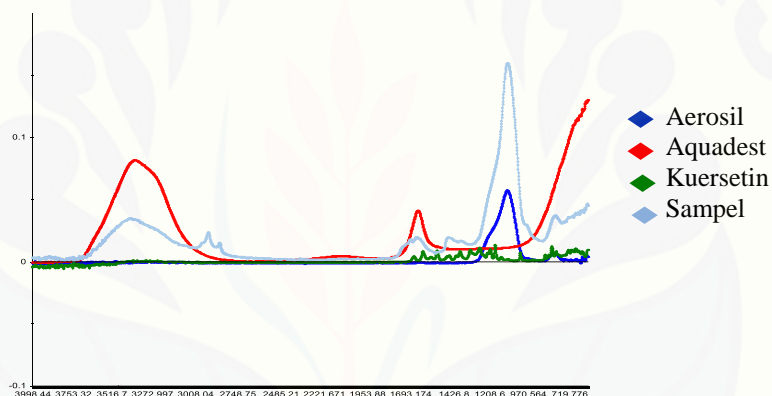
## 3. Spektrum Aerosil



#### 4. Spektrum Aquadest

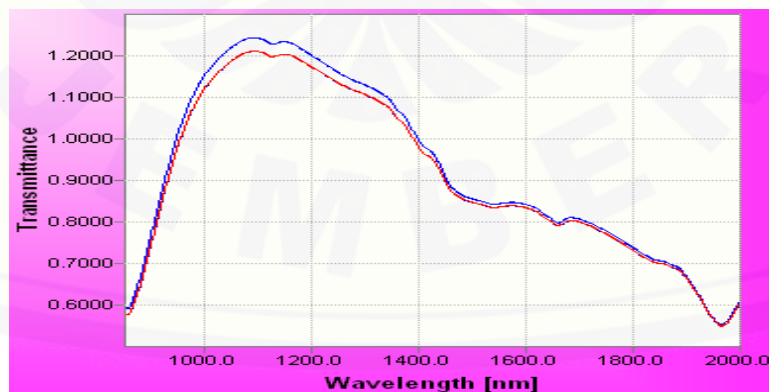


#### 5. Spektrum Gabungan

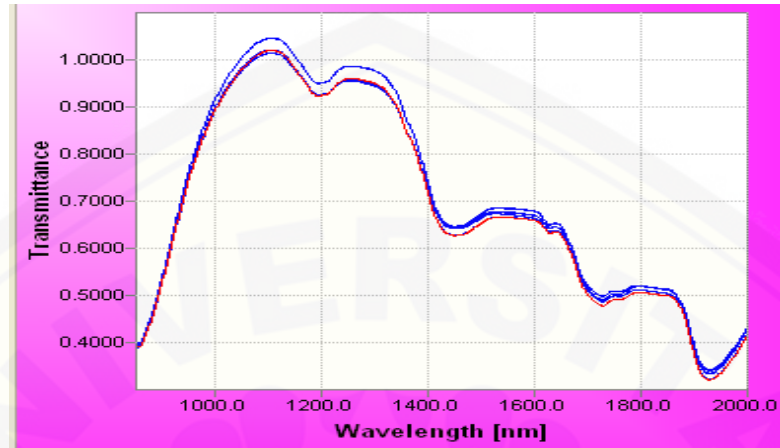


### B.2 Spektroskopi NIR

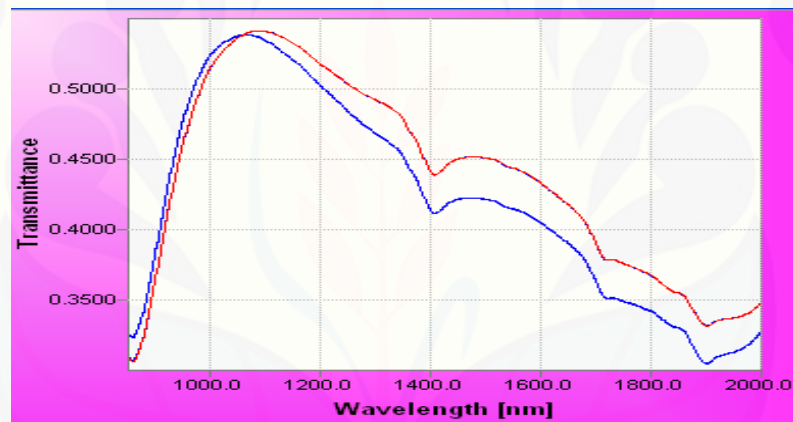
#### 1. Spektrum Standar Kuersetin



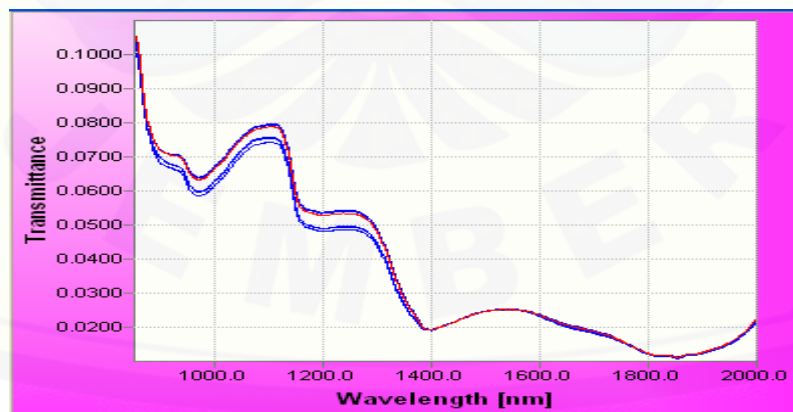
2. Contoh Spektrum Sampel



3. Spektrum Aerosil

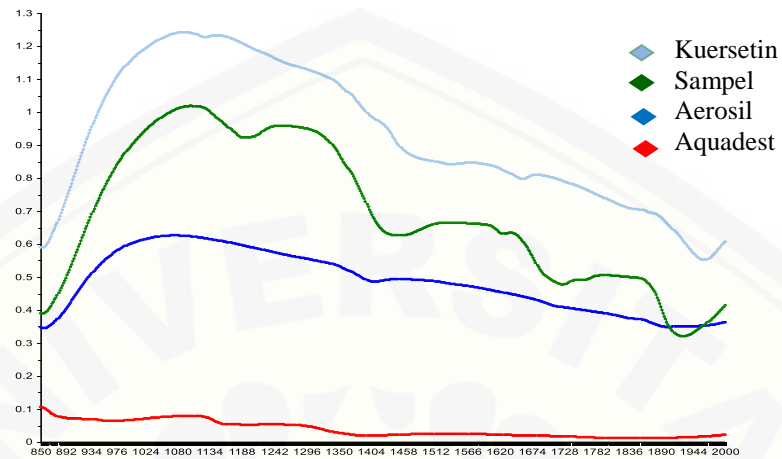


4. Spektrum Aquadest





## 5. Spektrum Gabungan



## LAMPIRAN C. Identitas Sampel Ekstrak

C.1 Sampel *Training Set*

| No  | Kode | Sampel            |
|-----|------|-------------------|
| 1.  | A    | Kopi arabika muda |
| 2.  | B    | Kopi arabika tua  |
| 3.  | C    | Jambu biji        |
| 4.  | D    | Katuk             |
| 5.  | E    | Kembang bulan     |
| 6.  | F    | Mangga            |
| 7.  | G    | Pandan            |
| 8.  | H    | Pare              |
| 9.  | I    | Patikan kebo      |
| 10. | J    | Pepaya            |
| 11. | K    | Putri malu        |
| 12. | L    | Sambiloto         |
| 13. | M    | Sirih merah       |
| 14. | N    | Sirih             |
| 15. | O    | Sirsak            |

**C.2 Sampel Test Set**

| No | Kode | Sampel            |
|----|------|-------------------|
| 1. | P    | Binahong          |
| 2. | Q    | Kunir putih       |
| 3. | R    | Lamtoro           |
| 4. | S    | Mengkudu          |
| 5. | T    | Kopi robusta muda |

**C.3 Sampel Nyata**

| Sampel     | Pabrik            | Kandungan ekstrak | Waktu Kadaluarsa | Bobot ekstrak per kapsul |
|------------|-------------------|-------------------|------------------|--------------------------|
| Stimuno    | Dexa medica       | Meniran           | Maret 2017       | 50 mg                    |
| Daun salam | Herbal indo utama | Salam             | Mei 2016         | 200 mg                   |

**LAMPIRAN D. Perhitungan % Rendemen**

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak yang didapat}}{\text{berat serbuk yang diekstraksi}} \times 100\%$$

| No | Nama Simplisia | Serbuk  | Ekstrak | % Rendemen |
|----|----------------|---------|---------|------------|
| 1  | Binahong       | 80,0435 | 2,5243  | 3,154      |
| 2  | Jambu biji     | 80,0304 | 5,2717  | 6,587      |
| 3  | Katuk          | 80,0442 | 3,4661  | 4,309      |
| 4  | Kembang bulan  | 80,0994 | 2,5000  | 3,121      |
| 5  | Kunir          | 80,4729 | 4,6482  | 5,776      |
| 6  | Lamtoro        | 80,0066 | 2,6083  | 3,260      |
| 7  | Mangga         | 80,1578 | 8,2029  | 10,23      |
| 8  | Mengkudu       | 80,0248 | 3,0480  | 3,809      |
| 9  | Pandan         | 80,0750 | 2,2540  | 2,815      |
| 10 | Patikan kebo   | 80,0570 | 2,9762  | 3,718      |
| 11 | Pepaya         | 80,0112 | 5,3008  | 6,625      |
| 12 | Sirih          | 80,0465 | 3,9268  | 4,906      |
| 13 | Sirsak         | 80,1078 | 3,6850  | 4,600      |

**LAMPIRAN E. Data Absorbansi Penetapan Kadar Flavonoid Total**

**E.1 Kuersetin 15,670 µg/ml**

U-1800 Spectrophotometer

Serial NUM: 5730116  
 ROM Version: 07  
 Sample Name:  
 Date:  
 Operator:

Wavelength Scan  
 Data Mode: ABS  
 Scan Range: 600.0-200.0nm  
 Slit Width: 4nm  
 Speed(nm/min): 400nm/min  
 Lamp Change Wavelength: 340.0nm  
 Path Length:

| ALL Data |        |        |        |        |        |        |        |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| WL(nm)   | ABS    | WL(nm) | ABS    | WL(nm) | ABS    | WL(nm) | ABS    |
| 600.0    | -0.003 | 599.5  | -0.008 | 599.0  | -0.011 | 598.5  | -0.012 |
| 598.0    | -0.012 | 597.5  | -0.012 | 597.0  | -0.012 | 596.5  | -0.013 |
| 596.0    | -0.012 | 595.5  | -0.012 | 595.0  | -0.011 | 594.5  | -0.010 |
| 594.0    | -0.009 | 593.5  | -0.008 | 593.0  | -0.007 | 592.5  | -0.005 |
| 592.0    | -0.004 | 591.5  | -0.002 | 591.0  | -0.000 | 590.5  | 0.002  |
| 590.0    | 0.004  | 589.5  | 0.007  | 589.0  | 0.010  | 588.5  | 0.011  |
| 588.0    | 0.011  | 587.5  | 0.011  | 587.0  | 0.013  | 586.5  | 0.015  |
| 586.0    | 0.018  | 585.5  | 0.020  | 585.0  | 0.022  | 584.5  | 0.025  |
| 584.0    | 0.027  | 583.5  | 0.029  | 583.0  | 0.029  | 582.5  | 0.031  |
| 582.0    | 0.033  | 581.5  | 0.031  | 581.0  | 0.029  | 580.5  | 0.029  |
| 580.0    | 0.030  | 579.5  | 0.029  | 579.0  | 0.028  | 578.5  | 0.027  |
| 578.0    | 0.028  | 577.5  | 0.029  | 577.0  | 0.029  | 576.5  | 0.029  |
| 576.0    | 0.028  | 575.5  | 0.027  | 575.0  | 0.026  | 574.5  | 0.024  |
| 574.0    | 0.022  | 573.5  | 0.020  | 573.0  | 0.018  | 572.5  | 0.016  |
| 572.0    | 0.014  | 571.5  | 0.012  | 571.0  | 0.009  | 570.5  | 0.007  |
| 570.0    | 0.005  | 569.5  | 0.004  | 569.0  | 0.003  | 568.5  | 0.003  |
| 568.0    | 0.003  | 567.5  | 0.003  | 567.0  | 0.002  | 566.5  | 0.002  |
| 566.0    | 0.002  | 565.5  | 0.002  | 565.0  | 0.003  | 564.5  | 0.003  |
| 564.0    | 0.003  | 563.5  | 0.003  | 563.0  | 0.003  | 562.5  | 0.003  |
| 562.0    | 0.003  | 561.5  | 0.003  | 561.0  | 0.003  | 560.5  | 0.003  |
| 560.0    | 0.003  | 559.5  | 0.003  | 559.0  | 0.003  | 558.5  | 0.004  |
| 558.0    | 0.004  | 557.5  | 0.004  | 557.0  | 0.004  | 556.5  | 0.004  |
| 556.0    | 0.004  | 555.5  | 0.004  | 555.0  | 0.004  | 554.5  | 0.003  |
| 554.0    | 0.003  | 553.5  | 0.003  | 553.0  | 0.003  | 552.5  | 0.003  |
| 552.0    | 0.003  | 551.5  | 0.003  | 551.0  | 0.002  | 550.5  | 0.003  |
| 550.0    | 0.003  | 549.5  | 0.003  | 549.0  | 0.002  | 548.5  | 0.002  |
| 548.0    | 0.003  | 547.5  | 0.003  | 547.0  | 0.003  | 546.5  | 0.004  |
| 546.0    | 0.004  | 545.5  | 0.004  | 545.0  | 0.004  | 544.5  | 0.004  |
| 544.0    | 0.004  | 543.5  | 0.004  | 543.0  | 0.004  | 542.5  | 0.004  |
| 542.0    | 0.004  | 541.5  | 0.004  | 541.0  | 0.005  | 540.5  | 0.005  |
| 540.0    | 0.005  | 539.5  | 0.005  | 539.0  | 0.006  | 538.5  | 0.006  |
| 538.0    | 0.006  | 537.5  | 0.006  | 537.0  | 0.006  | 536.5  | 0.006  |
| 536.0    | 0.006  | 535.5  | 0.006  | 535.0  | 0.006  | 534.5  | 0.006  |
| 534.0    | 0.006  | 533.5  | 0.006  | 533.0  | 0.007  | 532.5  | 0.007  |
| 532.0    | 0.008  | 531.5  | 0.008  | 531.0  | 0.008  | 530.5  | 0.008  |
| 530.0    | 0.008  | 529.5  | 0.008  | 529.0  | 0.008  | 528.5  | 0.008  |
| 528.0    | 0.008  | 527.5  | 0.008  | 527.0  | 0.009  | 526.5  | 0.010  |
| 526.0    | 0.010  | 525.5  | 0.011  | 525.0  | 0.011  | 524.5  | 0.011  |
| 524.0    | 0.011  | 523.5  | 0.011  | 523.0  | 0.012  | 522.5  | 0.012  |
| 522.0    | 0.012  | 521.5  | 0.013  | 521.0  | 0.013  | 520.5  | 0.014  |
| 520.0    | 0.015  | 519.5  | 0.015  | 519.0  | 0.015  | 518.5  | 0.015  |
| 518.0    | 0.015  | 517.5  | 0.016  | 517.0  | 0.017  | 516.5  | 0.017  |
| 516.0    | 0.018  | 515.5  | 0.019  | 515.0  | 0.020  | 514.5  | 0.020  |
| 514.0    | 0.021  | 513.5  | 0.021  | 513.0  | 0.022  | 512.5  | 0.022  |
| 512.0    | 0.023  | 511.5  | 0.024  | 511.0  | 0.025  | 510.5  | 0.026  |
| 510.0    | 0.027  | 509.5  | 0.028  | 509.0  | 0.029  | 508.5  | 0.030  |
| 508.0    | 0.031  | 507.5  | 0.031  | 507.0  | 0.033  | 506.5  | 0.034  |
| 506.0    | 0.036  | 505.5  | 0.037  | 505.0  | 0.038  | 504.5  | 0.040  |
| 504.0    | 0.041  | 503.5  | 0.043  | 503.0  | 0.044  | 502.5  | 0.046  |
| 502.0    | 0.047  | 501.5  | 0.049  | 501.0  | 0.051  | 500.5  | 0.053  |
| 500.0    | 0.055  | 499.5  | 0.057  | 499.0  | 0.059  | 498.5  | 0.061  |
| 498.0    | 0.063  | 497.5  | 0.066  | 497.0  | 0.068  | 496.5  | 0.071  |
| 496.0    | 0.073  | 495.5  | 0.076  | 495.0  | 0.079  | 494.5  | 0.082  |
| 494.0    | 0.086  | 493.5  | 0.089  | 493.0  | 0.093  | 492.5  | 0.096  |
| 492.0    | 0.100  | 491.5  | 0.105  | 491.0  | 0.108  | 490.5  | 0.112  |

|       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 484.0 | 0.173 | 483.5 | 0.179 | 483.0 | 0.185 | 482.5 | 0.192 |
| 482.0 | 0.199 | 481.5 | 0.205 | 481.0 | 0.212 | 480.5 | 0.219 |
| 480.0 | 0.226 | 479.5 | 0.233 | 479.0 | 0.241 | 478.5 | 0.249 |
| 478.0 | 0.257 | 477.5 | 0.266 | 477.0 | 0.274 | 476.5 | 0.283 |
| 476.0 | 0.292 | 475.5 | 0.301 | 475.0 | 0.311 | 474.5 | 0.321 |
| 474.0 | 0.332 | 473.5 | 0.343 | 473.0 | 0.355 | 472.5 | 0.366 |
| 472.0 | 0.378 | 471.5 | 0.389 | 471.0 | 0.401 | 470.5 | 0.413 |
| 470.0 | 0.424 | 469.5 | 0.436 | 469.0 | 0.448 | 468.5 | 0.457 |
| 468.0 | 0.467 | 467.5 | 0.478 | 467.0 | 0.490 | 466.5 | 0.503 |
| 466.0 | 0.515 | 465.5 | 0.529 | 465.0 | 0.542 | 464.5 | 0.556 |
| 464.0 | 0.570 | 463.5 | 0.583 | 463.0 | 0.597 | 462.5 | 0.612 |
| 462.0 | 0.625 | 461.5 | 0.638 | 461.0 | 0.652 | 460.5 | 0.665 |
| 460.0 | 0.679 | 459.5 | 0.694 | 459.0 | 0.708 | 458.5 | 0.720 |
| 458.0 | 0.733 | 457.5 | 0.746 | 457.0 | 0.760 | 456.5 | 0.773 |
| 456.0 | 0.787 | 455.5 | 0.799 | 455.0 | 0.812 | 454.5 | 0.824 |
| 454.0 | 0.838 | 453.5 | 0.851 | 453.0 | 0.864 | 452.5 | 0.876 |
| 452.0 | 0.888 | 451.5 | 0.901 | 451.0 | 0.912 | 450.5 | 0.922 |
| 450.0 | 0.932 | 449.5 | 0.942 | 449.0 | 0.952 | 448.5 | 0.959 |
| 448.0 | 0.966 | 447.5 | 0.975 | 447.0 | 0.984 | 446.5 | 0.992 |
| 446.0 | 1.000 | 445.5 | 1.009 | 445.0 | 1.016 | 444.5 | 1.024 |
| 444.0 | 1.032 | 443.5 | 1.039 | 443.0 | 1.046 | 442.5 | 1.053 |
| 442.0 | 1.059 | 441.5 | 1.065 | 441.0 | 1.070 | 440.5 | 1.075 |
| 440.0 | 1.080 | 439.5 | 1.085 | 439.0 | 1.089 | 438.5 | 1.093 |
| 438.0 | 1.096 | 437.5 | 1.100 | 437.0 | 1.103 | 436.5 | 1.106 |
| 436.0 | 1.110 | 435.5 | 1.112 | 435.0 | 1.114 | 434.5 | 1.116 |
| 434.0 | 1.118 | 433.5 | 1.119 | 433.0 | 1.120 | 432.5 | 1.120 |
| 432.0 | 1.121 | 431.5 | 1.121 | 431.0 | 1.121 | 430.5 | 1.120 |
| 430.0 | 1.119 | 429.5 | 1.118 | 429.0 | 1.116 | 428.5 | 1.115 |
| 428.0 | 1.114 | 427.5 | 1.113 | 427.0 | 1.110 | 426.5 | 1.108 |
| 426.0 | 1.105 | 425.5 | 1.102 | 425.0 | 1.099 | 424.5 | 1.095 |
| 424.0 | 1.091 | 423.5 | 1.087 | 423.0 | 1.083 | 422.5 | 1.078 |
| 422.0 | 1.073 | 421.5 | 1.069 | 421.0 | 1.064 | 420.5 | 1.058 |
| 420.0 | 1.053 | 419.5 | 1.046 | 419.0 | 1.040 | 418.5 | 1.033 |
| 418.0 | 1.027 | 417.5 | 1.020 | 417.0 | 1.013 | 416.5 | 1.005 |
| 416.0 | 0.997 | 415.5 | 0.990 | 415.0 | 0.982 | 414.5 | 0.972 |
| 414.0 | 0.963 | 413.5 | 0.953 | 413.0 | 0.943 | 412.5 | 0.933 |
| 412.0 | 0.922 | 411.5 | 0.912 | 411.0 | 0.903 | 410.5 | 0.893 |
| 410.0 | 0.883 | 409.5 | 0.874 | 409.0 | 0.865 | 408.5 | 0.857 |
| 408.0 | 0.849 | 407.5 | 0.840 | 407.0 | 0.830 | 406.5 | 0.820 |
| 406.0 | 0.810 | 405.5 | 0.801 | 405.0 | 0.791 | 404.5 | 0.780 |
| 404.0 | 0.768 | 403.5 | 0.759 | 403.0 | 0.750 | 402.5 | 0.739 |
| 402.0 | 0.729 | 401.5 | 0.719 | 401.0 | 0.710 | 400.5 | 0.700 |
| 400.0 | 0.691 | 399.5 | 0.681 | 399.0 | 0.672 | 398.5 | 0.663 |
| 398.0 | 0.654 | 397.5 | 0.645 | 397.0 | 0.635 | 396.5 | 0.626 |
| 396.0 | 0.617 | 395.5 | 0.608 | 395.0 | 0.599 | 394.5 | 0.590 |
| 394.0 | 0.580 | 393.5 | 0.570 | 393.0 | 0.561 | 392.5 | 0.552 |
| 392.0 | 0.543 | 391.5 | 0.534 | 391.0 | 0.526 | 390.5 | 0.519 |
| 390.0 | 0.511 | 389.5 | 0.503 | 389.0 | 0.496 | 388.5 | 0.491 |
| 388.0 | 0.485 | 387.5 | 0.479 | 387.0 | 0.472 | 386.5 | 0.465 |
| 386.0 | 0.459 | 385.5 | 0.453 | 385.0 | 0.446 | 384.5 | 0.440 |
| 384.0 | 0.433 | 383.5 | 0.428 | 383.0 | 0.423 | 382.5 | 0.417 |
| 382.0 | 0.411 | 381.5 | 0.406 | 381.0 | 0.400 | 380.5 | 0.395 |
| 380.0 | 0.392 | 379.5 | 0.390 | 379.0 | 0.387 | 378.5 | 0.383 |
| 378.0 | 0.378 | 377.5 | 0.374 | 377.0 | 0.370 | 376.5 | 0.365 |
| 376.0 | 0.361 | 375.5 | 0.357 | 375.0 | 0.353 | 374.5 | 0.349 |
| 374.0 | 0.346 | 373.5 | 0.342 | 373.0 | 0.339 | 372.5 | 0.336 |
| 372.0 | 0.333 | 371.5 | 0.331 | 371.0 | 0.328 | 370.5 | 0.325 |
| 370.0 | 0.323 | 369.5 | 0.321 | 369.0 | 0.319 | 368.5 | 0.317 |
| 368.0 | 0.316 | 367.5 | 0.314 | 367.0 | 0.312 | 366.5 | 0.310 |
| 366.0 | 0.308 | 365.5 | 0.306 | 365.0 | 0.304 | 364.5 | 0.303 |
| 364.0 | 0.301 | 363.5 | 0.299 | 363.0 | 0.298 | 362.5 | 0.296 |
| 362.0 | 0.294 | 361.5 | 0.292 | 361.0 | 0.291 | 360.5 | 0.289 |
| 360.0 | 0.287 | 359.5 | 0.286 | 359.0 | 0.285 | 358.5 | 0.284 |
| 358.0 | 0.282 | 357.5 | 0.280 | 357.0 | 0.278 | 356.5 | 0.277 |
| 356.0 | 0.275 | 355.5 | 0.273 | 355.0 | 0.272 | 354.5 | 0.270 |
| 354.0 | 0.269 | 353.5 | 0.268 | 353.0 | 0.266 | 352.5 | 0.264 |
| 352.0 | 0.261 | 351.5 | 0.260 | 351.0 | 0.258 | 350.5 | 0.257 |
| 350.0 | 0.255 | 349.5 | 0.254 | 349.0 | 0.252 | 348.5 | 0.251 |
| 348.0 | 0.250 | 347.5 | 0.249 | 347.0 | 0.247 | 346.5 | 0.246 |
| 346.0 | 0.245 | 345.5 | 0.243 | 345.0 | 0.241 | 344.5 | 0.240 |
| 344.0 | 0.239 | 343.5 | 0.238 | 343.0 | 0.237 | 342.5 | 0.236 |
| 342.0 | 0.235 | 341.5 | 0.233 | 341.0 | 0.232 | 340.5 | 0.231 |
| 340.0 | 0.230 | 339.5 | 0.230 | 339.0 | 0.229 | 338.5 | 0.228 |
| 338.0 | 0.227 | 337.5 | 0.225 | 337.0 | 0.224 | 336.5 | 0.224 |
| 336.0 | 0.223 | 335.5 | 0.222 | 335.0 | 0.222 | 334.5 | 0.221 |
| 334.0 | 0.219 | 333.5 | 0.218 | 333.0 | 0.217 | 332.5 | 0.217 |
| 332.0 | 0.216 | 331.5 | 0.215 | 331.0 | 0.214 | 330.5 | 0.213 |
| 330.0 | 0.213 | 329.5 | 0.211 | 329.0 | 0.211 | 328.5 | 0.210 |

|       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 322.0 | 0.199 | 321.5 | 0.199 | 321.0 | 0.198 | 320.5 | 0.198 |
| 320.0 | 0.198 | 319.5 | 0.197 | 319.0 | 0.197 | 318.5 | 0.197 |
| 318.0 | 0.196 | 317.5 | 0.196 | 317.0 | 0.196 | 316.5 | 0.197 |
| 316.0 | 0.198 | 315.5 | 0.199 | 315.0 | 0.200 | 314.5 | 0.201 |
| 314.0 | 0.202 | 313.5 | 0.204 | 313.0 | 0.206 | 312.5 | 0.208 |
| 312.0 | 0.211 | 311.5 | 0.214 | 311.0 | 0.216 | 310.5 | 0.219 |
| 310.0 | 0.222 | 309.5 | 0.226 | 309.0 | 0.228 | 308.5 | 0.231 |
| 308.0 | 0.233 | 307.5 | 0.237 | 307.0 | 0.241 | 306.5 | 0.245 |
| 306.0 | 0.248 | 305.5 | 0.252 | 305.0 | 0.256 | 304.5 | 0.260 |
| 304.0 | 0.264 | 303.5 | 0.268 | 303.0 | 0.272 | 302.5 | 0.276 |
| 302.0 | 0.280 | 301.5 | 0.283 | 301.0 | 0.287 | 300.5 | 0.290 |
| 300.0 | 0.294 | 299.5 | 0.298 | 299.0 | 0.302 | 298.5 | 0.305 |
| 298.0 | 0.309 | 297.5 | 0.314 | 297.0 | 0.318 | 296.5 | 0.322 |
| 296.0 | 0.326 | 295.5 | 0.330 | 295.0 | 0.336 | 294.5 | 0.341 |
| 294.0 | 0.347 | 293.5 | 0.353 | 293.0 | 0.360 | 292.5 | 0.368 |
| 292.0 | 0.376 | 291.5 | 0.384 | 291.0 | 0.392 | 290.5 | 0.401 |
| 290.0 | 0.411 | 289.5 | 0.422 | 289.0 | 0.433 | 288.5 | 0.443 |
| 288.0 | 0.453 | 287.5 | 0.466 | 287.0 | 0.482 | 286.5 | 0.498 |
| 286.0 | 0.514 | 285.5 | 0.531 | 285.0 | 0.549 | 284.5 | 0.569 |
| 284.0 | 0.590 | 283.5 | 0.608 | 283.0 | 0.627 | 282.5 | 0.651 |
| 282.0 | 0.674 | 281.5 | 0.697 | 281.0 | 0.718 | 280.5 | 0.740 |
| 280.0 | 0.762 | 279.5 | 0.787 | 279.0 | 0.813 | 278.5 | 0.837 |
| 278.0 | 0.861 | 277.5 | 0.885 | 277.0 | 0.911 | 276.5 | 0.935 |
| 276.0 | 0.959 | 275.5 | 0.984 | 275.0 | 1.007 | 274.5 | 1.029 |
| 274.0 | 1.050 | 273.5 | 1.070 | 273.0 | 1.087 | 272.5 | 1.103 |
| 272.0 | 1.120 | 271.5 | 1.133 | 271.0 | 1.139 | 270.5 | 1.145 |
| 270.0 | 1.149 | 269.5 | 1.153 | 269.0 | 1.154 | 268.5 | 1.154 |
| 268.0 | 1.151 | 267.5 | 1.146 | 267.0 | 1.138 | 266.5 | 1.128 |
| 266.0 | 1.118 | 265.5 | 1.106 | 265.0 | 1.093 | 264.5 | 1.077 |
| 264.0 | 1.063 | 263.5 | 1.049 | 263.0 | 1.035 | 262.5 | 1.017 |
| 262.0 | 1.000 | 261.5 | 0.984 | 261.0 | 0.969 | 260.5 | 0.954 |
| 260.0 | 0.939 | 259.5 | 0.924 | 259.0 | 0.909 | 258.5 | 0.895 |
| 258.0 | 0.880 | 257.5 | 0.866 | 257.0 | 0.851 | 256.5 | 0.836 |
| 256.0 | 0.821 | 255.5 | 0.806 | 255.0 | 0.791 | 254.5 | 0.777 |
| 254.0 | 0.763 | 253.5 | 0.750 | 253.0 | 0.737 | 252.5 | 0.724 |
| 252.0 | 0.712 | 251.5 | 0.700 | 251.0 | 0.689 | 250.5 | 0.678 |
| 250.0 | 0.669 | 249.5 | 0.660 | 249.0 | 0.652 | 248.5 | 0.645 |
| 248.0 | 0.638 | 247.5 | 0.632 | 247.0 | 0.626 | 246.5 | 0.620 |
| 246.0 | 0.616 | 245.5 | 0.612 | 245.0 | 0.610 | 244.5 | 0.608 |
| 244.0 | 0.606 | 243.5 | 0.606 | 243.0 | 0.607 | 242.5 | 0.611 |
| 242.0 | 0.614 | 241.5 | 0.619 | 241.0 | 0.626 | 240.5 | 0.633 |
| 240.0 | 0.641 | 239.5 | 0.652 | 239.0 | 0.664 | 238.5 | 0.677 |
| 238.0 | 0.692 | 237.5 | 0.708 | 237.0 | 0.725 | 236.5 | 0.744 |
| 236.0 | 0.763 | 235.5 | 0.784 | 235.0 | 0.806 | 234.5 | 0.828 |
| 234.0 | 0.852 | 233.5 | 0.878 | 233.0 | 0.904 | 232.5 | 0.928 |
| 232.0 | 0.953 | 231.5 | 0.979 | 231.0 | 1.004 | 230.5 | 1.028 |
| 230.0 | 1.052 | 229.5 | 1.075 | 229.0 | 1.099 | 228.5 | 1.121 |
| 228.0 | 1.143 | 227.5 | 1.169 | 227.0 | 1.197 | 226.5 | 1.225 |
| 226.0 | 1.253 | 225.5 | 1.282 | 225.0 | 1.315 | 224.5 | 1.354 |
| 224.0 | 1.391 | 223.5 | 1.423 | 223.0 | 1.456 | 222.5 | 1.495 |
| 222.0 | 1.536 | 221.5 | 1.580 | 221.0 | 1.625 | 220.5 | 1.672 |
| 220.0 | 1.721 | 219.5 | 1.778 | 219.0 | 1.842 | 218.5 | 1.910 |
| 218.0 | 1.991 | 217.5 | 2.076 | 217.0 | 2.174 | 216.5 | 2.301 |
| 216.0 | 2.482 | 215.5 | 2.678 | 215.0 | 3.000 | 214.5 | 3.000 |
| 214.0 | 3.000 | 213.5 | 3.000 | 213.0 | 3.000 | 212.5 | 3.000 |
| 212.0 | 3.000 | 211.5 | 3.000 | 211.0 | 3.000 | 210.5 | 3.000 |
| 210.0 | 3.000 | 209.5 | 3.000 | 209.0 | 3.000 | 208.5 | 3.000 |
| 208.0 | 3.000 | 207.5 | 3.000 | 207.0 | 3.000 | 206.5 | 3.000 |
| 206.0 | 3.000 | 205.5 | 3.000 | 205.0 | 3.000 | 204.5 | 3.000 |
| 204.0 | 3.000 | 203.5 | 3.000 | 203.0 | 3.000 | 202.5 | 3.000 |
| 202.0 | 3.000 | 201.5 | 3.000 | 201.0 | 3.000 | 200.5 | 3.000 |
| 200.0 | 3.000 |       |       |       |       |       |       |

## E.2 Standar Kuersetin

| Concentration           |         |       |
|-------------------------|---------|-------|
| Data Mode:              | · ABS   |       |
| WL1:                    | 432.0nm |       |
| Type:                   | · 1st   |       |
| K1:                     | 10.57   |       |
| K0:                     | -0.995  |       |
| R:                      | 0.975   |       |
| R2:                     | 0.951   |       |
| Lamp Change Wavelength: | 340.0nm |       |
| Path Length:            |         |       |
| STD                     | ABS     | CONC  |
| 1                       | 0.260   | 2.089 |
| 2                       | 0.401   | 4.178 |
| 3                       | 0.882   | 6.268 |
| 4                       | 0.934   | 8.357 |
| 5                       | 1.082   | 10.44 |
| 6                       | 1.221   | 12.53 |
| 7                       | 1.501   | 15.67 |

## LAMPIRAN F. Pembuatan Larutan pada Penetapan Kadar Flavonoid Total

## F.1 Larutan Kuersetin

- Larutan induk

$$\frac{10,447 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 1044,7 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Pengenceran

$$1) \frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1044,7 \text{ } \mu\text{g/ml} = 104,47 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\checkmark \frac{0,2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 104,47 \text{ } \mu\text{g/ml} = 2,089 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\checkmark \frac{0,4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 104,47 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4,178 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$2) \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1044,7 \text{ } \mu\text{g/ml} = 208,94 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\checkmark \frac{0,4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 208,94 \text{ } \mu\text{g/ml} = 8,357 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\checkmark \frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 208,94 \text{ } \mu\text{g/ml} = 10,44 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$3) \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1044,7 \text{ } \mu\text{g/ml} = 313,41 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\checkmark \frac{0,2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 313,41 \text{ } \mu\text{g/ml} = 6,268 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\checkmark \frac{0,4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 313,41 \text{ } \mu\text{g/ml} = 12,53 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\checkmark \frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 313,41 \text{ } \mu\text{g/ml} = 15,67 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

## F.2 Larutan Ekstrak

| Sampel   | Replikasi | Pembuatan Larutan Ekstrak  |
|----------|-----------|--|
| <b>A</b> | 1         | $\frac{40,2 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4020 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|          | 2         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
| <b>B</b> | 1         | $\frac{40,2 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4020 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|          | 2         | $\frac{40,1 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4010 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
| <b>C</b> | 1         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
|          | 2         | $\frac{40,1 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4010 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
| <b>D</b> | 1         | $\frac{40,2 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4020 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|          | 2         | $\frac{40,3 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4030 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
| <b>E</b> | 1         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
|          | 2         | $\frac{40,2 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4010 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
| <b>F</b> | 1         | $\frac{40,1 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4010 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|          | 2         | $\frac{40,2 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4020 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
| <b>G</b> | 1         | $\frac{40,1 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4010 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|          | 2         | $\frac{40,1 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4010 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
| <b>H</b> | 1         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
|          | 2         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
| <b>I</b> | 1         | $\frac{40,1 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4010 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|          | 2         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
| <b>J</b> | 1         | $\frac{40,2 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4020 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|          | 2         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
| <b>K</b> | 1         | $\frac{40,1 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4010 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|          | 2         | $\frac{40,3 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4030 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
| <b>L</b> | 1         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
|          | 2         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
| <b>M</b> | 1         | $\frac{40,1 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4010 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|          | 2         | $\frac{40,3 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4030 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |

| Sampel | Replikasi | Pembuatan Larutan Ekstrak  |
|--------|-----------|--|
| N      | 1         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
|        | 2         | $\frac{40,3 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4030 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
| O      | 1         | $\frac{40,3 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4030 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|        | 2         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
| P      | 1         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
|        | 2         | $\frac{40,2 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4020 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
| Q      | 1         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |
|        | 2         | $\frac{40,1 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4010 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
| R      | 1         | $\frac{40,3 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4030 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|        | 2         | $\frac{40,1 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4010 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
| S      | 1         | $\frac{40,1 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4010 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|        | 2         | $\frac{40,2 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4020 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
| T      | 1         | $\frac{40,2 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4020 \text{ } \mu\text{g/ml}$ |
|        | 2         | $\frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4000 \text{ } \mu\text{g/ml}$   |

#### LAMPIRAN G. Pembuatan Larutan $\text{AlCl}_3$ 10%

$$\frac{1 \text{ g}}{10 \text{ ml}} = 10\%$$

Ditimbang 1 g  $\text{AlCl}_3$  dilarutkan dalam aquadest ad 10 ml

#### LAMPIRAN H. Pembuatan Larutan Kalium Asetat 1M

$$\text{Molar} = \frac{\text{Massa}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{\text{Volume (ml)}} ;$$

- Mr kalium asetat = 98

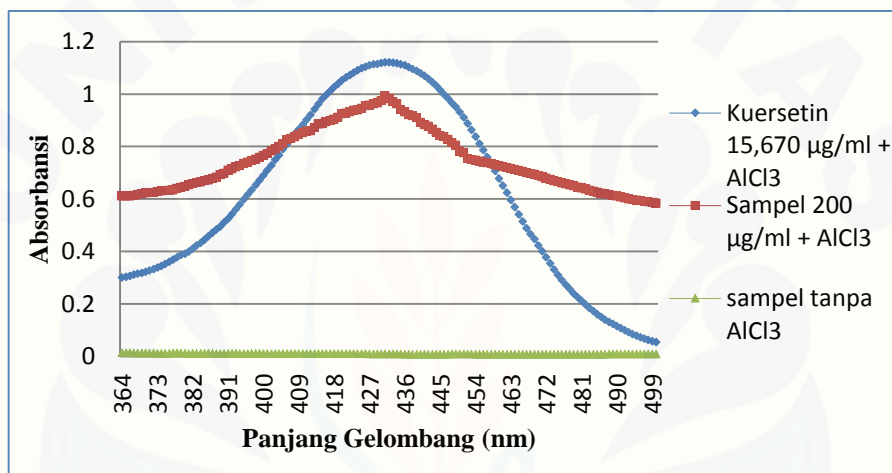
$$1 \text{ M} = \frac{\text{massa}}{98} \times \frac{1000}{10 \text{ ml}}$$

$$\text{Massa} = 0,98$$



**LAMPIRAN I. Hasil Spektra Optimasi Panjang Gelombang Maksimum Flavonoid**

Data Mode : ABS  
 Scan Range : 600,0 - 200,0 nm  
 Slide Width : 4 nm  
 Speed (nm/min) : 400 nm/min  
 Lamp Change Wavelength : 340,0 nm



**LAMPIRAN J. PENGUJIAN AKURASI**

| Adisi     | Penimbangan sampel (mg) | Penambahan standar adisi (mg) | Massa teoritis (mg) | Massa hasil percobaan (mg) | Recovery (%) | Rata-rata (%) | RSD (%) |
|-----------|-------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------------|--------------|---------------|---------|
| 30%       | 40,2                    | 0,618                         | 53,7544             | 52,3976                    | 97,4759      | 97,6318       | 0,37    |
|           | 40,2                    | 0,618                         | 53,7544             | 52,3447                    | 97,3775      |               |         |
|           | 40,0                    | 0,618                         | 53,5484             | 52,5000                    | 98,0421      |               |         |
| 60%       | 40,1                    | 0,620                         | 66,0914             | 65,2623                    | 98,7455      | 98,2419       | 0,46    |
|           | 40,2                    | 0,620                         | 66,1944             | 64,9413                    | 98,1069      |               |         |
|           | 40,4                    | 0,620                         | 66,4004             | 64,9884                    | 97,8735      |               |         |
| Rata-rata |                         |                               |                     |                            |              | 97,8937       | 0,42    |

Perhitungan sampel uji akurasi dengan metode standar adisi dilakukan dengan cara sebagai berikut.

Ekstrak yang digunakan untuk uji akurasi adalah ekstrak dengan kadar kuersetin paling tinggi, yaitu ekstrak C dengan rata-rata kadar kuersetin 51,4856 mg QE/g (5,14856%).

1. Adisi 30%

- Pembuatan sampel adisi

Bila ditimbang sampel 40 mg, maka jumlah standar kuersetin yang ditambahkan dalam sampel sebesar:

$$\frac{40 \text{ mg} \times 5,14856 \times 0,3}{100 \text{ mg}} = 0,618 \text{ mg standar kuersetin}$$

- Pembuatan sampel adisi

Menimbang standar dengan kuersetin = 6,18 mg, dimasukkan labu ukur 10 ml dan ditambahkan etanol sampai tanda batas.

$$\frac{6,18 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 618 \text{ ppm}$$

Cara kerja :

- a. Sebanyak 40 mg ekstrak ditimbang dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan etanol (tidak sampai tanda batas).
- b. Memipet 1 ml larutan standar 618 ppm, memasukkan ke labu ukur 10 ml yang berisi larutan ekstrak, sehingga telah dilakukan adisi sebanyak 6,18 mg ke dalam 40 mg ekstrak.

$$1 \text{ ml dari } 618 \text{ ppm} = \frac{618 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times 1 \text{ ml} = 0,618 \text{ mg}$$

- c. Menambahkan etanol sampai tanda batas.
- d. Sebanyak 0,5 ml larutan adisi dilarutkan 3 mL etanol, ditambahkan 0,2 mL AlCl<sub>3</sub> 10%, ditambahkan 0,2 mL kalium asetat 1M, dan ditambahkan aquadest sampai tanda.

- Perhitungan % *recovery*

Misal : pada replikasi 1 dengan penimbangan sampel 40,2 mg

Konsentrasi teoritis :

$$\frac{5,14856 \text{ mg}}{100 \text{ mg}} \times 40,2 \text{ mg} = 2,06972 + 0,618$$

$$= 2,68772 \text{ mg (jumlah kuersetin dalam sampel adisi 30%)}$$

$$\frac{2,68772 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 268,772 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$268,772 \text{ } \mu\text{g/ml} \times 10 \text{ ml} = 2687,72 \text{ } \mu\text{g}$$

$$2687,72 \text{ } \mu\text{g} \times 10/0,5 \text{ ml} = 53,7544 \text{ mg}$$

Hasil percobaan = 52,3976 mg

$$\% \text{ recovery} = \frac{52,3976 \text{ mg}}{53,7544 \text{ mg}} \times 100\% = 97,4759$$

## 2. Adisi 60%

- Pembuatan sampel adisi

Bila ditimbang sampel 40 mg, maka jumlah standar kuersetin yang ditambahkan dalam sampel sebesar:

$$\frac{40 \text{ mg} \times 5,14856 \times 0,6}{100 \text{ mg}} = 1,24 \text{ mg standar kuersetin}$$

- Pembuatan sampel adisi

Menimbang standar dengan kuersetin = 6,20 mg, dimasukkan labu ukur 10 ml dan ditambahkan etanol sampai tanda batas.

$$\frac{6,20 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 620 \text{ ppm}$$

Cara kerja :

- Sebanyak 40 mg ekstrak ditimbang dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan etanol (tidak sampai tanda batas).
- Memipet 2 ml larutan standar 620 ppm, memasukkan ke labu ukur 10 ml yang berisi larutan ekstrak, sehingga telah dilakukan adisi sebanyak 1,24 mg ke dalam 40 mg ekstrak.

$$2 \text{ ml dari } 620 \text{ ppm} = \frac{620 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml} = 1,24 \text{ mg}$$

- c. Menambahkan etanol sampai tanda batas.
- d. Sebanyak 0,5 ml larutan adisi dilarutkan 3 mL etanol, ditambahkan 0,2 mL AlCl<sub>3</sub> 10%, ditambahkan 0,2 mL kalium asetat 1M, dan ditambahkan aquadest sampai tanda.

- Perhitungan % *recovery*

Misal : pada replikasi 1 dengan penimbangan sampel 40,1 mg

Konsentrasi teoritis :

$$\frac{5,14856 \text{ mg}}{100 \text{ mg}} \times 40,1 \text{ mg} = 2,06457 + 1,24$$

$$= 3,30457 \text{ mg (jumlah kuersetin dalam sampel adisi 60%)}$$

$$\frac{3,30457 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 330,457 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$330,457 \text{ } \mu\text{g/ml} \times 10 \text{ ml} = 3304,57 \text{ } \mu\text{g}$$

$$3304,57 \text{ } \mu\text{g} \times 10/0,5 \text{ ml} = 66,0914 \text{ mg}$$

$$\text{Hasil percobaan} = 65,2623 \text{ mg}$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{65,2623 \text{ mg}}{66,0914 \text{ mg}} \times 100\% = 98,7455$$

### **LAMPIRAN K. Hasil Pengukuran Kadar Flavonoid Total Sampel *Training Set*, *Test Set*, dan Sampel Nyata dengan Spektrofotometer UV-vis**

#### **K.1 Contoh Perhitungan**

$$\text{Persamaan : } Y = 0,094x + 0,068 \text{ (R} = 0,993 \text{ ; R}^2 = 0,987\text{)}$$

#### **Replikasi 1**

$$0,804 = 0,094x + 0,068$$

$$x = 7,830 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Dalam 10 ml (1)

$$7,830 \text{ } \mu\text{g/ml} \times 10 \text{ ml} = 78,30 \text{ } \mu\text{g}$$

- Dalam 10 ml (2)

$$78,30 \mu\text{g} \times \frac{10 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} = 1566 \mu\text{g} = 1,566 \text{ mg}$$

$$\frac{1,566 \text{ mg}}{0,04 \text{ g}} = 39,1500 \text{ mg QE/g ekstrak}$$

Replikasi 2

$$0,807 = 0,094x + 0,068$$

$$x = 7,862 \mu\text{g/ml}$$

- Dalam 10 ml (1)

$$7,862 \mu\text{g/ml} \times 10 \text{ ml} = 78,62 \mu\text{g}$$

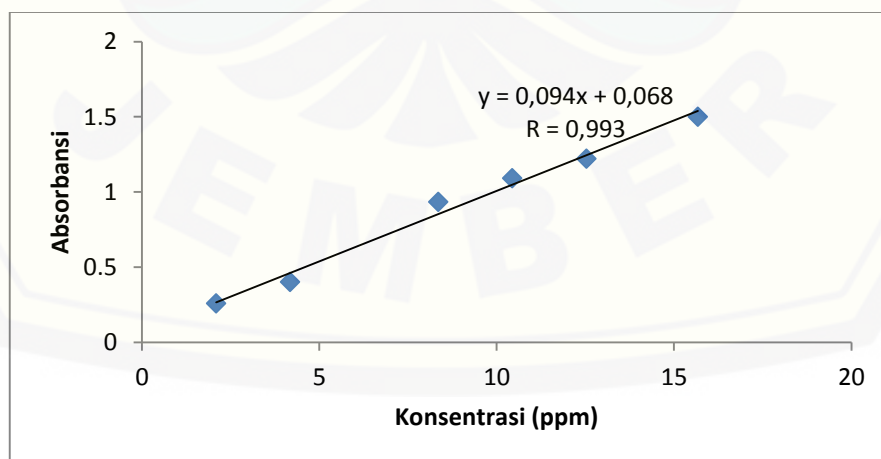
- Dalam 10 ml (2)

$$78,62 \mu\text{g} \times \frac{10 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} = 1572,4 \mu\text{g} = 1,5724 \text{ mg}$$

$$\frac{1,5724 \text{ mg}}{0,04 \text{ g}} = 39,3100 \text{ mg QE/g ekstrak}$$

Standar : Kuersetin

| Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Absorbansi |
|----------------------------------|------------|
| <b>2,089</b>                     | 0,260      |
| <b>4,178</b>                     | 0,401      |
| <b>8,357</b>                     | 0,934      |
| <b>10,44</b>                     | 1,092      |
| <b>12,536</b>                    | 1,221      |
| <b>15,67</b>                     | 1,501      |



K.2 Hasil Perhitungan mg QE/g Ekstrak Seluruh *Training Set*

| <b>Sampel<br/>Training Set</b> | <b>Massa<br/>Penimbangan (mg)</b> | <b>Absorbansi</b> | <b>mg QE/g<br/>ekstrak</b> | <b>Rata-rata mg<br/>QE/g ekstrak</b> |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| A                              | 40,2                              | 0,256             | 9,9525                     | 9,8728                               |
|                                | 40,0                              | 0,253             | 9,7930                     |                                      |
| B                              | 40,2                              | 0,275             | 10,954                     | 11,2329                              |
|                                | 40,1                              | 0,285             | 11,512                     |                                      |
| C                              | 40,0                              | 1,007             | 49,956                     | 51,4856                              |
|                                | 40,1                              | 1,067             | 53,015                     |                                      |
| D                              | 40,2                              | 0,664             | 31,541                     | 31,5279                              |
|                                | 40,3                              | 0,665             | 31,515                     |                                      |
| E                              | 40,0                              | 0,521             | 24,096                     | 24,1696                              |
|                                | 40,2                              | 0,526             | 24,242                     |                                      |
| F                              | 40,1                              | 0,739             | 35,603                     | 35,6115                              |
|                                | 40,2                              | 0,741             | 35,619                     |                                      |
| G                              | 40,1                              | 0,245             | 9,3913                     | 9,7357                               |
|                                | 40,1                              | 0,258             | 10,080                     |                                      |
| H                              | 40,0                              | 0,672             | 32,128                     | 32,7400                              |
|                                | 40,0                              | 0,695             | 33,352                     |                                      |
| I                              | 40,1                              | 0,593             | 27,859                     | 27,8700                              |
|                                | 40,0                              | 0,592             | 27,880                     |                                      |
| J                              | 40,2                              | 0,682             | 32,500                     | 32,5536                              |
|                                | 40,0                              | 0,681             | 32,606                     |                                      |
| K                              | 40,1                              | 0,350             | 14,966                     | 15,0597                              |
|                                | 40,3                              | 0,355             | 15,152                     |                                      |
| L                              | 40,0                              | 0,804             | 39,145                     | 39,2250                              |
|                                | 40,0                              | 0,807             | 39,305                     |                                      |
| M                              | 40,1                              | 0,568             | 26,526                     | 26,4079                              |
|                                | 40,3                              | 0,566             | 26,290                     |                                      |
| N                              | 40,0                              | 0,754             | 36,489                     | 36,4585                              |
|                                | 40,3                              | 0,758             | 36,428                     |                                      |
| O                              | 40,3                              | 0,827             | 40,071                     | 40,2475                              |
|                                | 40,0                              | 0,828             | 40,425                     |                                      |

K.3 Hasil Perhitungan mg QE/g Ekstrak Seluruh *Test Set*

| Sampel <i>Test Set</i> | Massa Penimbangan (mg) | Absorbansi | mg QE/g ekstrak | Rata-rata mg QE/g ekstrak |
|------------------------|------------------------|------------|-----------------|---------------------------|
| P                      | 40,1                   | 0,338      | 14,326          | 14,3892                   |
|                        | 40,2                   | 0,341      | 14,452          |                           |
| Q                      | 40,0                   | 0,440      | 19,788          | 20,2946                   |
|                        | 40,1                   | 0,460      | 20,800          |                           |
| R                      | 40,3                   | 0,937      | 45,875          | 46,0695                   |
|                        | 40,1                   | 0,940      | 46,264          |                           |
| S                      | 40,1                   | 0,552      | 25,680          | 26,2316                   |
|                        | 40,2                   | 0,574      | 26,780          |                           |
| T                      | 40,2                   | 0,145      | 4,0756          | 4,0275                    |
|                        | 40,1                   | 0,143      | 3,9794          |                           |

## K.4 Hasil Perhitungan mg QE/g Ekstrak Sampel Nyata

K.4.1 Persentase hasil percobaan (mg QE/g ekstrak) dengan metode spektroskopi NIR

|                  | Predicted | Deviation |
|------------------|-----------|-----------|
| daun salam ( 1 ) | 16.9451   | 6.4596    |
| daun salam ( 2 ) | 16.9413   | 6.4800    |
| daun salam ( 3 ) | 17.0655   | 6.4946    |
| daun salam ( 4 ) | 17.2513   | 7.1537    |
| daun salam ( 5 ) | 17.0631   | 7.1099    |
| daun salam ( 6 ) | 17.1848   | 7.1137    |
| stimuno ( 1 )    | 38.1876   | 13.8021   |
| stimuno ( 2 )    | 37.7455   | 13.7794   |
| stimuno ( 3 )    | 38.0725   | 13.7634   |
| stimuno ( 4 )    | 33.0979   | 12.7654   |
| stimuno ( 5 )    | 32.8471   | 12.7341   |
| stimuno ( 6 )    | 32.9246   | 12.6987   |

Masing-masing nilai mg QE/g ekstrak yang tercantum sebagai '*predicted*' pada Tabel diatas dihitung rata-ratanya dari sampel nyata sehingga diperoleh nilai rata-rata mg QE/g ekstrak sampel nyata yang ditentukan dengan metode spektroskopi NIR.

K.4.2 Perbandingan hasil penetapan kadar dengan metode spektroskopi NIR dan spektrofotometri UV-Vis dalam mg QE/g ekstrak

| Sampel Nyata | Hasil Pengukuran mg QE/g ekstrak dengan NIR ± SD | Hasil Pengukuran mg QE/g ekstrak dengan Spektrofotometri UV-Vis ± SD |
|--------------|--|--|
| Stimuno      | 36,3053 ± 2,78                                   | 35,9433 ± 0,14   |
| Daun salam   | 17,1862 ± 0,06                                   | 15,1241 ± 0,02   |

**LAMPIRAN L. Hasil Analisis Statistik Uji T dengan Program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS)**

**Paired Samples Statistics**

|            | Mean       | N | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|------------|------------|---|----------------|-----------------|
| Pair 1 NIR | 2.674573E1 | 6 | 10.6188769     | 4.3351384       |
| SPEKTRO    | 2.553372E1 | 6 | 11.4034599     | 4.6554430       |

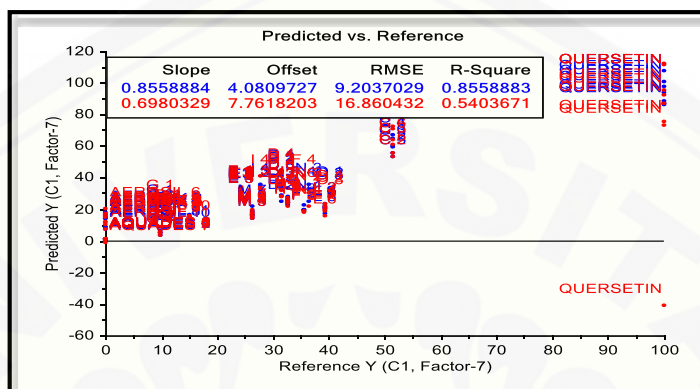
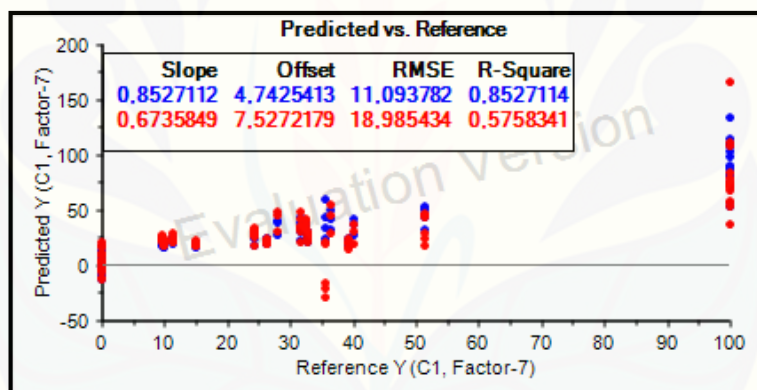
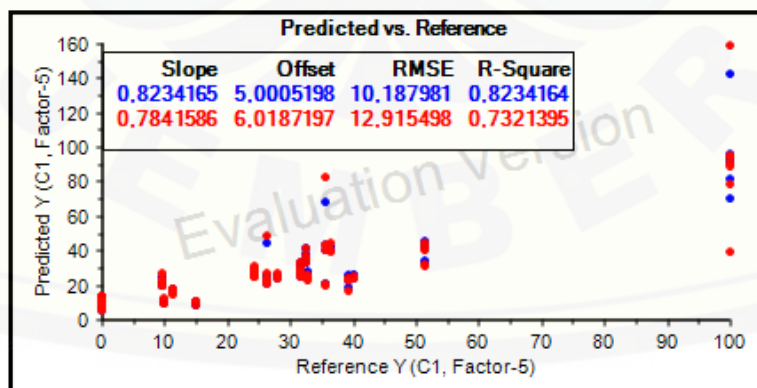
**Paired Samples Correlations**

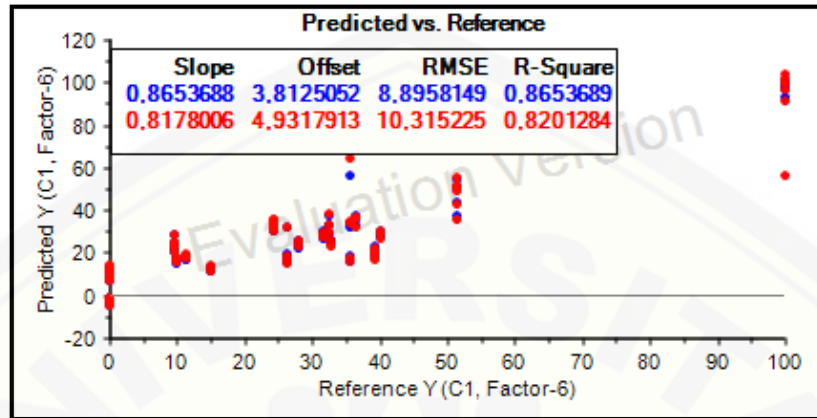
|                      | N | Correlation | Sig. |
|----------------------|---|-------------|------|
| Pair 1 NIR & SPEKTRO | 6 | .986        | .000 |

**Paired Samples Test**

|                      | Paired Differences |                |                 |   |           | t     | df | Sig. (2-tailed) |
|----------------------|--------------------|----------------|-----------------|---|-----------|-------|----|-----------------|
|                      | Mean               | Std. Deviation | Std. Error Mean | 95% Confidence Interval of the Difference |           |       |    |                 |
|                      |                    |                |                 | Lower                                     | Upper     |       |    |                 |
| Pair 1 NIR - SPEKTRO | 1.2120167E0        | 2.0244053      | .8264600        | -.9124664                                 | 3.3364997 | 1.467 | 5  | .202            |



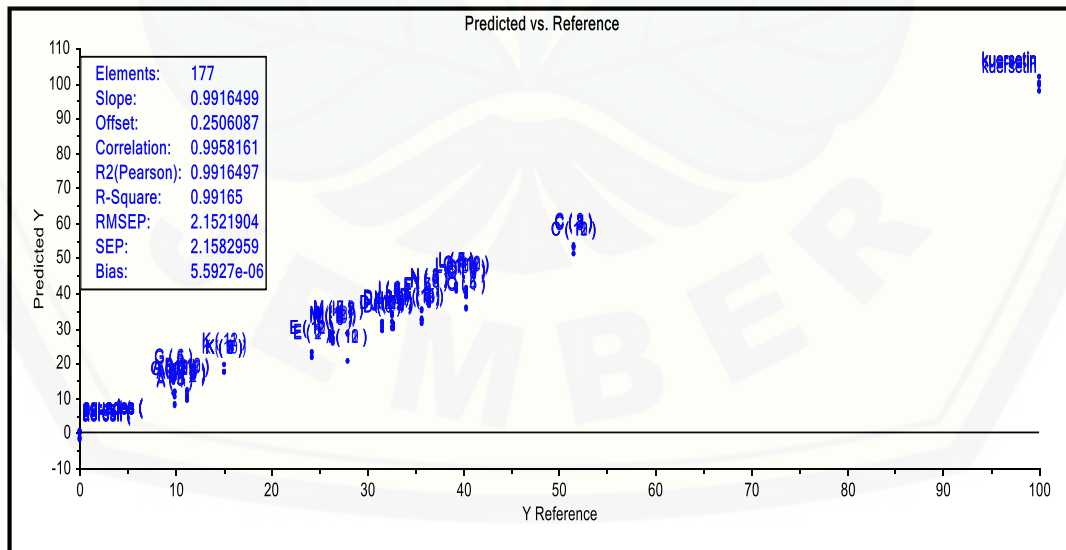
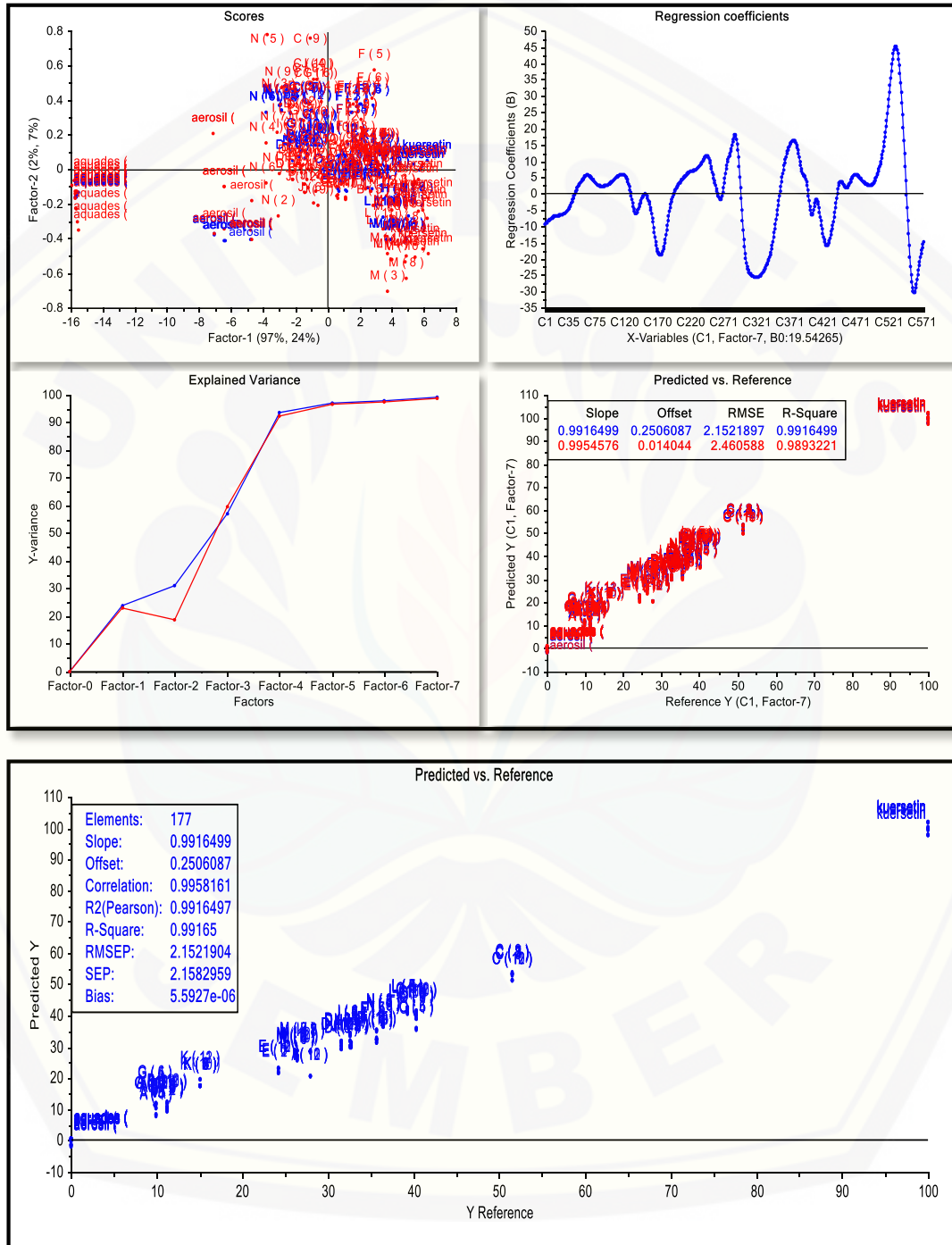
**LAMPIRAN M. Hasil Analisis Kuantitatif dengan Metode Kemometrik PLS****M.1 Dengan Spektroskopi FTIR****M.1.1 Kalibrasi PLS spektrum bilangan gelombang utuh****M.1.2 Kalibrasi PLS spektrum bilangan gelombang 3500-3000  $\text{cm}^{-1}$** **M.1.3 Kalibrasi PLS spektrum bilangan gelombang 1300-1000  $\text{cm}^{-1}$** 

M.1.4 Kalibrasi PLS spektrum bilangan gelombang 1650-1400  $\text{cm}^{-1}$ 



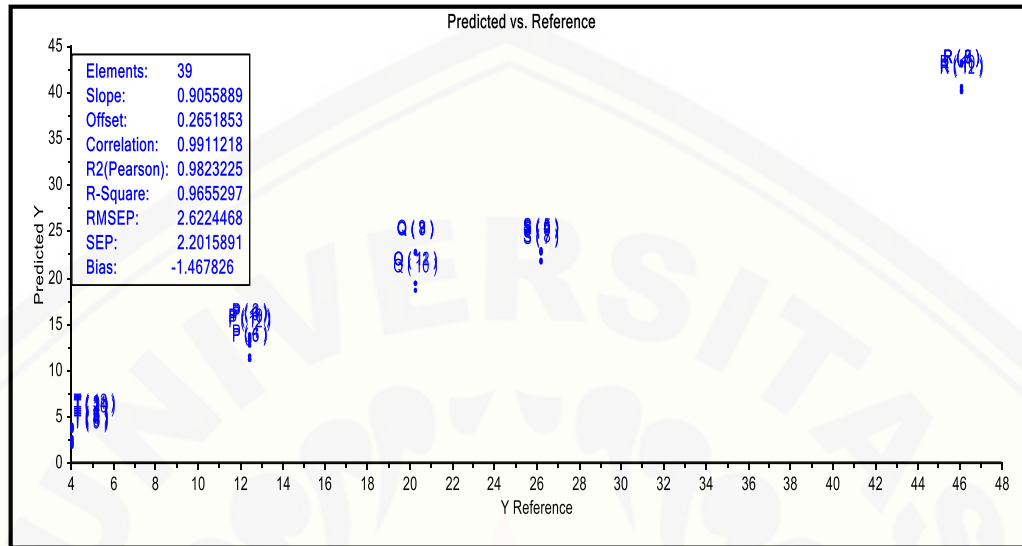
## M.2 Dengan Spektroskopi NIR

### M.2.1 Model Kalibrasi yang terbentuk dari Sampel *Training Set*





M.2.3 Hasil Validasi Model Kalibrasi dengan *Test Set*



M.2.4 Data *Test Set* yang Digunakan dalam Validasi Model Kalibrasi

|          | Predicted | Deviation | Referenc |          | Predicted | Deviation | Reference |
|----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| P ( 1 )  | 13.5285   | 1.4742    | 12.4389  | S ( 4 )  | 22,7570   | 1,8626    | 26,2316   |
| P ( 2 )  | 13.7376   | 1.4945    | 12.4389  | S ( 5 )  | 22,9763   | 1,8941    | 26,2316   |
| P ( 3 )  | 13.4728   | 1.4809    | 12.4389  | S ( 6 )  | 22,8329   | 1,8717    | 26,2316   |
| P ( 4 )  | 11.4064   | 1.8391    | 12.4389  | S ( 7 )  | 21,7315   | 2,0528    | 26,2316   |
| P ( 5 )  | 11.1104   | 1.8204    | 12.4389  | S ( 8 )  | 21,9214   | 2,0820    | 26,2316   |
| P ( 6 )  | 11.0450   | 1.8363    | 12.4389  | S ( 9 )  | 22,5163   | 2,1191    | 26,2316   |
| P ( 10 ) | 13.1326   | 2.1124    | 12.4389  | T ( 1 )  | 3,7162    | 1,7826    | 4,0299    |
| P ( 11 ) | 12.9616   | 2.1780    | 12.4389  | T ( 2 )  | 3,7264    | 1,7821    | 4,0299    |
| P ( 12 ) | 12.6287   | 2.1887    | 12.4389  | T ( 3 )  | 3,9109    | 1,7636    | 4,0299    |
| Q ( 7 )  | 22.5867   | 2.4276    | 20.2946  | T ( 4 )  | 2,1737    | 2,1760    | 4,0299    |
| Q ( 8 )  | 22.5984   | 2.4536    | 20.2946  | T ( 5 )  | 2,4080    | 2,1359    | 4,0299    |
| Q ( 9 )  | 22.7425   | 2.4751    | 20.2946  | T ( 6 )  | 2,6091    | 2,1220    | 4,0299    |
| Q ( 10 ) | 18.6628   | 1.5362    | 20.2946  | T ( 7 )  | 2,3919    | 2,1000    | 4,0299    |
| Q ( 11 ) | 19.2603   | 1.5876    | 20.2946  | T ( 8 )  | 1,8736    | 2,1118    | 4,0299    |
| Q ( 12 ) | 19.2645   | 1.5885    | 20.2946  | T ( 9 )  | 1,8142    | 2,0937    | 4,0299    |
| R ( 7 )  | 43.0747   | 4.8235    | 46.0697  | T ( 10 ) | 3,4480    | 1,7260    | 4,0299    |
| R ( 8 )  | 43.1821   | 4.7500    | 46.0697  | T ( 11 ) | 3,8682    | 1,6740    | 4,0299    |
| R ( 9 )  | 42.9481   | 4.7238    | 46.0697  | T ( 12 ) | 3,9342    | 1,6801    | 4,0299    |
| R ( 10 ) | 40.5557   | 4.0170    | 46.0697  |          |           |           |           |
| R ( 11 ) | 40.1592   | 3.9683    | 46.0697  |          |           |           |           |
| R ( 12 ) | 39.9707   | 3.9656    | 46.0697  |          |           |           |           |

LAMPIRAN N. Hasil Analisis Kualitatif dengan Metode Kemometrik LDA

N.1 Dengan Spektroskopi FTIR

N.1.1 Model Klasifikasi yang terbentuk

| Prediction |    | MATRIKS | FLAVONOID | Predicted | Prediction |    | MATRIKS  | FLAVONOID | Predicted |
|------------|----|---------|-----------|-----------|------------|----|----------|-----------|-----------|
|            |    | 1       | 2         | 3         |            |    | 1        | 2         | 3         |
| AEROSIL 1  | 1  | -0,8982 | -2,0529   | MATRIKS   | B 6        | 25 | -1,6240  | -0,8981   | FLAVONOID |
| AEROSIL 2  | 2  | -0,8781 | -2,6247   | MATRIKS   | C 1        | 26 | -0,7230  | -2,0124   | MATRIKS   |
| AEROSIL 3  | 3  | -0,9852 | -1,7600   | MATRIKS   | C 2        | 27 | -0,7206  | -2,2275   | MATRIKS   |
| AEROSIL 4  | 4  | -1,0385 | -1,7679   | MATRIKS   | C 3        | 28 | -0,7285  | -2,2365   | MATRIKS   |
| AEROSIL 5  | 5  | -1,0730 | -1,7911   | MATRIKS   | D 1        | 29 | -5,5318  | -1,5837   | FLAVONOID |
| AEROSIL 6  | 6  | -1,1506 | -1,8570   | MATRIKS   | D 2        | 30 | -4,2716  | -1,1401   | FLAVONOID |
| AQUADES 1  | 7  | -1,0230 | -3,6324   | MATRIKS   | D 2        | 31 | -5,5870  | -1,6069   | FLAVONOID |
| AQUADES 2  | 8  | -1,0494 | -3,6389   | MATRIKS   | D 3        | 32 | -4,7857  | -1,2872   | FLAVONOID |
| AQUADES 3  | 9  | -1,0453 | -3,6312   | MATRIKS   | D 3        | 33 | -5,2203  | -1,4501   | FLAVONOID |
| AQUADES 4  | 10 | -1,0540 | -3,6355   | MATRIKS   | D 4        | 34 | -3,3249  | -0,8243   | FLAVONOID |
| AQUADES 5  | 11 | -1,0560 | -3,6388   | MATRIKS   | D 4        | 35 | -5,4580  | -1,5555   | FLAVONOID |
| AQUADES 6  | 12 | -1,0602 | -3,6387   | MATRIKS   | D 5        | 36 | -4,9872  | -1,3536   | FLAVONOID |
| AQUADES 7  | 13 | -0,9555 | -3,6642   | MATRIKS   | D 6        | 37 | -4,1955  | -1,0659   | FLAVONOID |
| A 1        | 14 | -1,7742 | -0,8277   | FLAVONOID | D 7        | 38 | -4,7436  | -1,2646   | FLAVONOID |
| A 2        | 15 | -1,4640 | -0,9857   | FLAVONOID | E 1        | 39 | -5,8077  | -1,6948   | FLAVONOID |
| A 3        | 16 | -1,7361 | -0,8436   | FLAVONOID | E 1        | 40 | -5,6090  | -1,6131   | FLAVONOID |
| A 4        | 17 | -1,7205 | -0,8591   | FLAVONOID | E 2        | 41 | -4,9757  | -1,3502   | FLAVONOID |
| A 5        | 18 | -1,4359 | -1,0228   | FLAVONOID | E 2        | 42 | -4,9032  | -1,3193   | FLAVONOID |
| A 6        | 19 | -1,5872 | -0,9070   | FLAVONOID | E 3        | 43 | -5,1891  | -1,4364   | FLAVONOID |
| B 1        | 20 | -1,9203 | -0,7544   | FLAVONOID | E 3        | 44 | -5,4697  | -1,5516   | FLAVONOID |
| B 2        | 21 | -1,6200 | -0,8636   | FLAVONOID | E 4        | 45 | -4,6765  | -1,2359   | FLAVONOID |
| B 3        | 22 | -1,6185 | -0,8729   | FLAVONOID | E 4        | 46 | -5,3622  | -1,5057   | FLAVONOID |
| B 4        | 23 | -1,7242 | -0,8271   | FLAVONOID | E 5        | 47 | -4,7040  | -1,2449   | FLAVONOID |
| B 5        | 24 | -1,9343 | -0,7594   | FLAVONOID | E 5        | 48 | -4,6860  | -1,2369   | FLAVONOID |
| Prediction |    | MATRIKS | FLAVONOID | Predicted | Prediction |    | MATRIKS  | FLAVONOID | Predicted |
|            |    | 1       | 2         | 3         |            |    | 1        | 2         | 3         |
| E 6        | 49 | -5,0355 | -1,3764   | FLAVONOID | K 2        | 73 | -1,2957  | -1,1656   | FLAVONOID |
| E 6        | 50 | -4,7873 | -1,2753   | FLAVONOID | K 3        | 74 | -1,3029  | -1,1641   | FLAVONOID |
| F 2        | 51 | -1,9423 | -0,7195   | FLAVONOID | K 4        | 75 | -1,2574  | -1,2502   | FLAVONOID |
| F 3        | 52 | -1,8217 | -0,7541   | FLAVONOID | K 5        | 76 | -1,2659  | -1,2362   | FLAVONOID |
| G 1        | 53 | -4,6795 | -1,2409   | FLAVONOID | K 6        | 77 | -1,4169  | -1,0989   | FLAVONOID |
| G 2        | 54 | -2,7458 | -0,7227   | FLAVONOID | QUERSETIN  | 78 | -1,0499  | -3,5822   | MATRIKS   |
| G 3        | 55 | -1,9900 | -0,7100   | FLAVONOID | QUERSETIN  | 79 | -1,0725  | -3,6023   | MATRIKS   |
| G 3        | 56 | -2,4114 | -0,7146   | FLAVONOID | QUERSETIN  | 80 | -1,1055  | -3,6378   | MATRIKS   |
| G 4        | 57 | -2,3920 | -0,6951   | FLAVONOID | QUERSETIN  | 81 | -1,0939  | -3,6119   | MATRIKS   |
| G 4        | 58 | -3,2452 | -0,8163   | FLAVONOID | QUERSETIN  | 82 | -44,1048 | -47,0455  | MATRIKS   |
| I 2        | 59 | -3,8611 | -0,9635   | FLAVONOID | L 1        | 83 | -1,5033  | -1,0431   | FLAVONOID |
| I 3        | 60 | -3,5994 | -0,8907   | FLAVONOID | L 2        | 84 | -1,5346  | -0,9490   | FLAVONOID |
| I 4        | 61 | -4,4765 | -1,1729   | FLAVONOID | L 3        | 85 | -1,3784  | -1,0924   | FLAVONOID |
| H 1        | 62 | -4,8381 | -1,3096   | FLAVONOID | L 4        | 86 | -1,4181  | -1,0575   | FLAVONOID |
| H 2        | 63 | -4,3965 | -1,1582   | FLAVONOID | L 5        | 87 | -1,2325  | -1,1678   | FLAVONOID |
| H 3        | 64 | -4,4626 | -1,1780   | FLAVONOID | L 6        | 88 | -1,1831  | -1,4278   | MATRIKS   |
| H 4        | 65 | -4,7275 | -1,2767   | FLAVONOID | N 2        | 89 | -2,5517  | -0,7608   | FLAVONOID |
| H 5        | 66 | -4,6962 | -1,2600   | FLAVONOID | N 3        | 90 | -2,7025  | -0,7861   | FLAVONOID |
| H 6        | 67 | -4,1936 | -1,0844   | FLAVONOID | N 4        | 91 | -2,5522  | -0,7819   | FLAVONOID |
| J 2        | 68 | -3,6541 | -0,9059   | FLAVONOID |            |    |          |           |           |
| J 3        | 69 | -2,7412 | -0,7287   | FLAVONOID |            |    |          |           |           |
| J 4        | 70 | -3,2621 | -0,8118   | FLAVONOID |            |    |          |           |           |
| J 5        | 71 | -4,2830 | -1,1015   | FLAVONOID |            |    |          |           |           |
| K 1        | 72 | -1,2023 | -1,3292   | MATRIKS   |            |    |          |           |           |

## N.2 Dengan Spektroskopi NIR

### N.2.1 Model Klasifikasi yang terbentuk dari Sampel *Training Set*

| Prediction      |    | matriks  | flavonoid | Predicted | Prediction      |     | matriks  | flavonoid | Predicted |
|-----------------|----|----------|-----------|-----------|-----------------|-----|----------|-----------|-----------|
|                 | 1  | 2        | 3         |           | 1               | 2   | 3        |           |           |
| aerosil ( 1 )   | 1  | -5,4190  | -24,9677  | matriks   | A ( 9 )         | 27  | -53,7091 | -0,8918   | flavonoid |
| aerosil ( 2 )   | 2  | -5,4155  | -24,9661  | matriks   | A ( 10 )        | 28  | -55,3949 | -0,9622   | flavonoid |
| aerosil ( 3 )   | 3  | -5,4159  | -24,9574  | matriks   | A ( 11 )        | 29  | -55,3200 | -0,9583   | flavonoid |
| aerosil ( 7 )   | 4  | -3,0260  | -31,7014  | matriks   | A ( 12 )        | 30  | -55,2703 | -0,9553   | flavonoid |
| aerosil ( 8 )   | 5  | -3,0194  | -31,7190  | matriks   | B ( 1 )         | 31  | -48,7411 | -0,9024   | flavonoid |
| aerosil ( 9 )   | 6  | -3,0211  | -31,7162  | matriks   | B ( 2 )         | 32  | -48,6966 | -0,9047   | flavonoid |
| aerosil ( 10 )  | 7  | -2,6361  | -32,4874  | matriks   | B ( 3 )         | 33  | -48,6447 | -0,9050   | flavonoid |
| aerosil ( 11 )  | 8  | -2,6353  | -32,4994  | matriks   | B ( 4 )         | 34  | -44,6996 | -0,9961   | flavonoid |
| aerosil ( 12 )  | 9  | -2,6335  | -32,5050  | matriks   | B ( 5 )         | 35  | -44,6832 | -0,9994   | flavonoid |
| aquades ( 1 )   | 10 | -2,3437  | -66,4404  | matriks   | B ( 6 )         | 36  | -44,6081 | -1,0050   | flavonoid |
| aquades ( 2 )   | 11 | -2,3270  | -66,3140  | matriks   | B ( 7 )         | 37  | -43,4108 | -1,0261   | flavonoid |
| aquades ( 3 )   | 12 | -2,3180  | -66,2446  | matriks   | B ( 8 )         | 38  | -43,3485 | -1,0320   | flavonoid |
| aquades ( 4 )   | 13 | -2,4880  | -67,4947  | matriks   | B ( 9 )         | 39  | -43,3055 | -1,0383   | flavonoid |
| aquades ( 5 )   | 14 | -2,4585  | -67,2901  | matriks   | B ( 10 )        | 40  | -54,9094 | -1,0432   | flavonoid |
| aquades ( 6 )   | 15 | -2,4521  | -67,2418  | matriks   | B ( 11 )        | 41  | -54,8696 | -1,0436   | flavonoid |
| aquades ( 7 )   | 16 | -2,1694  | -65,0657  | matriks   | B ( 12 )        | 42  | -54,7769 | -1,0391   | flavonoid |
| aquades ( 8 )   | 17 | -2,1429  | -64,8463  | matriks   | C ( 1 )         | 43  | -53,7076 | -1,6519   | flavonoid |
| aquades ( 9 )   | 18 | -2,1298  | -64,7472  | matriks   | C ( 2 )         | 44  | -53,6620 | -1,6444   | flavonoid |
| aquades ( 10 )  | 19 | -2,3102  | -66,1866  | matriks   | C ( 3 )         | 45  | -53,6429 | -1,6430   | flavonoid |
| aquades ( 11 )  | 20 | -2,3201  | -66,2670  | matriks   | C ( 7 )         | 46  | -56,3513 | -1,8558   | flavonoid |
| aquades ( 12 )  | 21 | -2,3221  | -66,2777  | matriks   | C ( 8 )         | 47  | -56,2097 | -1,8363   | flavonoid |
| A ( 4 )         | 22 | -46,1939 | -0,7312   | flavonoid | C ( 9 )         | 48  | -56,1252 | -1,8223   | flavonoid |
| A ( 5 )         | 23 | -46,1242 | -0,7335   | flavonoid | C ( 10 )        | 49  | -55,5701 | -1,6957   | flavonoid |
| A ( 6 )         | 24 | -46,0627 | -0,7364   | flavonoid | C ( 11 )        | 50  | -55,4946 | -1,6853   | flavonoid |
| A ( 7 )         | 25 | -53,8322 | -0,8957   | flavonoid | C ( 12 )        | 51  | -55,4298 | -1,6750   | flavonoid |
| A ( 8 )         | 26 | -53,7934 | -0,8944   | flavonoid | D ( 1 )         | 52  | -42,3123 | -1,2541   | flavonoid |
| Prediction      |    | matriks  | flavonoid | Predicted | Prediction      |     | matriks  | flavonoid | Predicted |
|                 | 1  | 2        | 3         |           | 1               | 2   | 3        |           |           |
| D ( 2 )         | 53 | -42,2646 | -1,2519   | flavonoid | kuersetin ( 1 ) | 79  | -47,2677 | -2,2456   | flavonoid |
| D ( 3 )         | 54 | -42,2287 | -1,2490   | flavonoid | kuersetin ( 1 ) | 80  | -47,2677 | -2,2424   | flavonoid |
| D ( 4 )         | 55 | -35,7836 | -1,9210   | flavonoid | kuersetin ( 1 ) | 81  | -47,2956 | -2,2429   | flavonoid |
| D ( 5 )         | 56 | -35,7069 | -1,9292   | flavonoid | F ( 1 )         | 82  | -62,0567 | -1,7539   | flavonoid |
| D ( 6 )         | 57 | -35,6562 | -1,9319   | flavonoid | F ( 2 )         | 83  | -61,9113 | -1,7319   | flavonoid |
| D ( 7 )         | 58 | -38,2043 | -1,5605   | flavonoid | F ( 3 )         | 84  | -61,7916 | -1,7134   | flavonoid |
| D ( 8 )         | 59 | -38,1334 | -1,5616   | flavonoid | F ( 4 )         | 85  | -73,7270 | -3,5704   | flavonoid |
| D ( 9 )         | 60 | -38,0496 | -1,5664   | flavonoid | F ( 5 )         | 86  | -73,6573 | -3,5529   | flavonoid |
| D ( 10 )        | 61 | -42,8535 | -1,1514   | flavonoid | F ( 6 )         | 87  | -73,5659 | -3,5332   | flavonoid |
| D ( 11 )        | 62 | -42,8042 | -1,1518   | flavonoid | F ( 7 )         | 88  | -68,1965 | -2,6386   | flavonoid |
| D ( 12 )        | 63 | -42,7414 | -1,1502   | flavonoid | F ( 8 )         | 89  | -68,0439 | -2,6107   | flavonoid |
| E ( 1 )         | 64 | -44,1631 | -0,7950   | flavonoid | F ( 9 )         | 90  | -67,9249 | -2,5872   | flavonoid |
| E ( 2 )         | 65 | -44,0429 | -0,7998   | flavonoid | F ( 13 )        | 91  | -58,0548 | -1,2185   | flavonoid |
| E ( 3 )         | 66 | -43,9440 | -0,8042   | flavonoid | F ( 14 )        | 92  | -58,0081 | -1,2135   | flavonoid |
| E ( 10 )        | 67 | -46,9869 | -0,7060   | flavonoid | F ( 15 )        | 93  | -57,9826 | -1,2100   | flavonoid |
| E ( 11 )        | 68 | -46,9552 | -0,7062   | flavonoid | G ( 4 )         | 94  | -54,0209 | -1,3475   | flavonoid |
| E ( 12 )        | 69 | -46,8999 | -0,7065   | flavonoid | G ( 5 )         | 95  | -54,0115 | -1,3406   | flavonoid |
| kuersetin ( 1 ) | 70 | -45,4901 | -2,4095   | flavonoid | G ( 6 )         | 96  | -53,9164 | -1,3260   | flavonoid |
| kuersetin ( 2 ) | 71 | -45,5107 | -2,4052   | flavonoid | G ( 10 )        | 97  | -45,9373 | -1,1518   | flavonoid |
| kuersetin ( 3 ) | 72 | -45,5016 | -2,4012   | flavonoid | G ( 11 )        | 98  | -45,8782 | -1,1481   | flavonoid |
| kuersetin ( 4 ) | 73 | -50,2844 | -2,1258   | flavonoid | G ( 12 )        | 99  | -45,8261 | -1,1409   | flavonoid |
| kuersetin ( 5 ) | 74 | -50,3108 | -2,1229   | flavonoid | H ( 1 )         | 100 | -51,9941 | -1,1424   | flavonoid |
| kuersetin ( 6 ) | 75 | -50,3314 | -2,1240   | flavonoid | H ( 2 )         | 101 | -51,9081 | -1,1446   | flavonoid |
| kuersetin ( 7 ) | 76 | -45,4956 | -2,1423   | flavonoid | H ( 3 )         | 102 | -51,9121 | -1,1432   | flavonoid |
| kuersetin ( 8 ) | 77 | -45,5094 | -2,1365   | flavonoid | H ( 7 )         | 103 | -60,7055 | -1,7625   | flavonoid |
| kuersetin ( 9 ) | 78 | -45,5070 | -2,1338   | flavonoid | H ( 8 )         | 104 | -60,7021 | -1,7617   | flavonoid |



N.2.2 Hasil Validasi Model Klasifikasi dengan *Test Set* (LOOCV)

| Classified_ae   |    | matriks  | flavonoid | Class     |
|-----------------|----|----------|-----------|-----------|
|                 |    | 1        | 2         | 3         |
| aerosil ( 12 )  | 1  | -2,6335  | -32,5050  | matriks   |
| aquades ( 1 )   | 2  | -2,3437  | -66,4404  | matriks   |
| A ( 7 )         | 3  | -53,8322 | -0,8957   | flavonoid |
| B ( 10 )        | 4  | -54,9094 | -1,0432   | flavonoid |
| C ( 12 )        | 5  | -55,4298 | -1,6750   | flavonoid |
| D ( 3 )         | 6  | -42,2287 | -1,2490   | flavonoid |
| E ( 10 )        | 7  | -46,9869 | -0,7060   | flavonoid |
| kuersetin ( 1 ) | 8  | -45,4901 | -2,4095   | flavonoid |
| F ( 6 )         | 9  | -73,5659 | -3,5332   | flavonoid |
| G ( 10 )        | 10 | -45,9373 | -1,1518   | flavonoid |
| H ( 7 )         | 11 | -60,7055 | -1,7625   | flavonoid |
| I ( 8 )         | 12 | -44,0617 | -1,5239   | flavonoid |
| J ( 9 )         | 13 | -50,8442 | -1,0940   | flavonoid |
| K ( 7 )         | 14 | -52,6472 | -0,8093   | flavonoid |
| L ( 10 )        | 15 | -38,1784 | -2,2764   | flavonoid |
| M ( 11 )        | 16 | -44,4144 | -1,9156   | flavonoid |
| N ( 9 )         | 17 | -53,7021 | -2,4320   | flavonoid |
| O ( 3 )         | 18 | -46,0874 | -0,7219   | flavonoid |

## N.2.3 Hasil Pengklasifikasian Sampel Nyata dengan Metode LDA

| Classified_sam   |    | matriks  | flavonoid | Class     |
|------------------|----|----------|-----------|-----------|
|                  |    | 1        | 2         | 3         |
| daun salam ( 1 ) | 1  | -27.9556 | -4.1018   | flavonoid |
| daun salam ( 2 ) | 2  | -27.9690 | -4.0943   | flavonoid |
| daun salam ( 3 ) | 3  | -27.9805 | -4.0897   | flavonoid |
| daun salam ( 4 ) | 4  | -23.9137 | -5.7574   | flavonoid |
| daun salam ( 5 ) | 5  | -23.9178 | -5.7532   | flavonoid |
| daun salam ( 6 ) | 6  | -23.9186 | -5.7576   | flavonoid |
| stimuno ( 1 )    | 7  | -46.2417 | -0.7189   | flavonoid |
| stimuno ( 2 )    | 8  | -46.1156 | -0.7212   | flavonoid |
| stimuno ( 3 )    | 9  | -46.0874 | -0.7219   | flavonoid |
| stimuno ( 4 )    | 10 | -41.9423 | -0.9248   | flavonoid |
| stimuno ( 5 )    | 11 | -41.8509 | -0.9317   | flavonoid |
| stimuno ( 6 )    | 12 | -41.7837 | -0.9370   | flavonoid |

**Perhitungan % Kemampuan Prediksi Sampel Nyata**

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Kemampuan prediksi} &= \frac{\Sigma \text{ sampel nyata yang diprediksi benar}}{\Sigma \text{ total sampel nyata yang digunakan}} \times 100\% \\
 &= \frac{12}{12} \times 100\% \\
 &= 100\%
 \end{aligned}$$