

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Kualitatif Dengan KLT - Densitometri

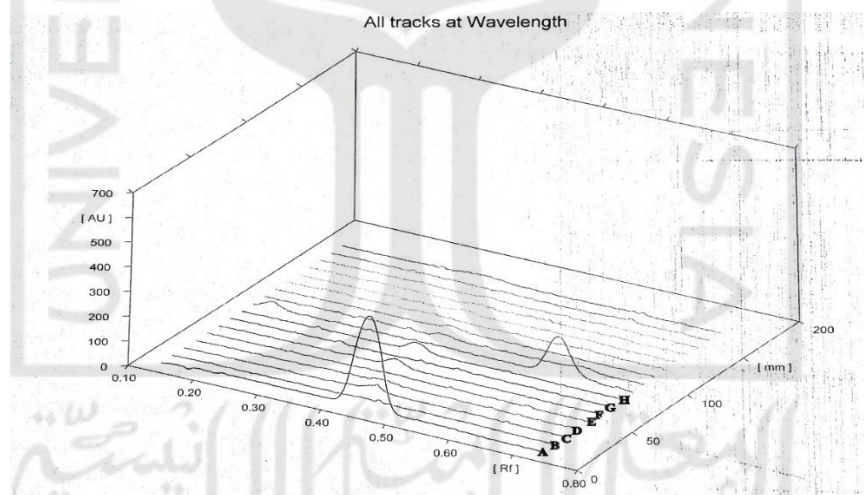
Dari hasil analisis pada 7 sampel, yang digunakan pada penelitian hanya 3 sampel dengan jenis jamu yang berbeda. Hasil analisis 7 sampel membuktikan bahwa 4 sampel mengandung parasetamol sehingga tidak digunakan pada penelitian ini. Berikut 3 sampel yang digunakan sesuai keterangan berikut.

Tabel 4.1 Informasi 3 Sampel Jamu Pegal Linu

No.	Nama Sampel	Kandungan Sampel
1.	Pegal Linu herbal (Sidomuncul)	<i>Melaleuca Fructus</i> (merica bolong) 0,7g, <i>Retrofracti Fructus</i> (cabe jawa) 0,7g, <i>Zingiberis aromatica Rhizoma</i> (lempuyang) 0,7g, <i>Languatis Rhizoma</i> (laos) 0,84g, <i>Curcuma Rhizoma</i> (temulawak) 0,49g, <i>Baeckea Folium</i> (jungurahap) 0,49g, <i>Kaempferia Rhizoma</i> (kencur) 0,35g, <i>Blumeae Folium</i> (sembung) 0,35g, <i>Phyllanthi Herba</i> (meniran) 0,35g, <i>Cyperi Rhizoma</i> (teki) 0,35g, <i>Menthae arvensitis herba</i> (poko) 0,35g, <i>Foeniculli Fructus</i> (adas) 0,28g, <i>Alyxia Cortex</i> (pulasari) 0,28g, <i>Usnea Thallus</i> (kayu angin) 0,28g, <i>Dioscoreae Tubera</i> (gadung) 0,14g.
2.	Pegal Linu (Jamu Leo)	<i>Curcuma Rhizoma</i> 1,20g, <i>Zingiberis zerumbeti Rhizoma</i> 0,66g, <i>Orthosiphonis Folium</i> 0,66g, <i>Blumeae Folium</i> 0,55g, <i>Equiseti Herba</i> 0,55g, <i>Baeckea Folium</i> 0,55g, <i>Isora Fructus</i> 0,39g, <i>Parkia semen</i> 0,33g, <i>Zingiberis americansis Rhizoma</i> 0,33g, <i>Retrofracti Fructus</i> 0,33g, <i>Myristicae pericarpium</i> 0,22g, <i>Melaleuca Folium</i> 0,16g, <i>Myristicae Semen</i> 0,16g, <i>Melaleuca Caulis</i> 0,11g.

3.	Pegal Linu (Linuric)	<i>Sonchi Folium</i> 0,7g, <i>Curcumae Rhizoma</i> 1,75g, <i>Piperis nigri Fructus</i> 0,35g, <i>Orthosiphonis Folium</i> 0,7g, <i>Syzigii Polyanthi Folium</i> 0,35g, <i>Languatis Rhizoma</i> 1,05g, <i>Zingiberis aromatica Rhizoma</i> 1,75g, <i>Retrofacti Fructus</i> 0,35g.
----	-------------------------	--

Sampel jamu pegal linu yang akan dilakukan analisis menggunakan spektrofotometer FTIR tidak boleh terdapat kandungan parasetamol didalamnya karena apabila ada kandungan parasetamol nya pada saat analisis FTIR akan mempengaruhi nilai konsentrasi prediksi menjadi lebih besar dari konsentrasi yang sengaja ditambahkan oleh peneliti pada saat pembacaan FTIR maka nilai konsentrasinya tidak sesuai dengan konsentrasi yang kita inginkan. Analisis kualitatif parasetamol dilakukan terhadap 7 sampel jamu pegal linu menggunakan KLT-Densitometri. Gambar 4.1 menunjukkan hasil pembacaan kromatogram standar parasetamol dan ketujuh sampel jamu pegal linu.



Gambar 4.1 Hasil pembacaan KLT-Densitometri dari 7 sampel jamu dan standar parasetamol yang diurutkan berdasarkan huruf tiap jamu

Kromatogram hasil analisis kualitatif secara KLT-Densitometri terdiri dari A: Standar Parasetamol; B: Jamu pegal linu herbal (Sidomuncul); C: Jamu pegal linu (cap jago); D: Jamu pegal linu (air mancur); E: Jamu pegal linu (cap leo); F: Jamu pegal linu (Gujati 59); G: Jamu pegal linu (linuric); H: Jamu pegal linu (PT Payung Pusaka Mandiri).

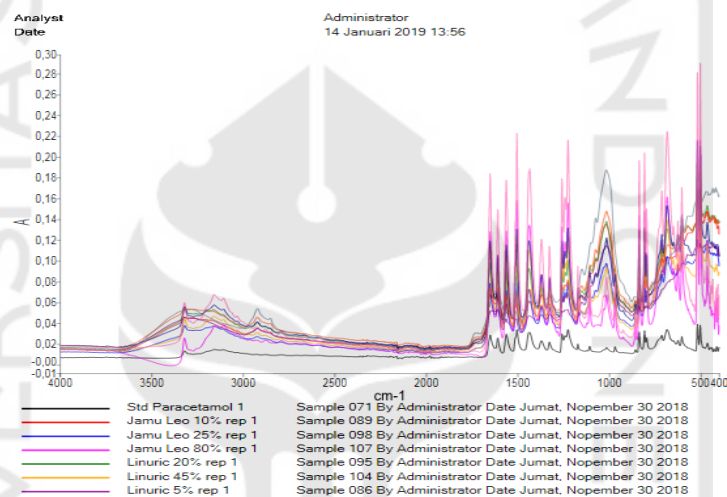
Tabel 4.2 Nilai Rf Sampel Jamu

No.	Jenis Sampel	Nilai Rf
1.	Parasetamol	0,45 (timbul puncak)
2.	Sidomuncul	Tidak timbul puncak (-)
3.	Cap jago	0,43 (timbul puncak)
4.	Air mancur	0,42 (timbul puncak)
5.	Cap leo	Tidak timbul puncak (-)
6.	Gujati 59	0,41 (timbul puncak)
7.	Linuric	0,31 (tidak timbul puncak)
8.	PT Payung Pusaka Mandiri	0,41 (timbul puncak)

Dari hasil uji tujuh sampel didapatkan empat sampel jamu pegal linu yang memiliki nilai Rf yang hampir sama atau mendekati dengan standar parasetamol, sehingga empat sampel tersebut diduga mengandung bahan kimia obat BKO berupa parasetamol. Empat sampel jamu tersebut merupakan jamu jago, air mancur, gujati 59, PT payung pusaka mandiri. Tiga sampel lainnya dengan nama jamu sidomuncul, jamu leo, linuric tetap digunakan karena sampel jamu tersebut nilai Rf nya tidak sama dengan standar parasetamol dan tidak mengandung standar parasetamol, karena apabila jamu tersebut mengandung parasetamol pada saat analisis FTIR akan mempengaruhi nilai konsentrasi prediksi menjadi lebih besar dari konsentrasi yang sengaja ditambahkan oleh peneliti pada saat pembacaan FTIR maka nilai konsentrasinya tidak sesuai dengan konsentrasi sampel spike yang kita inginkan. Sehingga, perlu dilakukan analisis kualitatif untuk membuktikan bahwa sampel jamu pegal linu tersebut tidak mengandung bahan kimia obat BKO, mengingat kembali banyaknya produk - produk jamu yang dijual di pasaran telah dicampur dengan bahan kimia obat seperti parasetamol tersebut.

4.2 Analisis Spektrofotometri FTIR Multivariat

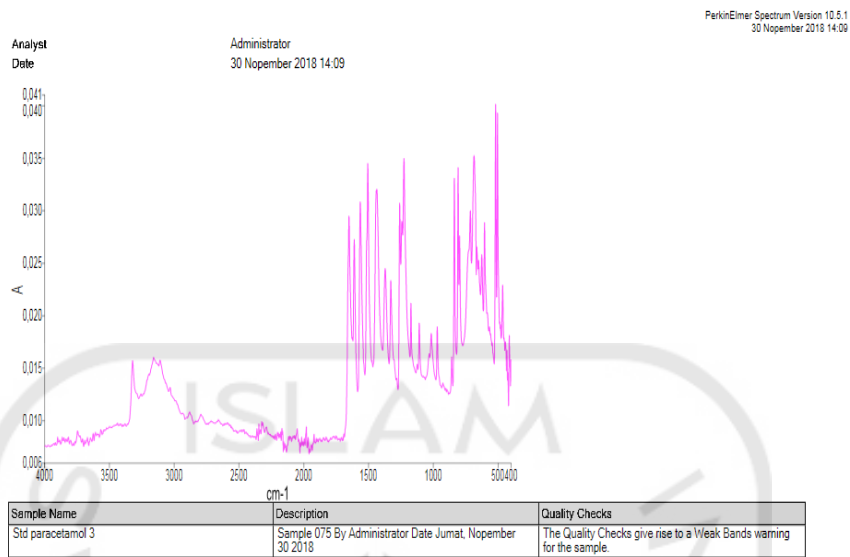
Sampel jamu pegal linu yang telah dilakukan analisis dengan KLT-Densitometer selanjutnya dilakukan analisis dengan spektrofotometer FTIR. Masing-masing sampel *spike* dibaca absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer FTIR pada bilangan gelombang 4000 – 400 cm^{-1} dan daya pisah 1 cm^{-1} . Scanning masing-masing sampel *spike* dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Gambar 4.2 memperlihatkan contoh *overlay* spektra FTIR dari 11 variasi konsentrasi sampel *spike* replikasi 1 beserta standar parasetamol.



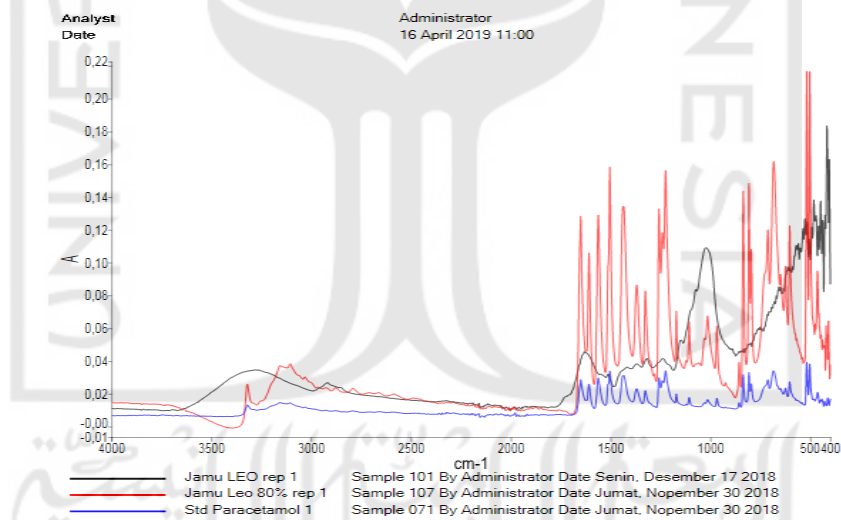
Gambar 4.2. *Overlay* spektra FTIR variasi sampel *spike* replikasi 1 beserta standar parasetamol yang dibaca pada bilangan gelombang 4000 - 400 cm^{-1} .

4.2.1. Analisis Spektra

Spektra campuran standar parasetamol-KBr (50 mg : KBr 950 mg) hasil pembacaan pada bilangan gelombang 4000 - 400 cm^{-1} dapat dilihat pada Gambar 4.3. Tujuan dilakukan pembacaan spektra campuran standar parasetamol-KBr yaitu untuk melihat puncak-puncak spektra yang mengkarakterisasi parasetamol itu sendiri. Selanjutnya dilakukan pembacaan spektra KBr murni, sampel *spike* 80% (80 mg standar murni parasetamol : 20 mg serbuk jamu) serta sampel jamu yang tidak mengandung parasetamol untuk melihat perbedaan puncak spektra yang dihasilkan.



Gambar 4.3. Spektra FTIR campuran standar parasetamol-KBr (50 mg standar parasetamol : 950 mg KBr)



Gambar 4.4. Overlay spektra FTIR campuran standar parasetamol-KBr, KBr murni, jamu tanpa parasetamol dan sampel *spike* 80%.

Gambar 4.4 merupakan hasil spektra FTIR dari campuran standar parasetamol-KBr (50 mg : KBr 950 mg), sampel *spike* 80% (80 mg standar murni parasetamol : 20 mg serbuk jamu) serta sampel jamu yang tidak mengandung parasetamol. *Overlay* tersebut menunjukkan bahwa spektra sampel *spike* 80% memiliki puncak spektra yang sama dengan spektra campuran standar parasetamol-KBr. Terjadinya kesamaan tersebut menandakan bahwa KBr dalam standar parasetamol tidak mempunyai nilai serapan terhadap gelombang inframerah. Hal ini dapat diperkuat dengan spektra KBr murni yang tidak memiliki puncak nilai serapan. KBr tidak memiliki momen dipol sehingga tidak terjadi transisi vibrasional antar molekul K dan Br. Oleh sebab itu, KBr tidak mampu menyerap radiasi inframerah. KBr yang dilakukan dalam penelitian ini hanya berfungsi sebagai pengencer standar parasetamol. Digunakan KBr sebagai pendukung dan pengencer sampel karena KBr merupakan bahan yang *inert* dan transparan terhadap sinar inframerah, sehingga tidak mempengaruhi serapan inframerah dari sampel analisis (Rohman, 2014). Penimbangan dilakukan dengan menggunakan timbangan analitik semimikro dengan kepekaan 0,01 mg dan batas timbang minimum sebesar 10 mg. Oleh karena itu, diperlukan pengenceran standar parasetamol dengan KBr agar mudah ditimbang dan dapat digunakan sebagai sampel *spike* yang berkonsentrasi kecil.

Tabel 4.3 Karakteristik spektra IR parasetamol yang terkandung dalam sediaan farmasi (Watson, *et al.*, 1999).

Gugus Fungsional	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)
N-H amida ulur	3360 cm ⁻¹
O-H fenolik ulur	3000 – 3500 cm ⁻¹
C-H	3000 cm ⁻¹
Overton aromatik	1840 – 1940 cm ⁻¹
C=O amida ulur	1650 cm ⁻¹
C=C aromatik ulur	1608 cm ⁻¹
N-H amida tekuk	1568 cm ⁻¹
C=C aromatik ulur	1510 cm ⁻¹
=C-H ulur	810 cm ⁻¹

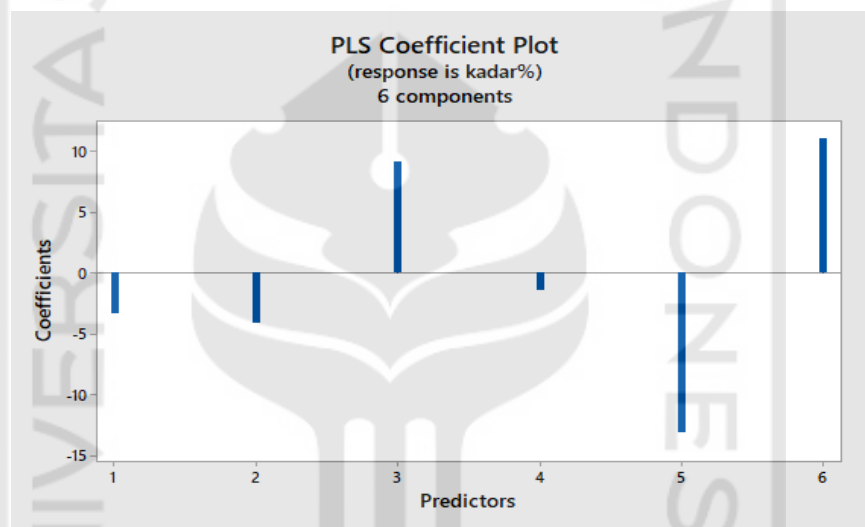
Spektra sampel jamu pegal linu yang tidak ditambahkan parasetamol tidak mempunyai puncak spektra yang serupa dengan standar parasetamol maupun sampel *spike*. Tidak adanya kesamaan puncak spektra antara keduanya disebabkan pada sampel jamu pegal linu tidak memiliki kandungan parasetamol seperti pada sampel *spike*. Hal tersebut menunjukkan bahwa spektrofotometer FTIR dapat memberikan serapan inframerah yang spesifik terhadap komponen-komponen yang terkandung dalam sampel analisis. Secara umum karakteristik spektra inframerah parasetamol dalam sediaan farmasi dapat dilihat pada tabel 4.3, dibandingkan dengan bilangan gelombang parasetamol dalam matriks jamu pegal linu dapat dilihat pada tabel 4.4.

Tabel 4.4. Hasil bilangan gelombang parasetamol dalam jamu pegal linu dari pemodelan PLS

Bilangan Gelombang	Gugus Fungsional
1562 cm ⁻¹	gugus N-H amida tekuk (Watson, et al., 1999)
1504 cm ⁻¹	gugus C=C (Watson, et al., 1999)
841 cm ⁻¹	gugus =C-H ulur (Watson, et al., 1999)

Sampel jamu pegal linu yang mengandung parasetamol memiliki karakteristik spektra inframerah yang berbeda dengan spektra inframerah yang dimiliki oleh parasetamol pada umumnya. Hal tersebut dikarenakan pada sampel jamu pegal linu juga terdapat komponen lainnya seperti komponen senyawa alami dari komposisi ekstrak tumbuh-tumbuhan penyusun produk jamu pegal linu tersebut. Ekstrak tumbuhan sebagai penyusun jamu pegal linu tentunya memiliki senyawa yang gugus fungsionalnya juga dimiliki oleh parasetamol. Sehingga untuk menilai karakteristik parasetamol perlu diperhatikan matriks apa yang digunakan bersamaan dengan parasetamol tersebut dalam suatu sediaan. Dalam penelitian ini, bilangan gelombang yang mempresentasikan parasetamol dalam jamu pegal linu diprediksi dengan metode kemometrika khususnya kalibrasi multivariat *Partial Least Square* (PLS). Bilangan gelombang yang terpilih secara PLS tersebut dimodelkan sebagai parasetamol pada matriks jamu pegal linu.

Bilangan gelombang yang dihasilkan pada penelitian ini untuk pemodelan kalibrasi parasetamol dalam sampel jamu pegal linu yaitu terdiri dari bilangan gelombang 1562, 1504, 841, 557, 544, 521 cm^{-1} . Enam bilangan gelombang tersebut dipilih sebagai bilangan gelombang selama analisis data karena parasetamol yang terkandung dalam sampel jamu pegal linu mampu memberikan serapan yang paling baik pada bilangan-bilangan gelombang tersebut, yaitu ditandai dengan nilai koefisien determinasi (R^2) dan nilai PLS *Coefficient Plot* yang paling tinggi seperti pada Gambar 4.5



Gambar 4.5. Grafik *coefficient plot* dari 6 bilangan gelombang yang dipilih sebagai bilangan gelombang optimal selama analisis.

4.2.2. Model Kalibrasi Menggunakan *Partial Least Square* (PLS)

Analisis kuantitatif parasetamol dalam jamu pegal linu sulit dilakukan dengan metode spektrofotometri konvensional tanpa adanya tahap pemisahan seperti yang dilakukan pada spektrofotometer FTIR karena tingginya *overlapping* spektra senyawa-senyawa yang terdapat di dalam sampel jamu pegal linu. Analisis suatu senyawa dalam berbagai campuran senyawa yang mempunyai spektra *overlapping* hanya dapat diatasi dengan melakukan metode pemisahan secara kromatografi atau spektrofotometri yang dikombinasikan dengan kalibrasi multivariat (Miller and Miller, 2010). Maka dari itu dengan berkembangnya teknik kalibrasi multivariat PLS maka penggunaan metode spektrofotometri FTIR yang dikombinasikan

dengan kalibrasi multivariat PLS tersebut dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi parasetamol dalam jamu pegal linu tanpa tahap pemisahan.

Metode kalibrasi multivariat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Partial Least Square* (PLS). Metode ini digunakan karena mampu mengekstrak informasi spektra yang kompleks dengan puncak-puncak yang tumpang tindih, adanya *impurities* dan *noise* (Rohman, 2014). PLS dapat menggunakan informasi spektra dari daerah yang luas dan menghubungkan perubahan spektra terhadap konsentrasi komponen secara bersamaan dengan menghitung kontribusi spektra lain yang dapat mengganggu spektrum (Rohman and Che Man, 2011). Terdapat tiga tahapan dalam analisis menggunakan metode PLS, yaitu pemodelan kalibrasi, validasi dan analisis sampel (Osborne *et al.*, 1997).

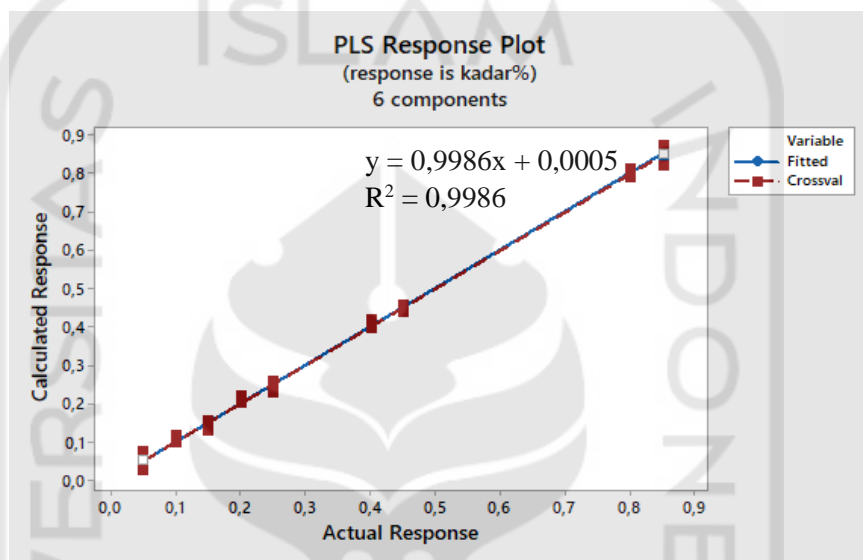
Analisis kuantitatif parasetamol dalam jamu pegal linu diawali dengan pemilihan bilangan gelombang dengan model regresi PLS menggunakan perangkat lunak Minitab 18 dengan cara memasukkan 3600 data absorbansi masing-masing sampel jamu pegal linu yang mengandung berbagai variasi konsentrasi parasetamol ke dalam program Minitab tersebut. Bilangan gelombang yang dipilih merupakan bilangan gelombang yang memberikan hubungan paling baik antara konsentrasi prediksi dengan konsentrasi aktual untuk masing-masing komponen.

Tabel 4.5. Hasil perhitungan Regresi 27 sampel kalibrasi secara PLS

No	Konsentrasi Parasetamol (% b/b)		No	Konsentrasi Parasetamol (% b/b)	
	Aktual	Prediksi		Aktual	Prediksi
1	0,05	0,067453	16	0,40	0,396945
2	0,05	0,028255	17	0,40	0,413861
3	0,05	0,046649	18	0,40	0,394813
4	0,10	0,104012	19	0,45	0,446791
5	0,10	0,112739	20	0,45	0,438812
6	0,10	0,096403	21	0,45	0,454736
7	0,15	0,149117	22	0,80	0,793104
8	0,15	0,1369	23	0,80	0,798476
9	0,15	0,152408	24	0,80	0,805473
10	0,20	0,200236	25	0,85	0,851175
11	0,20	0,21455	26	0,85	0,837186
12	0,20	0,21498	27	0,85	0,862777
13	0,25	0,25561	persamaan: $y = 0,9986x + 0,0005$		
14	0,25	0,245574			
15	0,25	0,230964			
				R ²	0,9986
				RMSEC	0,010188414

Hasil analisis menunjukkan parasetamol dalam jamu pegal linu yang memiliki nilai *root mean error of calibration* (RMSEC) sebesar 0,010188414 yang berarti mendekati 0 dan R² 0,9986 yang mendekati 1. Hasil tersebut menunjukkan bahwa model kalibrasi multivariat PLS memiliki keterkaitan antara nilai aktual dengan nilai prediksi yang baik. RMSEC menunjukkan adanya selisih antara konsentrasi prediksi dengan konsentrasi aktual sehingga jika nilai RMSEC semakin kecil atau mendekati 0 maka model yang digunakan mempunyai presisi yang baik karena faktor kesalahannya yang semakin kecil. Sementara R² menggambarkan seberapa

besar kemampuan variabel bebas dalam memprediksi variasi variabel terikat. Nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan bahwa kemampuan memprediksi semakin baik karena variasi variabel terikat (absorbansi) dapat diterangkan oleh variabel prediktor sehingga terprediksi mendekati nilai aktual dan mempunyai akurasi yang tinggi (Danzer et al, 2004). Adapun kurva hubungan antara konsentrasi terprediksi dengan konsentrasi aktual parasetamol dalam jamu pegal linu dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6. Kurva hubungan antara nilai aktual dengan nilai prediksi parasetamol dalam jamu pegal linu hasil pemodelan kalibrasi PLS.

Nilai prediksi adalah hasil pemodelan spektra FTIR parasetamol dalam jamu pegal linu yang diolah dengan teknik kemometrika kalibrasi PLS menggunakan Minitab 18. Sementara nilai aktual merupakan konsentrasi parasetamol yang sebenarnya sesuai dengan yang terkandung di dalam sampel uji jamu pegal linu. Dari data aktual dan prediksi tersebut maka dibuat persamaan regresi linier dengan nilai aktual sebagai sumbu X dan nilai prediksi sebagai sumbu Y guna memperoleh nilai R^2 yang merupakan parameter akurasi untuk analisis multivariat.

4.2.3. Validasi Internal *Partial Least Square* (PLS)

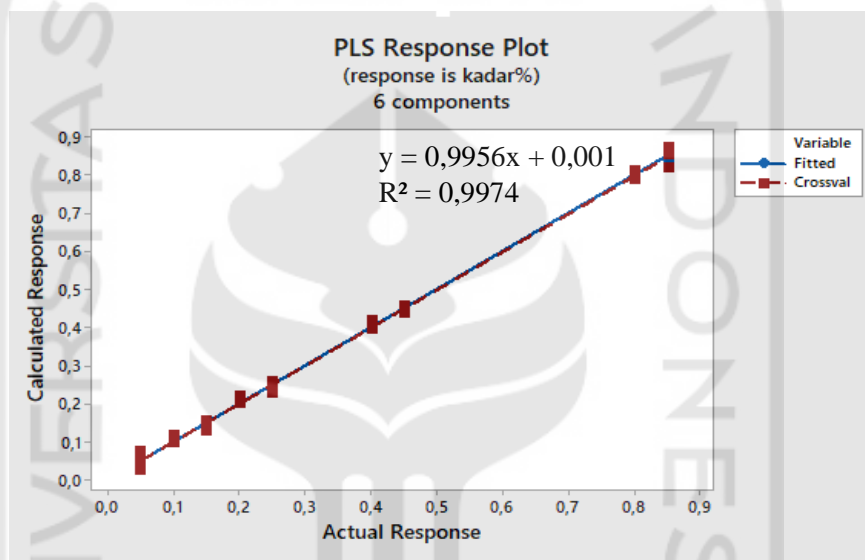
Kelemahan parameter kalibrasi multivariat adalah salah satunya dapat terjadi *over-fitting*, yaitu model tampak sempurna dengan korelasi yang tinggi dan kesalahan yang kecil tetapi model tersebut tidak dapat memberikan hasil yang baik jika diterapkan pada data lain yang berbeda dari sampel uji yang sama. Untuk mengatasi kelemahan tersebut, maka perlu dilakukan validasi internal dengan metode validasi silang secara *leave-one-out* (Faber and Rajko, 2007). Validasi silang dengan teknik *leave-one-out* dilakukan dengan cara mengeluarkan satu data dari set kalibrasi, kemudian dari data yang tersisa digunakan untuk membuat persamaan dan menghitung konsentrasi yang terprediksi dari data yang telah dikeluarkan sebelumnya. Proses ini dilakukan secara bergantian sampai semua sampel dari set kalibrasi dikeluarkan satu kali.

Selisih antara kadar prediksi dan kadar aktual dari setiap sampel dihitung, kemudian dihitung jumlah kuadrat dari selisih tadi. Kuadrat selisih tersebut dikenal dengan *Predicted Residual Error Sum Of Squares* (PRESS) yang merupakan salah satu indikator kebaikan model yang menggambarkan kemampuan prediksi. Parameter lain yang juga menggambarkan kebaikan prediksi model yaitu *Root Mean Squared Error Of Cross Validation* (RMSECV), dimana nilai RMSECV tersebut ditentukan dari nilai PRESS yang telah didapatkan dalam analisis. Semakin rendah nilai PRESS dan RMSECV, maka semakin kecil kesalahan dalam memprediksi dan kemampuan model untuk memprediksi semakin baik. Sementara R^2 prediksi menunjukkan korelasi antara nilai aktual dengan nilai prediksi. Nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan hubungan antara konsentrasi sebenarnya dengan konsentrasi prediksi dari sampel yang dianalisis akan semakin baik. Validasi silang juga dapat menentukan jumlah komponen yang mencirikan data.

Tabel 4.6. Hasil perhitungan validasi internal parasetamol dalam jamu pegal linu dengan teknik *leave-one-out*.

No	Konsentrasi Parasetamol (% b/b)		No	Konsentrasi Parasetamol (% b/b)	
	Aktual	Prediksi		Aktual	Prediksi
1	0,05	0,072832	16	0,40	0,396156
2	0,05	0,025268	17	0,40	0,417318
3	0,05	0,045882	18	0,40	0,393714
4	0,10	0,105099	19	0,45	0,446325
5	0,10	0,116205	20	0,45	0,434744
6	0,10	0,095001	21	0,45	0,456332
7	0,15	0,148707	22	0,80	0,785584
8	0,15	0,129072	23	0,80	0,797548
9	0,15	0,152788	24	0,80	0,810463
10	0,20	0,200284	25	0,85	0,852309
11	0,20	0,21568	26	0,85	0,818939
12	0,20	0,216973	27	0,85	0,87013
13	0,25	0,257019	persamaan: $y = 0,9956x + 0,001$		
14	0,25	0,244652			
15	0,25	0,227789	R^2	0,9974	
			PRESS	0,00535536	
			RMSECV	0,01408356	

Memperlihatkan hasil seleksi model validasi silang *leave-one-out* parasetamol dalam jamu pegal linu yaitu PRESS 0,00535536; RMSECV 0,01408356 dan R^2 prediksi 0,9974. Hasil ketiga parameter validasi tersebut sudah mencukupi dari kriteria hasil yang baik dengan nilai korelasi aktual dan prediksi yang tinggi serta tingkat kesalahan prediksi yang rendah. Profil korelasi antara nilai aktual dengan nilai prediksi parasetamol dalam jamu pegal linu dengan validasi silang *leave one out* dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7. Profil korelasi antara nilai aktual dan nilai prediksi parasetamol dalam jamu pegal linu hasil validasi internal dengan *leave-one-out*.

Tabel 4.7. Rekapitulasi evaluasi parameter validasi metode analisis parasetamol dalam jamu pegal linu dengan metode spektrofotometri FTIR kombinasi kalibrasi multivariat PLS.

No	Tahap	Parameter Validasi	Nilai
1	Kalibrasi	R ²	0,9986
		RMSEC	0,010188414
		A	0,0005
		B	0,9986
2	Validasi Internal (<i>leave one out</i>)	R ₂	0,9974
		PRESS	0,00535536
		RMSECV	0,01408356
		A	0,001
		B	0,9956

Validasi dilakukan untuk menentukan kriteria ketelitian (presisi) dan akurasi dari pemodelan kalibrasi PLS. Presisi dideskripsikan dengan nilai *RMSEC*, *PRESS* dan *RMSECV*. Semakin kecil nilai ketiga parameter tersebut maka semakin baik presisinya. Akurasi dinyatakan dengan nilai koefisien determinasi (R²), semakin mendekati 1 berarti akurasinya semakin tinggi. Selain itu, akurasi juga bisa dideskripsikan dengan persamaan garis $y = bx + a$, dimana x = konsentrasi aktual dan y = konsentrasi terprediksi. Jika nilai a mendekati 0 dan nilai b mendekati 1 maka akurasinya baik (Danzer *et al.*, 2004). Berdasarkan parameter yang dihasilkan dari uji validasi internal tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa model ini cukup baik dan layak digunakan untuk melakukan analisis kuantitatif parasetamol dalam sediaan jamu pegal linu.

