

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Kualitatif Densitometri

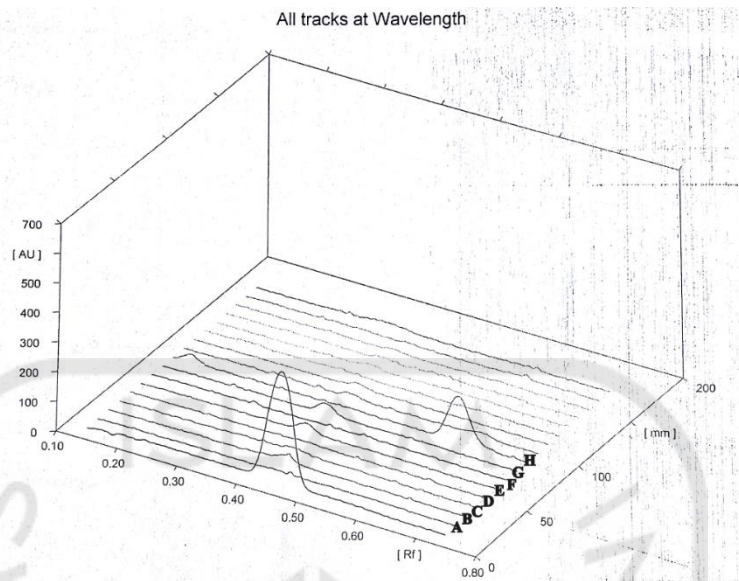
Penelitian kali ini menggunakan 7 jenis sampel jamu pegal linu dengan jenis atau merek yang berbeda-beda, adapun kandungan yang terdapat pada sampel yang digunakan adalah sebagai berikut :

Tabel 4.1 Informasi Kandungan Sampel Jamu Pegal Linu

No	Nama Sampel	Kandungan
1	Sidomuncul	<i>Melaleuca Fructus</i> (Merica Bolong), <i>Languatis Rhizoma</i> (Laos), <i>Zingiberis aromatica Rizhoma</i> (Lempuyang), <i>Retrofracti Fructus</i> (Cabe Jawa), <i>Curcumae Rizhoma</i> (Temulawak), <i>Cyperi Rizhoma</i> (Teki), <i>Phyllanti Herba</i> (Meniran), <i>Blumaeae Follium</i> (Sembung), <i>Zingiberis Rhizoma</i> (Jahe), <i>Kaempferiae Rizhoma</i> (Kencur), <i>Menthae Arvensitis Herba</i> (Poko), <i>Baeckeae Follium</i> (Jungrahap), <i>Alyxiae Cortex</i> (Pulasari), <i>Foeniculli Fructus</i> (Adas), <i>Usnea Thallus</i> (Kayu Angin), <i>Dioscoreae Tubera</i> (Gadung).
2	Jago	<i>Retrofracti Frustus</i> , <i>Eucalypti Frustus</i> , <i>Zingiberis Aromatica Rhizoma</i> , <i>Zingiberis Rhizoma</i> , <i>Curcume Rhizoma</i> .
3	Air Mancur	<i>Zingiberis purpurei Rhizoma</i> , <i>Imperatae Radix</i> , <i>Retrofracti Fructus</i> , <i>Nigellae sativa Semen</i> , <i>Zingiberis aromatica Rhizoma</i> , <i>Achyranthii Follium</i> , <i>Curcumae Rhizoma</i> .

No	Nama Sampel	Kandungan
4	Leo	<i>Curcumae Rhizoma, Zingiberis Zerumbeti Rhizoma, Orthosiphonis Folium, Blumeae Folium, Equiseti Herba, Baeckeeae Folium, Isorae Fructus.</i>
5	Gujati 59	<i>Panacis Radix (Ginseng), Curcumae domesticae Rhizoma (Rimpang Kunyit), Kaempferia Rhizoma (Rimpang Kencur).</i>
6	Linuric	<i>Sonchi Folium, Curcumae Rhizoma, Piperis nigri Fructus, Orthosiphonis Folium, Syzigii Polyanthi Folium, Languatis Rhizoma, Retrofracti Fructus.</i>
7	PT Payung Pusaka Mandiri	<i>Zingiberis Rhizoma, Foeniculi Fructus, Euchrestae Semen, Eurycomae Radix, Curcumae Rhizoma, Kaempferiae Rhizoma, Languatis Rhizoma, Retrofracti Fructus, Piperi Fructus nigri Fructus.</i>
8	Standar Fenilbutason	Standar <i>Phenylbutazone</i> SIGMA-ALDRICH

Kandungan sampel jamu yang terdapat pada tabel menunjukkan bahwa semua sampel yang digunakan terbebas dari kandungan fenilbutson, hal ini dapat diartikan bahwa semua sampel dapat digunakan dalam pengujian validasi metode Spektrofotometri FTIR. Pengujian kualitatif dilakukan untuk memastikan semua sampel yang digunakan terbebas dari kandungan fenilbutason. Pemilihan sampel yang terbebas dari fenilbutason bertujuan untuk memastikan konsentrasi BKO pada jamu sesuai dengan konsentrasi sampel spike yang digunakan. KLT-Densitometri digunakan untuk mendeteksi ada tidaknya kandungan bahan kimia obat fenilbutason pada masing-masing sampel. Kemudian hasil dari KLT-Densitometri dibaca dengan sinar UV 366 nm dan sinar UV 254 nm.



Gambar 4.1 Hasil pembacaan KLT pada sinar UV 254 nm

Peak H menunjukkan adanya peak khas yaitu berupa puncak peak tertinggi yang merupakan standar fenilbutason. Letak peak yang menunjukkan standar fenilbutason tidak memiliki kesamaan dengan sampel-sampel jamu yang akan digunakan sebagai validasi metode Spektrofotometri FTIR, dengan kata lain tidak memiliki kesamaan. Dengan demikian dapat disimpulkan sampel uji yang digunakan tidak mengandung bahan kimia obat fenilbutason.

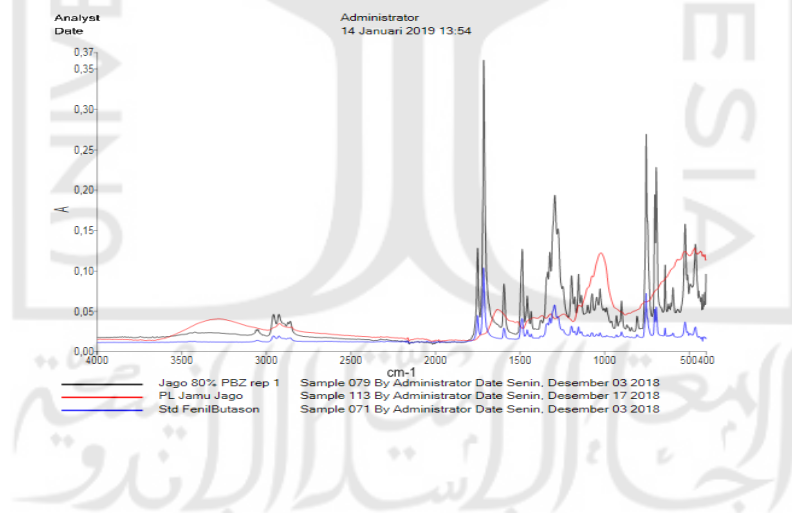
Tabel 4.2 Nilai Rf Sampel Jamu

No.	Jenis Sampel	Nilai Rf
1.	Fenilbutason	0,62
2.	Sidomuncul	-
3.	Jago	0,43
4.	Air Mancur	0,42
5.	Leo	-
6.	Gujati 59	0,41
7.	Linuric	0,31
8.	PT Payung Pusaka Mandiri	0,41

Dari hasil uji KLT nilai Rf yang telah didapat menunjukkan tidak adanya kesamaan antara nilai Rf dari standar fenilbutason dan juga nilai Rf dari sampel uji. Dengan demikian menunjukkan bahwa tidak ada kesamaan kandungan di dalam sediaan jamu dengan standar fenilbutason. Hal ini menjelaskan bahwa semua sampel dapat digunakan untuk validasi metode analisis menggunakan Spektrofotometri FTIR.

4.2 Analisis Spektrofotometri FTIR Multivariat

Sampel jamu yang telah dianalisis dengan KLT-Densitometri dan memiliki hasil Rf yang berbeda dengan standar (tidak mengandung BKO) selanjutnya dianalisis menggunakan Spektrofotometri FTIR. Sampel yang akan dianalisis sebaiknya dihomogenkan terlebih dahulu menggunakan homogenizer, hal ini dilakukan untuk menjamin tingkat kehomogenan sehingga hasil yang didapat lebih optimal. Pada analisis Spektrofotometri FTIR ini menggunakan berbagai variasi kadar yang telah ditentukan pada bilangan gelombang antara 4000-400 cm^{-1} . Adapun hasil yang didapatkan adalah sebagai berikut :



Gambar 4.2 Overlay spike sampel jamu (jamu jago) tanpa fenilbutason, sampel jamu yang ditambah fenilbutason (jamu jago 80%), standar fenilbutason pada bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} .

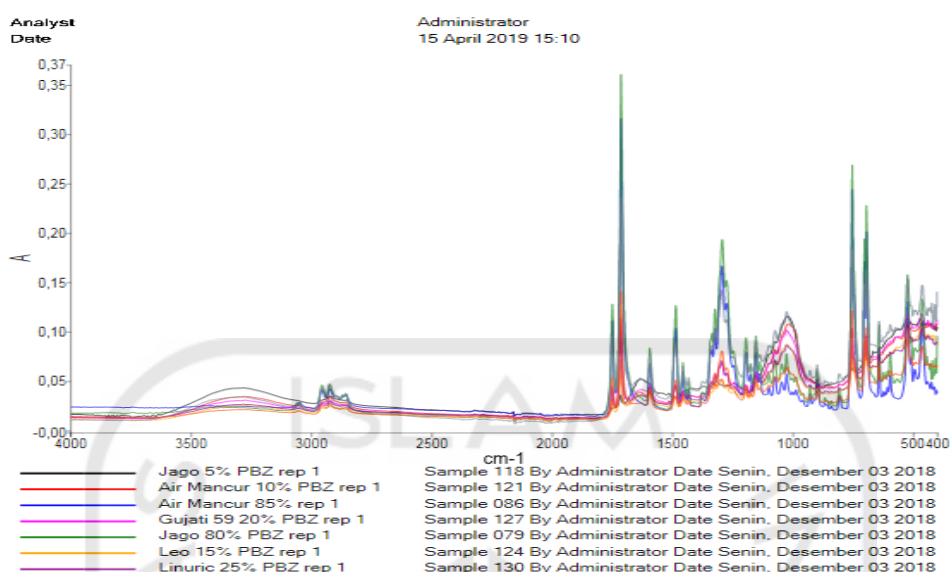
KBr adalah bahan yang inert dan transparan terhadap IR. Senyawa KBr digunakan pada analisis ini dengan tujuan untuk mempermudah penimbangan dalam konsentrasi kecil, yaitu dengan cara menambahkannya pada sampel yang

akan ditimbang. Sebagai contoh pada penimbangan sampel jamu yang ditambahkan fenilbutason 5% perlu penambahan KBr untuk mempermudah dalam proses penimbangan. Pemilihan KBr pada penimbangan dikarenakan senyawa ini tidak menghasilkan serapan, hanya serapan sampel saja yang terbaca (Sulistiyani,2017), maka dari itu hasil dari analisis dalam sampel jamu yang mengandung fenilbutason tidak menghasilkan *overlay* selain sampel jamu dan fenilbutason.

Gambar 4.2 menggambarkan *overlay* sampel uji (jamu jago) spike 80% memiliki puncak yang sama dengan standar fenilbutason, namun untuk jamu jago yang mengandung fenilbutason 0% memiliki puncak yang berbeda dengan fenilbutason. Hasil tersebut dikarenakan sampel jamu memiliki komposisi yang berbeda dengan fenilbutason, namun dengan perbedaan komposisi tersebut tidak menutup kemungkinan bahwa kandungan sampel di dalam jamu mempunyai kemiripan dengan kandungan di dalam fenilbutason. *Partial Least Square (PLS)* merupakan salah satu metode yang memiliki sensitifitas yang tinggi untuk memisahkan komponen-komponen yang akan dianalisis dengan memilih panjang gelombang yang khas dari fenilbutason.

4.2.1 Pemodelan Kalibrasi *Partial Least Square (PLS)*

Partial Least Square (PLS) akan membantu untuk memisahkan kandungan yang mungkin tidak terpakai, karena penggunaan FTIR akan menghasilkan puncak yang sangat banyak dan akan mempersulit proses analisis kandungan yang akan dikehendaki. PLS ini memiliki regresi yang bertujuan meminimalisir kesalahan pada penentuan respon sampel dengan cara mencari fungsi linear dari determinan yang dijelaskan sebagai banyak variasi dalam setiap respon dan akutansi untuk variasi dalam determinan. Keuntungan menggunakan PLS ini yaitu dapat menggabungkan variabel dependen dalam kompresi data dan dekomposisi operasi yaitu X dan Y data secara aktif terlibat dalam pembangunan set basis baru yang terdiri dari komponen PLS (Fakayode *et al.*, 2006).



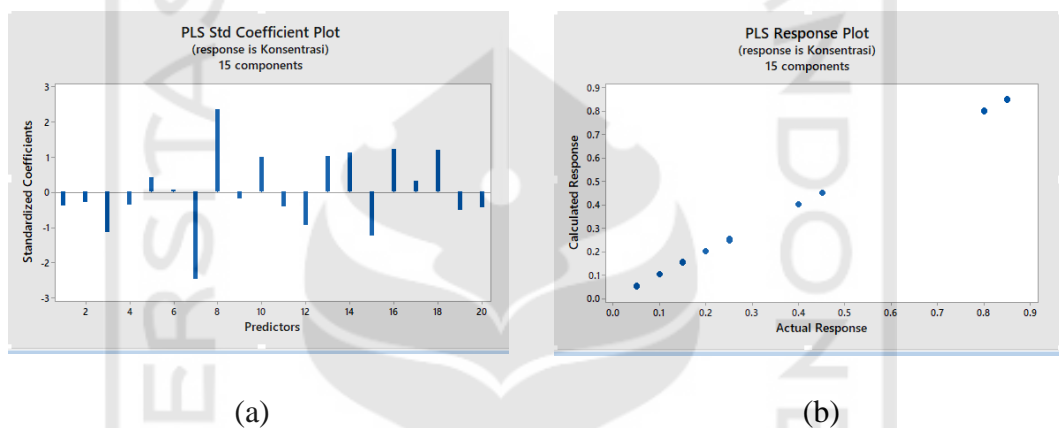
Gambar 4.3 Overlay Spektrofotometri FTIR pada kadar sampel jamu 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 45%, 80%, 85%.

Hal yang pertama dilakukan dalam analisis ini yaitu pemilihan gelombang menggunakan minitab 18 dengan rentang gelombang 400-4000 cm^{-1} yang akan menghasilkan 3600 absorbansi pada tiap sampel yang dianalisis. Hasil dari analisis ini memunculkan banyak puncak sehingga sangat sulit untuk memilih kandungan senyawa yang kita inginkan, oleh karena itu dibutuhkan *Partial Least Square* untuk mengeliminasi kandungan senyawa yang tidak diinginkan. Keuntungan regresi PLS ini yaitu dapat menambah variabel dependen didalam perhitungan dan menggabungkan variabel dependen dalam komposisi data dan operasi dekomposisi yaitu X dan Y data secara aktif terlibat dalam pendirian set basis baru yang terdiri dari komponen PLS (Elzey et al., 2016). Dari metode partial least square yang digunakan terpilih beberapa bilangan gelombang yang diharapkan memiliki kolerasi antara nilai aktual dan prediksi. Pemilihan bilangan gelombang dilakukan secara manual dengan cara menghapus satu per satu puncak yang dinilai tidak memiliki pengaruh atau puncak yang mengandung senyawa pengganggu. Bilangan gelombang yang terpilih yaitu 1708, 1597, 1500, 1499, 1497, 1487, 1478, 1476, 1472, 1428, 1388, 1362, 1355, 1292, 1189, 1173, 759, 753, 457, 424 cm^{-1} . Dengan metode PLS terpilihlah bilangan gelombang yang memiliki nilai korelasi terbaik.

Tabel 4.3 Bilangan gelombang hasil pemodelan *partial least square*

Gugus fungsional	Angka Gelombang
C = C aromatik	1486,52 cm ⁻¹
C-H	1293,59 cm ⁻¹
tersier C-H	2859 cm ⁻¹
C-N	1153 cm ⁻¹
N-N	1134 cm ⁻¹

(Anoop *et al.*, 2011) (Noviza *et al.*, 2016).



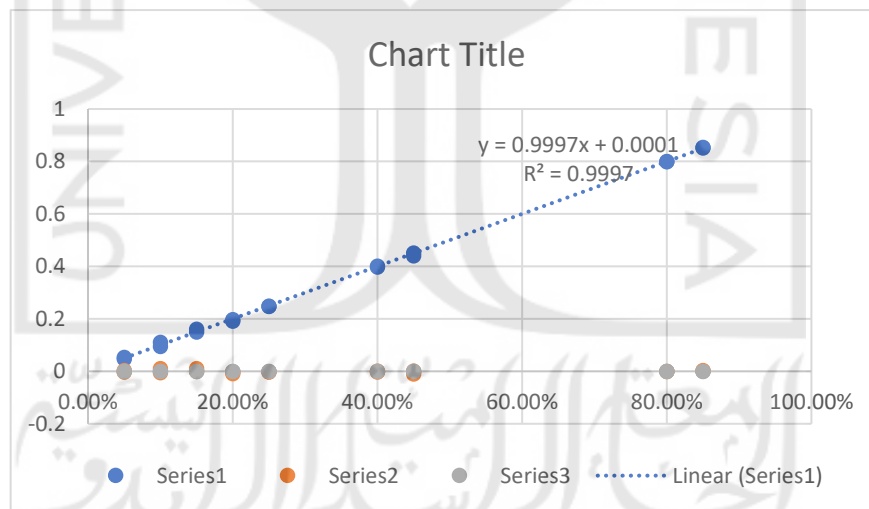
Gambar 4.4 (a) Grafik *coefficient plot* dari 20 bilangan gelombang yang terpilih sebagai bilangan gelombang optimal selama analisis. (b) Kurva hubungan antara nilai aktual dengan nilai prediksi fenilbutason dalam jamu pegal linu hasil pemodelan kalibrasi PLS

Hasil serapan dikatakan baik apabila terdapat nilai kolerasi antara nilai aktual dan prediksi, R², dan RMSEC. Kedekatan hubungan antara nilai aktual dan prediksi analit pada FTIR menggunakan parameter R². Semakin nilai R² mendekati angka 1, maka dapat dikatakan semakin baik hubungannya. Sedangkan nilai RMSEC yaitu menunjukkan ketidakpastian kalibrasi. Model kalibrasi dikatakan baik jika nilai RMSEC yang dihasilkan semakin kecil (mendekati angka 0) (Rohman *et al.*, 2011). Persamaan yang digunakan untuk mendapatkan hasil dari RMSEC yaitu :

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (actual - calculated)^2}{n}}$$

Tabel 4.4 Hasil Kalibrasi 20 sampel *spike* dengan PLS

No	Akurasi	Prediksi	No	Akurasi	Prediksi
1	0,05	0,047791	13	0,45	0,440564
2	0,05	0,053941	14	0,45	0,451064
3	0,10	0,110692	15	0,80	0,799392
4	0,10	0,095408	16	0,80	0,800108
5	0,15	0,150016	17	0,85	0,851547
6	0,15	0,16047	18	0,85	0,853976
7	0,20	0,191084	Persamaan $y = 0,9997x + 0,0001$		
8	0,20	0,197847			
9	0,25	0,247618	$R^2 = 0,9997$ RMSEC = 0,00511867		
10	0,25	0,249009			
11	0,40	0,401539			
12	0,40	0,397934			



Hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat dilihat dari nilai R^2 . Semakin mendekati angka 1, dapat dikatakan hasil yang diperoleh semakin bagus untuk memprediksi nilai aktualnya. Nilai yang diperoleh adalah 0,9997. RMSEC menunjukkan tingkat kesalahan yang timbul pada model kalibrasi. Semakin kecil nilainya (mendekati 0), hasil yang diperoleh semakin baik karena kesalahan yang

ada semakin kecil. RMSEC yang didapat adalah 0,00511867. Hasil ini bisa lebih baik lagi jika dalam proses pencampuran sampel lebih homogen, maka dari itu perlu digunakannya Homogenizer.

4.2.2 Validasi Model Kalibrasi *Leave One Out*

Validasi merupakan salah satu cara yang digunakan untuk menilai sebuah parameter tertentu pada sebuah penelitian yang biasanya dilakukan di laboratorium. Validasi digunakan untuk memastikan kelayakan parameter yang digunakan pada sebuah metode analisis (Harmita, 2004). Tahap ini dilakukan agar sebuah analisis yang dikerjakan terjamin keakuratannya (Prabowo et al., 2012). Teknik *leave one out* sendiri digunakan untuk mengatasi terjadinya *overfitting* yang biasa terjadi pada pemodelan dengan PLS. *Overfitting* itu sendiri adalah keadaan semu yang terlihat sempurna dengan tingkat kesalahan rendah, akan tetapi tidak dapat memberikan hasil yang baik. Validasi silang secara *leave one out* digunakan untuk mengatasi permasalahan ini dengan cara mengeluarkan salah satu sampel kalibrasi dan data yang tersisa digunakan untuk pemodelan dengan kalibrasi.

Root Mean Squared Error Cross Validation (RMSECV) adalah sebuah parameter prediksi yang berguna untuk meramalkan nilai ketidakpastian dari model validasi. Hasil dari metode ini dikatakan baik dengan cara melihat nilai R^2 dan RMSECV. Nilai RMSECV didapat melalui PRESS. Nilai R^2 dikatakan baik apabila hasilnya mendekati angka 1, sedangkan untuk nilai RMSECV semakin mendekati angka 0 hasil tersebut dikatakan valid. Persamaan yang digunakan yaitu :

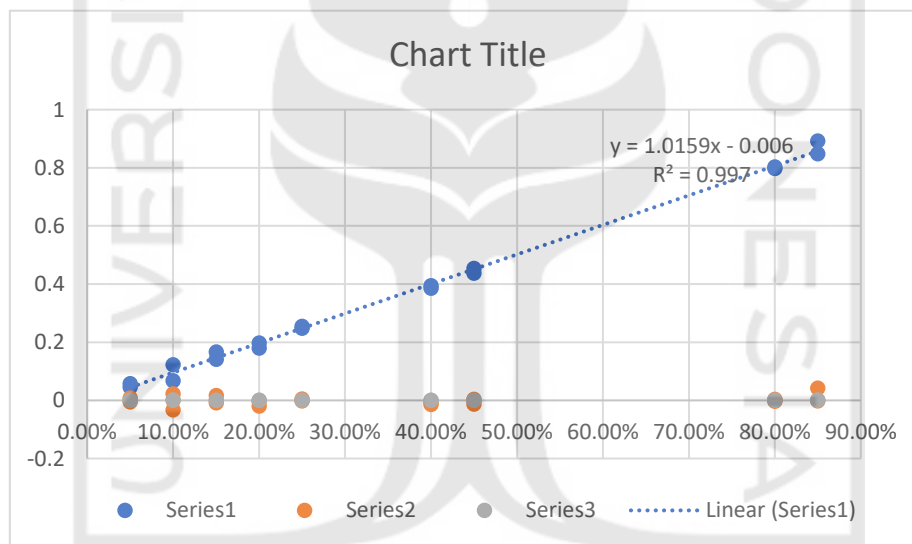
$$PRESS = \sum_{i=1}^N (actual - calculated)^2$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{PRESS}{n}}$$

Tabel 4.5 Hasil Validasi 20 sampel *spike* dengan *leave one out*

No	Akurasi	Prediksi	No	Akurasi	Prediksi
1	0,05	0,04506	13	0,45	0,437563
2	0,05	0,057629	14	0,45	0,453633

No	Akurasi	Prediksi	No	Akurasi	Prediksi
3	0,10	0,12296	15	0,80	0,797506
4	0,10	0,067681	16	0,80	0,803517
5	0,15	0,141671	17	0,85	0,892299
6	0,15	0,167027	18	0,85	0,848469
7	0,20	0,180311	Persamaan $y = 1,0159x - 0,006$		
8	0,20	0,197017			
9	0,25	0,248563	$R^2 = 0,997$ RMSECV = 0,016054643		
10	0,25	0,254458			
11	0,40	0,394357			
12	0,40	0,385943			



Hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat dilihat dari nilai R^2 . Semakin mendekati angka 1, dapat dikatakan hasil yang diperoleh semakin bagus untuk memprediksi nilai aktualnya. Nilai yang diperoleh adalah 0,997. RMSECV menunjukkan tingkat kesalahan yang timbul pada model kalibrasi. Semakin kecil nilainya (mendekati 0), hasil yang diperoleh semakin baik karena kesalahan yang ada semakin kecil. RMSECV yang didapat adalah 0,016054643. Oleh karena resiko pencampuran pada konsentrasi kurang dari 5% kurang baik, oleh karenanya diperlukan homogenizer.