



MODUL PEMBELAJARAN STANDARISASI OBAT BAHAN ALAM



PENYUSUN :

apt. Agustin Yumita, M.Si
apt. Nuriza Rahmadini, M.CMM.
Ni Putu Ermi Hikmawanti, M.Farm.
Dr. apt. Rini Prastiwi, M.Si.
Dr. apt. Sherley, M.Si.
apt. Vera Ladeska, M.Farm
Ema Dewanti, M.Si.
apt. Novia Delita, M.Farm.
apt. Nurul Qurrota Ayun, M.Si.

2023

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA**

UCAPAN TERIMA KASIH

Assalamu'alaikum Warohmatullahi Wabarokatuh

Puji Syukur ke hadirat Allah Subhanahu wa ta'ala atas nikmat yang senantiasa tercurah pada kita semua. Teriring salam dan do'a, semoga Bapak/Ibu selalu dalam lindungan Allah Subhanahu wa ta'ala dalam menjalankan tugas, Aamiin.

Dengan mengucap Alhamdulillah, akhirnya penyusunan modul Pembelajaran Standarisasi Obat Bahan Alam dapat selesai dengan baik sesuai dengan yang diarahkan kepada penyusun. Modul Pembelajaran Standarisasi Obat Bahan Alam adalah acuan yang digunakan mahasiswa Strata 1 (S1) jurusan Farmasi untuk mempelajari dan memahami mata kuliah Standarisasi Obat Bahan Alam (SOBA) yang merupakan mata kuliah wajib. Keberhasilan ini tidak luput dari kerja keras dan kerjasama dari semua pihak terkait. Dengan kerendahan hati, perkenankanlah penyusun menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Gunawan Suryoputro, M.Hum., selaku Rektor Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka.
2. Anisia Kumala Masyhadi, Lc., M.Psi, selaku Wakil Rektor 1 Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka.
3. Dr. Desvian Bandarsyah, M.Pd, selaku Wakil Rektor 2 Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka.
4. Dr. apt. Hadi Sunaryo, M.Si., selaku Dekan Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka.
5. Dr. apt. Rini Prastiwi, M.Si., selaku Ketua Program Studi Farmasi Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka.

Kami memohon maaf jika masih terdapat kekurangan dalam penyusunan modul ini. Semoga modul yang telah dibuat ini memberikan banyak manfaat dan mudah untuk dipahami dalam proses pembelajaran oleh mahasiswa dan para pembaca lain terkait dengan ilmu pengetahuan di bidang Biologi Farmasi.

Wassalammu'alaikum Warohmatullahi Wabarokatuh

Jakarta, Agustus 2023

Penyusun

DAFTAR ISI

<u>HALAMAN SAMPUL</u>	i
<u>UCAPAN TERIMA KASIH</u>	ii
<u>DAFTAR ISI</u>	iii
<u>DAFTAR GAMBAR</u>	vi
<u>DAFTAR TABEL</u>	vii
<u>TATA TERTIB PERKULIAHAN</u>	viii
<u>DESKRIPSI MATA KULIAH PERKULIAHAN</u>	ix
<u>ALUR KOMPETENSI</u>	x

MATERI 1:

<u>DEFINISI DAN RUANG LINGKUP STANDARDISASI</u>	1
Pendahuluan	1
Latihan 1	5
Jawaban 1	5
Rangkuman 1	6
Tes Formatif 1	7
Jawaban Tes Formatif 1	9

MATERI 2 :

<u>KONSEP STANDARDISASI</u>	10
Pendahuluan.....	10
Latihan 2	14
Jawaban 2	14
Rangkuman 2	14
Tes Formatif 2	15
Jawaban Tes Formatif 2.....	16

MATERI 3 :

<u>BAHAN BAKU OBAT BAHAN ALAM</u>	17
Pendahuluan.....	17
Latihan 3	23
Jawaban 3	23
Rangkuman 3	24
Tes Formatif 3	24
Jawaban Tes Formatif 3.....	25

MATERI 4 : STANDARDISASI DAN PENENTUAN MARKER OBA **26** |

Pendahuluan 4	26
Latihan 4	56
Jawaban 4	56

Rangkuman 4	57
Tes Formatif 4.....	57
Jawaban Tes Formatif 4.....	58
<u>MATERI 5 : METODE UJI PARAMETER NON SPESIFIK</u>	59
Pendahuluan 5	59
Latihan 5	72
Jawaban 5	72
Rangkuman 5	73
Tes Formatif 5	73
Jawaban Tes Formatif 5.....	74
<u>MATERI 6 : APLIKASI PENGUJIAN PARAMETER NON SPESIFIK.....</u>	75
Pendahuluan 6.....	75
Latihan 6	79
Jawaban 6	79
Rangkuman 6	80
Tes Formatif 6	80
Jawaban Tes Formatif 6.....	81
<u>MATERI 7 : METODE UJI PARAMETER SPESIFIK</u>	82
Pendahuluan 7.....	82
Latihan 7	91
Jawaban 7	91
Rangkuman 7	92
Tes Formatif 7	92
Jawaban Tes Formatif 7.....	93
<u>MATERI 8 : MONOGRAFI EKSTRAK TUMBUHAN OBAT 1 DAN 2</u>	94
Pendahuluan 8.....	94
Latihan 8	115
Jawaban 8.....	115
Rangkuman 8	116
Tes Formatif 8	116
Jawaban Tes Formatif 8.....	117
<u>MATERI 9 : APLIKASI INSTRUMENTASI DALAM ANALISIS SENYAWA PENANDA OBAT BAHAN ALAM</u>	118
Pendahuluan 9.....	118
Latihan 9.....	133
Jawaban 9.....	133
Rangkuman 9	133

Tes Formatif 9	134
Jawaban Tes Formatif 9.....	135
<u>MATERI 10 : APLIKASI PENGUJIAN PARAMETER SPESIFIK.....</u>	136
Pendahuluan 10	136
Latihan 10	143
Jawaban 10	143
Rangkuman 10	143
Tes Formatif 10	143
Jawaban Tes Formatif 10.....	144
<u>MATERI 11 : APLIKASI INSTRUMENTASI DALAM ANALISIS SENYAWA</u>	
<u>PENANDA OBAT / MARKER</u>	145
Pendahuluan 11	145
Rangkuman 11	153
Tes Formatif 11	153
Jawaban Tes Formatif 11.....	154
<u>MATERI 12 : STANDARDISASI SEDIAAN OBAT BAHAN ALAM.....</u>	155
Pendahuluan 12	155
Latihan 12	157
Jawaban 12	157
Rangkuman 12	158
Tes Formatif 12	158
Jawaban Tes Formatif 12.....	159
<u>DAFTAR PUSTAKA</u>	160

DAFTAR GAMBAR

Gambar 4.1. Standarisasi Obat Herbal	28
Gambar 4.2. Tahapan Standarisasi Bahan Alam hingga menjadi Fitofarmaka	28
Gambar 4.3. Tingkatan Respon	50
Gambar 4.4. Metode Pencocokan	51
Gambar 4.5. Uji Empat Poin	52
Gambar 5.1. Alat Destilasi	61
Gambar 5.2. Prosedur Penetapan ALT	66
Gambar 5.3. Metode Penetapan ALT	67
Gambar 5.4. Jamur <i>Aspergillus flavus</i>	69
Gambar 7.1. Profil KLT Lada Hitam	83
Gambar 8.1. Bawang Putih (<i>Allium sativum</i> L.)	95
Gambar 8.2. Brotowali (<i>Tinospora crispa</i> (L.) Miers Ex F & Terms)	97
Gambar 8.3. Buah merah (<i>Pandanus conoideus</i> (Lamk))	98
Gambar 8.4. Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrcarpa</i> (Val))	99
Gambar 8.5. Temu Mangga (<i>Curcuma mangga</i>)	100
Gambar 8.6. Saga (<i>Abrus precatorius</i>)	102
Gambar 8.7. Sembung (<i>Blumea balsamifer</i> (L). DC)	103
Gambar 8.8. Teki (<i>Cyperus rotundus</i> L.)	104
Gambar 8.9. Belimbing Wuluh (<i>Averrhoa blimbi</i> L.)	106
Gambar 8.10. Ceplukan (<i>Physalis minimae</i> Herbae)	107
Gambar 8.11. Kayu Manis (<i>Cinnamomum burmannii</i>)	108
Gambar 8.12. Keladi Tikus (<i>Thyponii flagelliformis</i>)	109
Gambar 8.13. Kemuning (<i>Murrayae paniculata</i>)	111
Gambar 8.14. Kunci Pepet (<i>Kaemferiae angustifolia</i>)	112
Gambar 8.15. Kayu Rapat (<i>Parameriae laevigatae</i>)	113
Gambar 8.16. Pare (<i>Momordicae charantiae</i>)	114
Gambar 9.1. Kromatogram Daun Jambu Biji	122
Gambar 9.2. Kromatogram KLT Lada Putih dan Piperin	123
Gambar 9.3. Kromatogram Standar Piperin	125
Gambar 9.4. Kromatogram KCKT Daun Gendarusa	126
Gambar 9.5. Kromatogram KG Minyak Atsiri Batang <i>O. basilicum</i>	127
Gambar 9.6. Kromatogram LC-MS Ekstrak Daun <i>A. conyzoide</i>	128
Gambar 9.7. Spektra UV Asam galat dan Buah Aubergine	129
Gambar 9.8. Spektra FT-IR Andrografolide	130
Gambar 9.9. Spektra SM Batang <i>O. basilicum</i>	131
Gambar 10.1. Sidik Jari KLT Ekstrak Dekok Daun <i>Cassia fistula</i>	137
Gambar 10.2. Sidik Jari KLT dari Beberapa Variasi Tanaman	137
Gambar 10.3. Sidik Jari KLT Jahe Merah	138
Gambar 10.4. Struktur Asam Fenolat dan Flavonoid	139
Gambar 11.1. Sambiloto	146
Gambar 11.2. Senyawa Dalam Sambiloto	146
Gambar 11.3. Profil HPTLC	148
Gambar 11.4. Profil HPLC	152

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Derajat Kehalusan Serbuk	34
Tabel 4.2. Derajat Halus Serbuk & Nomor Pengayak	35
Tabel 5.1. Tabel MPN	68
Tabel 6.1. Hasil Pengukuran Susut Pengering	75
Tabel 6.2. Hasil Pengukuran Kadar Abu	76
Tabel 6.3. Hasil Pengukuran Bobot Jenis	77
Tabel 6.4. Hasil Pengukuran Kadar Air	77
Tabel 6.5. Hasil Pengukuran Cemarkan Bakteri	78
Tabel 7.1. Sistem Fase Gerak Identifikasi Alkaloid	88
Tabel 9.1. Daftar Beberapa Senyawa Identitas dan Pembanding	118
Tabel 9.2. Perbedaan Metode KLT dengan KLT-KT	124
Tabel 10.1. Kurva Standar Asam Galat Pada Fenol Total	141
Tabel 10.2. Perhitungan Kadar Fenol Total <i>Sterculia macrophylla</i>	142
Tabel 11.1. Linearitas dan Nilai LOD dari AP & DIAP oleh HPTLC & HPLC	149
Tabel 11.2. Presisi Analitik antar & intra-hari Senyawa AP-DIAP Sambiloto	149
Tabel 11.3. Kadar AP dan DIAP Herba Sambiloto	150
Tabel 11.4. Data Recovery Standar AP & DIAP <i>A.paniculata</i>	151

TATA TERTIB PERKULIAHAN

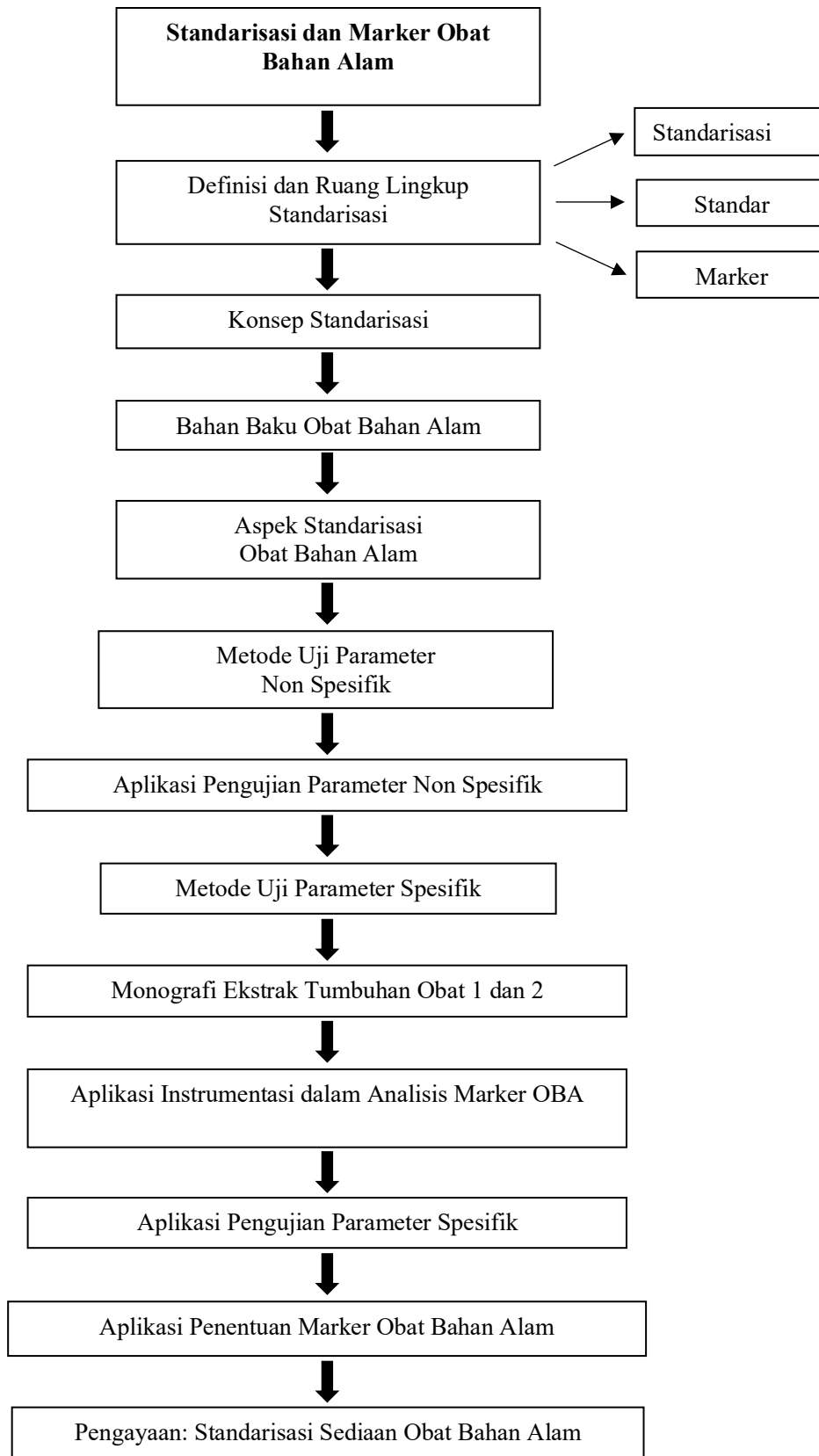
1. Mahasiswa yang diperkenankan mengikuti perkuliahan adalah mereka yang terdaftar secara akademik.
2. Mahasiswa wajib hadir 5 menit sebelum perkuliahan dimulai, keterlambatan lebih dari 10 menit sejak perkuliahan dimulai, mahasiswa dianggap tidak hadir.
3. Jika berhalangan hadir, mahasiswa harus dapat memberikan keterangan tertulis terkait dengan alasan ketidakhadirannya yang ditujukan kepada dosen pengampu.
4. Mahasiswa seperti no. 2 di atas, jika akan mengganti kelas perkuliahan pada hari lain, wajib berkoordinasi dengan pengampu matakuliah yang dituju. Pergantian kelas diwajibkan pada minggu pertemuan yang sama.
5. Mahasiswa melalui ketua kelas menandatangani kontrak perkuliahan yang disepakati bersama dengan dosen pengampu berisi sistem perkuliahan, sistem penilaian dan tata tertib dalam mengikuti perkuliahan.

HAL-HAL LAIN YANG BERSIFAT TEKNIS DAN UMUM DIATUR OLEH PROGRAM STUDI.

DESKRIPSI MATA KULIAH

Standardisasi obat bahan alam merupakan mata kuliah wajib di semester enam yang mempelajari tentang parameter-parameter standar yang perlu ditentukan dalam menjaga kualitas dari sediaan obat bahan alam beserta beberapa rincian monografi ekstrak tumbuhan obatnya. Perkuliahan standardisasi obat bahan alam bertujuan untuk mengetahui keamanan, khasiat dan mutu obat bahan alam, menyeragamkan komposisi kandungan senyawa aktif (jenis dan kadar), yang konsisten, keseragaman dosis sehingga mempunyai efek yang dapat dipertanggung jawabkan. Menjamin obat bahan alam dari satu batch ke batch lainnya tetap ajeg atau sama (konstan) dosis dan stabilitasnya sehingga memberikan hasil uji klinik yang baik dan aman digunakan, meningkatkan nilai ekonomi produk obat bahan alam, mencegah pemalsuan, yang kemudian berdampak pada meningkatnya tingkat kepercayaan konsumen.

ALUR KOMPETENSI



MATERI 1: DEFINISI DAN RUANG LINGKUP STANDARISASI

Metode Pembelajaran	Estimasi Waktu	CPMK
<ul style="list-style-type: none"> • Kuliah Interaktif • Diskusi • <i>Question Based Learning</i> 	150 menit	<ul style="list-style-type: none"> • CPMK-1: Mampu menunjukkan sikap bertanggung jawab dalam mengikuti aturan perkuliahan; (CPL-1) • CPMK-2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu, dan terukur; (CPL-2) • CPMK-3 : Mampu menerapkan pengetahuan & pemanfaatan Obat Bahan Alam yang aman, bermutu & bermanfaat; (CPL-3)

1.1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang kaya dengan bahan alam memiliki 30.000 spesies tumbuhan tingkat tinggi, 7000 spesies telah diketahui khasiatnya, 1000 spesies telah teridentifikasi dan kurang dari 300 spesies telah digunakan sebagai Bahan Baku Obat Tradisional (BBOT).

Standarisasi suatu sediaan obat tradisional (simplisia atau ekstrak) adalah suatu persyaratan yang harus dipenuhi agar terwujudnya keberulangan (*reproducibility*) terhadap kualitas farmasetik maupun terapeutik. Dalam upaya standarisasi tersebut perlu ditentukan persyaratan standar yang ditetapkan di dalam Peraturan dan Perundang-Undangan yang berlaku.

Standarisasi suatu sediaan obat (simplisia atau ekstrak) tidaklah sulit bila senyawa aktif yang berperan telah diketahui dengan pasti. Pada prinsipnya standarisasi dapat didasarkan atas senyawa aktif, kelompok senyawa aktif, maupun atas dasar senyawa karakter (bila senyawa aktif belum diketahui dengan pasti). Bila digunakan senyawa karakter pada upaya standarisasi, maka dalam hal ini hanyalah bertujuan untuk dapat membantu menentukan kualitas bahan obat tersebut. Senyawa karakter yang dipakai haruslah spesifik digunakan selama senyawa aktif belum diketahui dengan pasti. Standarisasi dapat dilakukan secara fisika, kimia dan biologi (Parwata, 2017). Pada prinsipnya standarisasi Obat Tradisional dilakukan mulai dari bahan baku (simplisia, ekstrak) sampai dengan sediaan obat jadi. Berdasarkan hal inilah di kelompokkan menjadi 3 (tiga) yaitu:

- a. Standarisasi Bahan
Bahan bisa berupa simplisia dan ekstrak terstandar merupakan bahan aktif yang diketahui kadarnya.
- b. Standarisasi Produk

- Kandungan bahan aktif stabil atau tetap
- c. Standarisasi Proses
- Metode proses dan peralatan dalam pembuatan sesuai dengan Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik (CPOTB).

Pada standarisasi perlu ditentukan Persyaratan Standar yang diperlukan. Pada pelaksanaan standarisasi perlu dilakukan dengan berbagai metode (Pengujian Multifaktorial) (Purwata, 2017). Standar sebenarnya telah menjadi bagian dari kehidupan kita sehari-hari meskipun kita seringkali kita tidak menyadarinya, tanpa juga memikirkannya bagaimana standar tersebut diciptakan ataupun manfaat yang dapat diperoleh (Porwonggono *et. al.* 2009).

Standarisasi simplisia di butuhkan karena kandungan kimia tumbuhan obat sangat bervariasi tergantung banyak faktor. Kandungan kimia yang dapat digunakan sebagai standar adalah kandungan kimia berkhasiat, atau kandungan kimia sebagai petanda (marker) atau memiliki sidik jari (*finger fingerprint*) pada kromatogram.

Bahan Baku berupa Simplisia: Simplisia merupakan produk hasil pertanian tumbuhan obat setelah melalui proses pasca panen dalam proses preparasi secara sederhana siap dipakai untuk proses selanjutnya. Simplisia harus memenuhi parameter-parameter standar diantaranya kebenaran jenis, kontaminasi kimia, kontaminasi biologi dan stabilitas (dari segi wadah, penyimpanan dan transportasi). Selain itu *Quality-Safety-Efficacy*, juga penting jika simplisia sebagai produk konsumsi manusia Dalam bentuk ekstrak selain persyaratan monografi bahan baku (simplisia) diperlukan persyaratan mutu ekstrak terdiri dari beberapa parameter yang harus diukur atau dianalisis agar bahan obat atau sediaan obat dapat dijamin keamanannya dari konsumen atau masyarakat pengguna dan sesuai dengan Farmakope Indonesia maupun buku standar resmi lainnya. Parameter tersebut di kelompokkan menjadi dua, yaitu:

- a. Parameter Non Spesifik Berfokus pada aspek kimia, mikrobiologi dan fisika yang akan mempengaruhi keamanan konsumen dan stabilitas.
- b. Parameter Spesifik
Berfokus pada senyawa atau golongan senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktifitas farmakologinya.

Penentuan mutu untuk menjamin manfaat atau khasiat yang optimum tergantung pada kandungan senyawa bioaktif yang terdapat dalam tanaman atau obat tradisional yang telah terbukti memiliki aktifitas fisiologi tertentu (Syarifudin, 2011).

1.2. Tujuan Standarisasi .

Menjamin keamanan, khasiat dan mutu obat bahan alam, menyeragamkan komposisi kandungan senyawa aktif (jenis dan kadar), yang konsisten, keseragaman dosis sehingga mempunyai efek yang dapat dipertanggung jawabkan. Menjamin obat bahan alam dari satu batch ke batch lainnya tetap ajeg atau sama (konstan) dosis dan stabilitasnya sehingga memberikan hasil uji klinik yang baik dan aman digunakan. Meningkatkan nilai

ekonomi produk obat bahan alam. Mencegah pemalsuan, sehingga meningkatkan tingkat kepercayaan konsumen.

1.3. Kegunaan dan Pentingnya Standarisasi OBA

Penggunaan Obat Tradisional dari tahun ke tahun semakin meningkat, sehingga bahan baku (simplisia, ekstrak) maupun produknya harus dilakukan standarisasi sehingga menghasilkan bahan baku/sediaan obat tradisional yang aman, berkhasiat dan bermutu sehingga semakin di percaya di tingkat nasional maupun internasional.

Omzet Jamu secara nasional juga meningkat terus tahun 2011 mencapai Rp 11.5 Triliun (Kemendag, 2014). Asosiasi Gabungan Pengusaha Jamu (GP Jamu) dengan pertumbuhan penjualan sebesar 5% di tahun 2020 (Kongres GP Jamu, 2020).

Obat Bahan Alam (OBA) sebagai obat tradisional yang telah terdaftar di Badan POM teregistrasi (Database BPOM, 2019) yang di kenal dengan 3 katagori yaitu: Kategori Jamu sebanyak diatas 10.000, Obat Herbal Terstandar (OHT) 95, dan fitofarmaka 43.

Obat Tradisional yang beredar di seluruh Indonesia harus terjamin keamanan, khasiat serta mutunya. Dalam rangka meningkatkan mutu, keamanan dan khasiat Obat Tradisional, maka salah satu langkah yaitu dilakukan standarisasi bahan baku yang di gunakan baik berupa simplisia maupun ekstrak yang akan di gunakan dalam memproduksi Obat Tradisional.

1.4. Aspek Standarisasi dan Marker OBA

1.4.1. Aspek Standarisasi: Berfokus pada 2 aspek yaitu:

a. Aspek Parameter Spesifik

Berfokus pada analisis kandungan senyawa kimia atau golongan senyawa kimia (kualitatif dan kuantitatif) yang mempunyai efek farmakologi (efek terapi).

b. Aspek Parameter Non Spesifik

Berfokus pada aspek fisika, biologi dan kimia sehingga stabilitas dan keamanannya terjamin.

1.4.2. Marker

Marker adalah senyawa kimia yang dapat digunakan sebagai salah satu penanda sidik jari dari suatu simplisia (hasil sintesis atau hasil dari isolasi).

1.4.3. Senyawa Marker

Senyawa aktif yaitu marker yang aktif secara farmakologis.

1.4.4. Senyawa identitas

Marker identitas merupakan senyawa yang khas, unik, eksklusif yang terdapat pada suatu tanaman.

1.4.5. Tujuan marker identitas

Merupakan zat tunggal/lebih yang ditunjukkan hanya untuk analisis/ciri/khas fragmen khas.

Contohnya pada tanaman purwoceng zat aktifnya stigmasterol, marker identitasnya germacron. Cabe jawa zat aktifnya stigmasterol, marker identitas kapsisin.

1.5. Penentu Sebagai Acuan Standarisasi dan Pelaku Standarisasi

- a. Pemerintah melalui Kementerian Kesehatan R.I dan Badan Pengawas Obat dan Makanan R.I
- b. Standar ini digunakan sebagai acuan oleh produsen, industri eksportir, Lembaga penelitian, dsbnya
- c. Acuan standar: Buku Farmakope, Farmakope Herbal (Indonesia, asing).
- d. Acuan pendukung WHO: *Quality Control Methods for Medicinals* (1998).

1.6. Pelaku Standarisasi:

Catatan bahan baku yang digunakan adalah dalam bentuk ekstrak.

- a. Produsen
- b. Suplier
- c. Agen
- d. Pengimpor
- e. Pengekspor

Latihan 1

1. Jelaskan mengapa Obat Tradisional dari tahun ke tahun semakin diminati oleh masyarakat?
2. Bagaimana urutan dalam melakukan standarisasi terhadap bahan awal sampai produk jadi secara garis besarnya?
3. Dalam melakukan pengujian bahan baku (simplisia, ekstrak) dan produk jadi secara kimia kualitatif maupun kuantitatif, maka diperlukan suatu zat. Apakah nama zat tersebut? Jelaskan yang saudara ketahui tentang pembagian zat tersebut beserta contohnya.
4. Dalam melakukan pengujian baik bahan baku (simplisa, ekstrak) maupun produk jadi, digunakan acuan. Apa nama buku acuan tersebut? Apa alasannya?
5. Apa perbedaan yang saudara ketahui tentang standar, standarisasi dan standarisasi obat herbal?

Jawaban 1

1. Indonesia dikenal dengan Obat Bahan Alam yang jenisnya banyak yang mempunyai khasiat secara empiris maupun ilmiah telah terbukti terhadap keamanannya, khasiatnya dan mutunya karena bahan bakunya yang digunakan telah dilakukan standarisasi.
2. Urutan dalam melakukan standarisasi
 - a. Standarisasi Bahan
Bahan bisa berupa simplisia dan ekstrak terstandar merupakan bahan aktif yang diketahui kadarnya.
 - b. Standarisasi Proses
Metode proses dan peralatan dalam pembuatan sesuai dengan Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik (CPOTB).
 - c. Standarisasi Produk
Kandungan bahan aktif stabil atau tetap.
3. Zat yang dimaksudkan adalah marker (zat penanda)
Marker adalah senyawa kimia yang dapat digunakan sebagai salah satu penanda/sidik jari dari suatu simplisia (hasil sintesis atau hasil dari isolasi). Senyawa Marker, di bagi berdasarkan:
 - a. Senyawa aktif yaitu marker yang aktif secara farmakologis.
 - b. Senyawa identitas
Marker identitas merupakan senyawa yang khas, unik, eksklusif yang terdapat pada suatu tanaman.
Tujuan marker identitas, merupakan zat tunggal/lebih yang ditunjukkan hanya untuk analisis/ciri/khas fragmen khas. Contoh nya pada tanaman purwoceng zat aktifnya stigmasterol, marker identitasnya germacron. Pada Cabe jawa zat aktifnya stigmasterol, marker identitas kapsaisin.

4. Bahan Baku Obat Bahan Alam yang digunakan disini adalah yang berasal dari tumbuh-tumbuhan baik dalam bentuk simplisia maupun ekstrak dan akan dilakukan adalah standarisasi bahan/produk dengan demikian yang digunakan adalah acuan stantar berupa buku-buku resmi yang mempunyai persyaratan di dalam monografinya, sehingga buku yang di rujuk bernama Buku Farmakope Herbal, Farmakope terbitan Nasional maupun Internasional.
5. Standar adalah satuan ukuran yang dipergunakan sebagai dasar pembandingan kualitas, kuantitas, nilai hasil karya yang dianggap nilainya tetap. Meskipun spesifikasi baik produk bahan maupun proses.
Standarisasi adalah serangkaian parameter prosedur cara dan hasil pengujian yang erat kaitannya dengan penetapan mutu, kimia, fisika dan biologi
Standarisasi Obat Herbal adalah rangkaian proses yang melibatkan berbagai metode analisis kimiawi berdasarkan data farmakologis, melibatkan analisis fisik dan mikrobiologi berdasarkan kriteria umum keamanan (toksikologis) terhadap suatu ekstrak alam (tanaman obat).

Rangkuman 1

Indonesia memiliki 30.000 spesies tumbuhan tingkat tinggi, 7000 spesies telah diketahui khasiatnya, 1000 spesies teridentifikasi dan kurang dari 300 spesies telah digunakan sebagai Bahan Baku Obat Tradisional (BBOT). Bahan baku yang dimaksud disini adalah dalam bentuk simplisia dan ekstrak. Dalam rangka meningkatkan mutu, keamanan dan khasiat Obat Tradisional salah satu langkah yang dilakukan adalah standarisasi bahan baku yang digunakan dalam memproduksi Obat Tradisional. Standarisasi suatu bahan baku adalah suatu persyaratan yang harus dipenuhi agar terwujudnya keberulangan (*reproducibility*) terhadap kualitas formula maupun terapeutik. Dalam upaya standarisasi tersebut perlu di tentukan persyaratan standar yang digunakan yang telah di tetapkan didalam Peraturan dan Perundang-undangan yang berlaku.

- a. Standarisasi dapat dilakukan secara fisika, kimia dan biologi (Parwata, 2017). Pada prinsipnya standarisasi Obat Tradisional dilakukan mulai dari bahan baku (simplisia. ekstrak) sampai dengan sediaan obat jadi. Berdasarkan hal inilah di kelompokkan menjadi 3 (tiga) yaitu: Standarisasi Bahan dapat berupa simplisia dan ekstrak terstandar merupakan bahan aktif yang diketahui kadarnya.
- b. Standarisasi Produk
Kandungan bahan aktif stabil atau tetap.
- c. Standarisasi Proses
Metode proses dan peralatan dalam pembuatan sesuai dengan Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik (CPOTB).

Pada standarisasi perlu ditentukan Persyaratan Standar yang diperlukan. Pada pelaksanaan standarisasi perlu dilakukan dengan berbagai metode (Pengujian Multifaktorial) (Purwata, 2017). Standarisasi simplisia di butuhkan karena kandungan kimia tumbuhan obat sangat bervariasi tergantung banyak faktor. Kandungan kimia yang dapat digunakan sebagai standar adalah kandungan kimia berkhasiat, atau kandungan kimia sebagai petanda (**marker**) atau miliki sidik jari (*finger fingerprint*) pada kromatogram.

Simplisia harus memenuhi parameter-parameter standar diantaranya kebenaran jenis, kontaminasi kimia, biologi dan stabilitas (dari segi wadah, penyimpan dan transportasi). Dalam bentuk ekstrak selain persyaratan monografi bahan baku (simplisia) diperlukan persyaratan mutu ekstrak terdiri dari beberapa parameter yang harus diukur atau dianalisis agar bahan obat atau sediaan obat dapat dijamin keamanannya dan sesuai dengan persyaratan Farmakope Indonesia maupun buku standar resmi lainnya. Parameter tersebut di kelompokkan menjadi dua, yaitu: Parameter Non Spesifik berfokus pada aspek kimia, mikrobiologi dan fisika yang akan mempengaruhi keamanan konsumen dan stabilitas.

Parameter Spesifik berfokus pada senyawa atau golongan senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktifitas farmakologinya. Pendekatan kualitas atau mutu obat tradisional dapat dilakukan dengan teknis analisis kimia modern menggunakan HPTLC (*High Performance Thin-Layer-Chromatography*), *Chromatography Gas* (GC), Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (*High Performance Liquid Chromatography*), *Capillary Electrophoresis* (ECE), *Mass Spectrometry* (MS), dan AAS (*Absorbance Atomic Spectrum*).

Tujuan Standarisasi menjamin keamanan, khasiat dan mutu obat bahan alam, menyeragamkan komposisi kandungan senyawa aktif (jenis dan kadar), yang konsisten, keseragaman dosis sehingga mempunyai efek yang dapat dipertanggung jawabkan. Menjamin obat bahan alam dari satu batch ke batch lainnya tetap ajeg atau sama (konstan) dosis dan stabilitasnya sehingga memberikan hasil uji klinik yang baik dan aman digunakan. Meningkatkan nilai ekonomi produk obat bahan alam. Mencegah pemalsuan, sehingga meningkatkan tingkat kepercayaan konsumen.

Penggunaan Obat Tradisional semakin meningkat seperti adanya kenaikan omzet, adanya pengembangan produk sehingga bahan baku (simplisia, ekstrak) maupun produknya harus dilakukan standarisasi sehingga menghasilkan bahan baku/sediaan obat tradisional yang aman, berkhasiat dan bermutu sehingga semakin di percaya di tingkat nasional maupun internasional

Tes Formatif 1

1. Indonesia merupakan negara yang kaya dengan bahan alam yang mempunyai 30.000 spesies tumbuhan tingkat tinggi. Diantaranya telah digunakan di industri/produsen Obat Tradisional sebagai bahan baku obat. Berapa jumlah spesies yang telah di manfaatkan oleh produsen?
 - a. 100 spesies

- b. 200 spesie
 - c. 300 spesies
 - d. 400 spesies
 - e. 500 spesies
2. Tujuan standarisasi Obat Bahan Alam adalah untuk menyeragamkan komposisi kandungan senyawa aktif baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Apa maksud dilakukan seperti ini?
- b. Efisien
 - c. Seragam
 - d. Efektif
 - e. Konsisten
 - f. Teratur
3. Obat yang berbasis herbal/Obat Tradisional yang beredar dipasaran sudah dijamin telah memenuhi persyaratan. Apa kriteria yang dimaksud?
- a. Aman, berkhasiat dan bermutu
 - b. Aman, bermanfaat dan bermutu
 - c. Aman, berkhasiat, bermanfaat dan bermutu
 - d. Aman, berkualitas dan berkhasiat
 - e. Aman, bermanfaat dan berkualitas.
4. Badan Pengawas Obat dan Makanan telah menerbitkan peraturan pengelompokan Obat Bahan Alam. Dikenal dengan kriteria bahan bakunya berupa ekstrak telah dilakukan uji standarisasi. Apa nama produk yang dimaksud?
- a. Produk Fitofarmak
 - b. Produk Jamu
 - c. Produk Jamu Gendong
 - d. Produk OHT
 - e. Produk Jamu Racikan
5. Seorang apoteker bekerja di Industri Obat Tradisional akan memproduksi obat dengan formula dari bahan ekstrak herba sambiloto sebagai obat membantu menurunkan gula darah. Apa nama senyawa markernya?
- a. Rutin
 - b. Kuersetin
 - c. Apigenin
 - d. Capsaicin
 - e. Andrographolide

Jawaban Tes Formatif 1

1. C
2. D
3. A
4. D
5. E

MATERI 2: KONSEP STANDARDISASI

Metode Pembelajaran	Estimasi Waktu	CPMK
<ul style="list-style-type: none"> • Kuliah Interaktif • Diskusi • <i>Question Based Learning</i> 	150 menit	<ul style="list-style-type: none"> • Perkenalan • Penjelasan • Perkuliahan & Kontrak Perkuliahan

2.1. Pendahuluan

Pengembangan obat tradisional dalam beberapa tahun terakhir meningkat secara drastis. Namun, dalam pengembangannya perlu adanya peraturan yang dapat membantu dalam menentukan kualitas. Pemerintah melalui Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia mengatur berbagai aspek dalam pengendalian mutu simplisia dan ekstrak sebagai bahan baku obat tradisional. Hakikatnya, standardisasi dilakukan pada bahan baku simplisia dan ekstrak agar diperoleh bahan baku yang seragam sehingga tidak merubah efek farmakologinya (BPOM, 2005).

Tehnik yang dilakukan dalam standardisasi obat herbal yakni metode organoleptik, botanical (makroskopis dan mikroskopis), fisika, kimia serta biologi. Pemeriksaan organoleptik berupa pengamatan terhadap bentuk, warna, bau dan rasa. Pemeriksaan makroskopis dengan mengamati tekstur dan organoleptik simplisia dan ekstrak, sedangkan pemeriksaan mikroskopis yaitu pengamatan dengan membuat penampang melintang kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya dengan beberapa perbesaran. Pemeriksaan fisika-kimia mencakup penetapan kadar air, kadar abu, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol (BPOM, 2019).

Simplisia merupakan bahan alami yang dipergunakan untuk tujuan pengobatan yang belum mengalami perubahan apapun kecuali dinyatakan lain, bahan yang sudah dikeringkan (Depkes, 1995). Menurut KemenkesRI (FHI Ed II, 2017) Simplisia merupakan bahan alam yang digunakan untuk tujuan pengobatan dan belum mengalami pengolahan apapun, bahan yang telah dikeringkan dibawah sinar matahari, diangin-anginkan atau menggunakan oven pada suhu tidak lebih dari 60°C, sedangkan simplisia segar adalah bahan alam segar yang digunakan untuk tujuan pengobatan dan belum dikeringkan. Serbuk simplisia merupakan bentuk serbuk simplisia dengan ukuran derajat kehalusan tertentu. Serbuk bisa berupa sangat kasar, kasar, sedikit kasar, halus dan sangat halus. Adapun penggolongan simplisia sebagai berikut :

- a. Simplisia nabati : dapat berupa tumbuhan utuh, bagian tanaman ataupun eksudat tanaman (Kemenkes RI, 2017).
- b. Simplisia hewani : dapat berupa hewan utuh atau zat-zat berguna yang dihasilkan dari hewan, misalnya : madu (*Meldepuratum*), minyak ikan (*Oleum iecoris asselli*).

c. Simplisia pelican/mineral : dapat berupa bahan pelican atau mineral baik yang belum maupun sudah diolah dengan menggunakan cara sederhana, misalnya : serbuk seng, serbuk tembaga (Gunawan dan Mulyani, 2010).

Simplisia yang dibuat harus memenuhi persyaratan tertentu. Faktor-faktor yang mempengaruhi kualitas simplisia seperti bahan baku simplisia, proses pembuatan simplisia, cara mengemas dan menyimpan simplisia. Simplisia dapat bersumber dari tumbuhan liar dan tanaman budidaya. Tumbuhan liar merupakan tumbuhan yang tumbuh tanpa adanya campur tangan manusia, tumbuh dengan sendirinya tanpa dibudidaya baik dipekarangan, hutan, pagar atau tempat lain. Tumbuhan liar memiliki kualitas yang tidak tetap sehingga kurang baik dijadikan sebagai bahan baku simplisia, hal tersebut dikarenakan umur tumbuhan atau bagian tumbuhan yang dipanen tidak tepat dan berbeda, kemudian jenis tumbuhan jarang diperhatikan, dan lingkungan tumbuh yang berbeda sehingga mempengaruhi keseragaman kadar senyawa aktif pada simplisia yang dihasilkan.

Tanaman budidaya merupakan tanaman yang tumbuh dengan adanya campur tangan manusia, tanaman sengaja ditanam secara terencana agar meningkatkan mutu simplisia. Simplisia yang dihasilkan dari tanaman budidaya akan menghasilkan simplisia yang berkualitas, homogen, serta kandungan senyawa aktif yang tinggi. Tiga konsep yang perlu dipertimbangkan (dalam hal simplisia sebagai bahan baku awal dan produk siap dikonsumsi langsung) untuk menyusun parameter standar umum, yaitu :

- a. Simplisia sebagai bahan kefarmasian wajib memenuhi 3 parameter mutu umum suatu bahan (material), yakni : kebenaran jenis (identifikasi), kemurnian (simplisia bebas dari kontaminasi baik kimia dan biologis), serta aturan penstabilan (wadah, penyimpanan dan transportasi).
- b. Simplisia sebagai bahan dan produk yang dikonsumsi manusia dengan tujuan pengobatan, harus diupayakan memenuhi 3 paradigma (*quality, safety, efficacy*).
- c. Simplisia yang didalamnya mengandung senyawa kimia yang bertanggungjawab terhadap respon biologis harus mempunyai spesifikasi kimia, yaitu informasi komposisi (jenis dan kadar) senyawa kandungan.

Standardisasi simplisia adalah simplisia yang digunakan untuk tujuan pengobatan yang bahan bakunya harus memenuhi persyaratan yang tercantum pada monografi terbitan resmi Departemen Kesehatan (dalam hal ini Matera Medika Indonesia). Bagi produk yang langsung dikonsumsi seperti jamu terdapat persyaratan produk kefarmasian yang harus dipenuhi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Ekstrak merupakan sediaan cair, kental dan kering yang diperoleh dari hasil penyarian menggunakan pelarut dan cara yang sesuai, diluar pengaruh cahaya matahari langsung (KemenkesRI, 2014). Ekstrak cair diperoleh dari hasil ekstraksi langsung yang mengandung sebagian besar cairan penyari, kadar air didalamnya diperkirakan $\geq 30\%$. Ekstrak kental merupakan ekstrak yang diperoleh dari hasil pemekatan yang sebagian besar pelarutnya sudah diuapkan, kadar air didalamnya diperkirakan sekitar $\pm 5 - 30\%$. Ekstrak kering merupakan ekstrak yang diperoleh dari hasil pemekatan dan pengeringan

sehingga diperoleh ekstrak yang tidak mengandung cairan penyari, diperkirakan kadar air didalamnya $\leq 5\%$. Ekstrak tumbuhan obat yang dibuat dari simplisia nabati, sebagai :

- a. Bahan awal yang merupakan bahan baku obat yang diproses dengan teknologi fitofarmasi menjadi produk jadi.
- b. Bahan antara merupakan bahan baku obat yang masih dapat diproses kembali menjadi fraksi-fraksi, isolate tunggal, campuran dengan ekstrak lain.
- c. Bahan Produk jadi merupakan ekstrak yang terkandung didalam sediaan produk jadi dan siap digunakan.

Standardisasi ekstrak merupakan tahapan penentuan parameter kualitatif dan kuantitatif dari senyawa aktif, senyawa khas serta sifat kimianya yang terkandung didalam ekstrak. Suatu mutu ekstrak dipengaruhi oleh bahan baku (simplisia) karena sebelum mengalami pengolahan dan masuk kedalam proses tahapan pembuatan ekstrak, bahan baku harus distandardisasi. Berikut faktor-faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak (Ditjen POM RI, 2000):

1. Faktor Biologi

- a. Identitas jenis (spesies), jenis tumbuhan yang dilihat dari sudut keragaman hayati bisa dikonfirmasi ke informasi genetika sebagai faktor internal untuk validasi jenis.
- b. Lokasi tumbuhan asal merupakan factor eksternal. Lingkungan (tanah dan atmosfer), cuaca (temperature dan cahaya), serta materi (air, senyawa organik dan anorganik).
- c. Periode pemanenan hasil tumbuhan terkait dengan metabolisme pada tanaman (kapan proses biosintesa dan kapan senyawa tersebut dikonversi menjadi senyawa yang lain) sehingga diketahui waktu yang tepat senyawa kandungan mencapai kadar yang optimal.
- d. Penyimpanan bahan tumbuhan seperti ruang atau wadah yang digunakan untuk menyimpan dan diusahakan terhindar dari kontaminan untuk menjaga stabilitas bahan.
- e. Umur tanaman dan bagian yang digunakan.

2. Faktor Kimia

a. Faktor Internal

- Jenis senyawa aktif
- Komposisi kualitatif senyawa aktif
- Komposisi kuantitatif senyawa aktif
- Kadar total rata-rata senyawa aktif

b. Faktor Eksternal

- Metode Ekstraksi
- Perbandingan ukuran alat ekstraksi (diameter dan tinggi alat)
- Ukuran, kekerasan dan kekeringan bahan
- Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi

- Kandungan logam berat
- Kandungan pestisida

Senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak ditinjau dari asalnya yakni Pertama, senyawa kandungan asli dari tumbuhan awal yang mana senyawa tersebut memang sudah ada sejak tumbuhan tersebut hidup dan hasil analisa kimia pada ekstrak akan menunjukkan komposisi senyawa kandungan asli. Kedua, senyawa hasil perubahan dari senyawa asli ini dapat berubah tergantung dari sifat fisikokimia dari senyawa asli serta dilakukan ketika proses penstabilan mengalami kendala. Ketiga, senyawa kontaminasi (baik sebagai polutan maupun proses aditif) yakni senyawa eksogen yang tercampur dalam ekstrak dapat berasal dari kontaminan yang tidak bias dihindari atau residu dari proses. Keempat, senyawa hasil interaksi kontaminasi dengan senyawa asli atau senyawa perubahan.

Latihan 2

1. Apa yang dimaksud dengan simplisia?
2. Sebutkan 3 konsep yang harus dipertimbangkan dalam menyusun parameter standar umum simplisia!
3. Apa yang dimaksud dengan standardisasi simplisia?
4. Apa yang dimaksud dengan standardisasi ekstrak?
5. Sebutkan faktor apa saja yang mempengaruhi mutu ekstrak!

Jawaban 2

1. Simplisia merupakan bahan alami yang dipergunakan untuk tujuan pengobatan yang belum mengalami perubahan apapun kecuali dinyatakan lain, bahan yang sudah dikeringkan.
2. Jawaban :
 - a. Simplisia sebagai bahan kefarmasian wajib memenuhi 3 parameter mutu umum suatu bahan (material).
 - b. Simplisia sebagai bahan dan produk yang dikonsumsi manusia dengan tujuan pengobatan.
 - c. Simplisia yang didalamnya mengandung senyawa kimia yang bertanggungjawab terhadap respon biologis harus mempunyai spesifikasi kimia.
3. Standardisasi simplisia adalah simplisia yang digunakan untuk tujuan pengobatan yang bahan bakunya harus memenuhi persyaratan yang tercantum pada monografi terbitan resmi Departemen Kesehatan (dalam hal ini Materia Medika Indonesia).
4. Standardisasi ekstrak merupakan tahapan penentuan parameter kualitatif dan kuantitatif dari senyawa aktif, senyawa khas serta sifat kimianya yang terkandung didalam ekstrak.
5. Faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak meliputi faktor biologi (identitas jenis, lokasi tumbuh, periode pemanenan, penyimpanan bahan tumbuhan, umur dan bagian yang digunakan) dan faktor kimia (faktor internal dan faktor eksternal).

Rangkuman 2

Simplisia merupakan bahan alami yang dipergunakan untuk tujuan pengobatan yang belum mengalami perubahan apapun kecuali dinyatakan lain, bahan yang sudah dikeringkan. Menurut FHI Ed.II (2011) Simplisia merupakan bahan alam yang digunakan untuk tujuan pengobatan dan belum mengalami pengolahan apapun, bahan yang telah dikeringkan pada suhu tidak lebih dari 60 °C, sedangkan simplisia segar adalah bahan alam segar yang digunakan untuk tujuan pengobatan dan belum dikeringkan. Standardisasi simplisia adalah simplisia yang digunakan untuk tujuan pengobatan yang bahan bakunya harus memenuhi persyaratan yang tercantum pada monografi terbitan resmi Departemen Kesehatan (dalam hal ini Materia Medika Indonesia). Ekstrak merupakan sediaan cair, kental dan kering yang diperoleh dari hasil penyarian menggunakan pelarut dan cara yang sesuai, diluar pengaruh cahaya matahari langsung.

Ekstrak terbagi menjadi ekstrak cair, ekstrak kental dan ekstrak kering. Standardisasi ekstrak merupakan tahapan penentuan parameter kualitatif dan kuantitatif dari senyawa aktif, senyawa khas serta sifat kimianya yang terkandung didalam ekstrak.

Tes Formatif 2

1. Simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman disebut dengan
 - A. Simplisia
 - B. Simplisia Nabati
 - C. Eksudat Tanaman
 - D. Simplisia Hewani
 - E. Simplisia Pelikan
2. Ekstrak yang nanti merupakan bahan yang dapat diproses lagi menjadi fraksi-fraksi, isolat senyawa tunggal ataupun sebagai campuran dengan ekstrak lain. Maka ekstrak tersebut sebagai
 - A. Bahan jadi
 - B. Produk
 - C. Bahan antara
 - D. Bahan ruahan
 - E. Bahan baku
3. Mutu ekstrak dapat dipengaruhi oleh faktor kimia yang bersifat eksternal dan internal. Faktor internal yang paling berpengaruh dalam menimbulkan efek farmakologi adalah
 - A. Metode ekstraksi
 - B. Perbandingan ukuran alat ekstraksi
 - C. Kekerasan dan kekeringan bahan
 - D. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi
 - E. Kadar total rerata senyawa aktif dalam bahan
4. Pengelompokan ekstrak dapat didasarkan pada kandungan cairan penyari dan kadar air dalam ekstrak. Ekstrak kental adalah
 - A. Ekstrak yang mengandung sebagian besar cairan penyari dan kadar air $\geq 30\%$.
 - B. Ekstrak yang mengandung sebagian besar cairan penyari dan kadar air $\geq 5 - 30\%$.
 - C. Ekstrak yang sebagian besar cairan penyarinya sudah diuapkan dan kadar air $\geq 5 - 30\%$.
 - D. Ekstrak yang sudah tidak mengandung cairan penyari dan kadar air $\geq 5 - 30\%$.
 - E. Ekstrak yang sudah tidak mengandung cairan penyari dan kadar air $\leq 5\%$.

5. Sediaan yang diperoleh dengan cara menyari senyawa aktif dari bahan nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai merupakan definisi dari
- A. Marker
 - B. Ekstrak
 - C. Simplisia
 - D. Obat tradisional
 - E. Fraksi

Jawaban Test Formatif 2

- 1. B
- 2. C
- 3. E
- 4. C
- 5. B

MATERI 3: BAHAN BAKU OBAT BAHAN ALAM

Metode Pembelajaran	Estimasi Waktu	CPMK
<ul style="list-style-type: none"> • Kuliah Interaktif • Diskusi • <i>Question Based Learning</i> 	150 menit	<ul style="list-style-type: none"> • Perkenalan • Penjelasan • Perkuliahan & Kontrak Perkuliahan

3.1. Pendahuluan

3.1.1. Tahapan Pembuatan Simplisia

Bahan baku obat tradisional sebagian besar berupa tanaman obat. Tumbuhan obat akan mengalami beberapa tahapan pasca panen sebelum menjadi simplisia. Tahapan pembuatan simplisia adalah sebagai berikut :

A. Pengumpulan bahan baku

Bahan baku yang dikumpulkan harus diperhatikan karena kadar senyawa aktif yang terkandung didalam simplisia akan bergantung pada beberapa hal seperti bagian tanaman yang digunakan, umur atau usia tanaman, waktu panen hingga lingkungan tempat tumbuh. Misalnya biji *Parkia roxbargii* (kedawung) yang waktu panennya dilakukan sebelum biji kering benar. Bagian kulit batang pada *Cinchona succirubra* (Kina) yang dipanen menjelang musim kemarau atau umur idealnya lebih kurang 12 tahun, karena pada waktu tersebut tidak mengganggu pertumbuhan. Rimpang dipanen saat bagian atas tanaman mengering.

Keanekaragaman senyawa kandungan pada produk hasil panen tumbuhan obat dipengaruhi oleh genetik (bibit), lingkungan (tempat tumbuh, perlakuan selama masa tumbuh, iklim), rekayasa agronomi (*fertilizer*, perlakuan selama masa tumbuh) dan panen (waktu, pasca panen).

B. Sortasi basah

Proses ini dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan kotoran dan bahan asing dari simplisia seperti membersihkan tanah dari simplisia sehingga mengurangi kontaminasi mikrobiologi.

C. Pencucian

Pencucian dilakukan dengan menggunakan air bersih (PAM, sumur, air dari mata air) yang mengalir.

D. Perubahan bentuk (perajangan)

Beberapa jenis simplisia harus harus diubah menjadi bentuk lain misalnya irisan, potongan atau serutan. Proses ini dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan hingga penggilingan simplisia. Tanaman yang telah dipanen sebaiknya langsung dijemur dalam keadaan utuh selama 1 hari. Perajangan dilakukan dengan

menggunakan pisau atau mesin rajang khusus agar diperoleh ukuran potongan yang seragam.

E. Pengeringan

Pengeringan dilakukan dengan tujuan mengurangi kadar air untuk memperoleh simplisia yang tidak mudah rusak agar dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Kadar air yang berkurang mampu menghentikan proses enzimatik yang dapat mencegah menurunnya kualitas simplisia. Pengeringan simplisia dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu cara alamiah dan cara buatan. Pengeringan dilakukan pada suhu 30 – 90 °C dimana suhu pengeringan terbaik adalah 60 °C. Jika simplisia tidak tahan terhadap pemanasan atau mudah menguap maka suhu pengeringan harus serendah mungkin (30 – 45 °C) atau dapat menggunakan pengeringan vakum.

Pengeringan dengan cara alamiah dapat dilakukan dengan panas sinar matahari langsung yang diperuntukan untuk bagian tanaman yang keras seperti kayu, kulit kayu, biji dan senyawa aktif yang terkandung didalamnya stabil terhadap pemanasan. Kemudian pengeringan dengan cara diangin-anginkan untuk simplisia yang sifatnya lunak seperti daun, bunga, buah atau bahan yang mengandung senyawa aktif yang mudah menguap.

Pengeringan cara buatan menggunakan alat atau mesin pengering yang mana suhu, kelembapan, tekanan dan aliran udaranya dapat diatur. Prinsipnya udara dipanaskan oleh suatu sumber panas seperti lampu, kompor mesin listrik atau diesel, udara panas kemudian dialirkan oleh kipas kedalam ruangan atau almari yang terdapat bahan yang akan dikeringkan. Proses ini memiliki kelebihan yakni simplisia yang diperoleh mempunyai mutu yang lebih baik karena pengeringan lebih merata dan waktu pengeringan lebih cepat tanpa dipengaruhi oleh kondisi cuaca.

F. Sortasi kering

Proses ini merupakan tahapan akhir pembuatan simplisia yang dilakukan sebelum pengepakan, tujuannya adalah untuk menghilangkan benda asing seperti bagian tanaman lain yang tidak diperlukan, pengotor yang masih ada, atau tertinggal pada simplisia kering.

G. Pengepakan dan Penyimpanan

Tahapan ini merupakan langkah akhir setelah pengeringan dan sortasi kering. Tujuannya untuk menempatkan simplisia didalam wadah tersendiri agar tidak saling bercampur antara satu simplisia dengan simplisia yang lain dan terhindar dari kontaminasi dari serangga dan mikroba. Bahan untuk mengepak dan menyimpan simplisia sebaiknya bahan yang kedap air dan udara, bersifat inert (netral) agar tidak bereaksi dengan simplisia, mencegah terjadinya kerusakan mekanis dan fisiologis dan mudah digunakan, tidak terlalu berat dan harganya relatif murah. Simplisia yang dikemas dan disimpan diberi label atau etiket agar informasi simplisia jelas.

Tahap selanjutnya adalah penyerbukan simplisia (pembuatan serbuk simplisia). Tahap penyerbukan simplisia menggunakan alat tertentu hingga didapatkan derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak karena semakin halus serbuk simplisia maka proses ekstraksi makin efektif dan efisien, akan tetapi makin halus

serbuk maka proses filtrasi akan semakin rumit. Selama penggunaan alat untuk proses penyerbukan, gerakan dan interaksi dengan logam dan lain-lain maka akan timbul panas (kalori) dan dapat mempengaruhi senyawa dalam simplisia (Ditjen POM RI, 2000).

Setelah suatu bahan baku obat tradisional melalui proses pengeringan dan pengecilan ukuran maka dilanjutkan dengan tahap ekstraksi. Tahap ekstraksi dilakukan untuk memisahkan dan mengambil senyawa metabolit sekunder sehingga kita dapat memperoleh manfaat dari senyawa metabolit sekunder tersebut. Ekstraksi adalah tahapan utama dalam pengolahan bahan alam untuk berbagai tujuan terutama untuk bahan baku obat. Ekstraksi atau proses penyarian adalah pemisahan senyawa dari simplisia dengan menggunakan cairan penyari/pelarut yang sesuai (Julianto, 2019).

Cairan penyari/pelarut dalam proses ekstraksi memainkan peranan penting. Pemilihan pelarut dalam proses ekstraksi disesuaikan dengan sifat kimia dan fisika dari bahan baku maupun senyawa target (metabolit sekunder) yang akan disari. Pelarut yang baik adalah pelarut yang dapat menarik senyawa target dengan optimal dan dapat memisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan (Nugroho, 2017).

Ada banyak jenis cairan penyari/pelarut yang dapat digunakan dalam ekstraksi. Cairan pelarut organik yang dapat digunakan untuk ekstraksi bahan alam antara lain heksan, petroleum eter, butanol, kloroform, diklometana, etil asetat, aseton, metanol, etanol dan akuades. Setiap pelarut memiliki sifat yang berbeda-beda dalam polaritas, titik didih, viskositas dan kelarutan dalam air (Ditjen POM RI, 2000; Hanani, 2016). Faktor utama untuk mempertimbangkan pemilihan cairan pelarut adalah :

- a. Selektivitas
- b. Kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut
- c. Ekonomis
- d. Ramah lingkungan
- e. Keamanan

Berdasarkan kebijakan dan peraturan pemerintah maka cairan pelarut harus memenuhi syarat kefarmasian (pharmaceutical grade). Hingga saat ini cairan pelarut yang diperbolehkan adalah air dan etanol (alkohol) serta campurannya. Jenis pelarut lain seperti metanol dll (alkohol turunannya), heksana dll (hidrokarbon alifatik), toluen dll (hidrokarbon aromatik), kloroform (dan segolongannya) dan aseton umumnya digunakan dalam tahap separasi dan pemurnian (fraksinasi). Khusus untuk metanol karena sifatnya toksik akut dan kronik maka penggunaannya dihindari. Metanol sebenarnya adalah pelarut yang lebih baik daripada etanol sehingga jika pelarut metanol digunakan maka harus dilakukan uji sisa pelarut dalam ekstrak (Ditjen POM RI, 2000).

3.1.2. Ekstraksi

Proses ekstraksi dapat dilakukan dengan beberapa macam metode. Masing-masing metode memiliki kelebihan dan kekurangan. Pemilihan metode harus memperhatikan sifat senyawa, pelarut yang digunakan dan alat yang tersedia. Struktur setiap senyawa,

suhu dan tekanan adalah faktor yang harus diperhatikan dalam melakukan ekstraksi. Beberapa metode yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah :

A. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut, meliputi :

1) Cara dingin

- a. Maserasi : adalah metode ekstraksi dengan cara merendam simplisia dengan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu kamar. Metode ini dapat meminimalkan kerusakan atau degradasi metabolit. Metode ini menggunakan suatu bejana maserator yang tertutup. Pada maserasi akan terjadi proses keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel sehingga diperlukan pergantian pelarut secara berulang atau remaserasi yaitu pengulangan perendaman setelah penyaringan maserat pertama.
- b. Perkolasi : adalah metode ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru yaitu dengan cara mengalirkan pelarut melalui simplisia hingga senyawa tersari sempurna dalam suatu alat perkolator. Metode ini membutuhkan jumlah pelarut yang lebih banyak dan waktu yang lama.

2) Cara panas

- a. Refluks : adalah metode ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Untuk mendapatkan hasil penyarian yang sempurna proses refluks dapat dilakukan 3 – 6 kali.
- b. Sokletasi : adalah metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut organik yang selalu baru pada suhu didih dan umumnya digunakan alat khusus yaitu alat soklet sehingga terjadi ekstraksi kontinue dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Ekstraksi ini dikenal dengan ekstraksi sinambung. Pada sokletasi simplisia dan ekstrak berada dalam labu yang berbeda, pemanasan mengakibatkan pelarut menguap dan uap masuk dalam labu pendingin. Hasil kondensasi akan jatuh pada simplisia sehingga ekstraksi akan berlangsung kontinue dengan jumlah pelarut yang relatif konstan.
- c. Digesti : adalah maserasi kinetik yaitu dengan pengadukan kontinue pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruangan (40 – 50 °C)
- d. Infusa : adalah metode ekstraksi menggunakan pelarut air dengan suhu 96 – 98 °C selama 15 – 20 menit (dihitung setelah suhu 96 °C tercapai). Bejana infusa tercelup dalam penangas air. Cara ini sesuai untuk simplisia yang bersifat lunak seperti bunga atau daun
- e. Dekok : adalah metode ekstraksi yang mirip dengan infusa, dengan menggunakan waktu yang lebih lama yaitu 30 menit dan suhunya mencapai titik didih air.

B. Destilasi (penyulingan)

Metode ekstraksi untuk menyari atau menarik senyawa yang ikut menguap bersama air sebagai pelarut. Metode ini umum digunakan untuk menyari minyak atsiri. Pada proses destilasi, simplisia tidak tercelup pada air yang mendidih, tetapi dilewati uap air sehingga senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi. Pada proses

pendinginan, senyawa dan uap air akan terkondensasi dan terpisah menjadi destilat air dan senyawa yang diekstraksi.

C. Ekstraksi modern

a. Ultrasonik adalah metode ekstraksi yang melibatkan penggunaan getaran ultrasonik dengan frekwensi 20 – 2000 kHz. Getaran ultrasonik ini akan meningkatkan permeabilitas dinding sel dan isi sel akan keluar.

b. Gelombang mikro (*Microwave Assited Extraction*, MAE) adalah metode ekstraksi yang menggunakan gelombang mikro (2450 MHz). Metode ini lebih hemat dari segi waktu dan pelarut jika dibandingkan dengan metode konvensional seperti maserasi. Ekstraksi gelombang mikro merupakan ekstraksi yang selektif dan digunakan untuk senyawa yang memiliki dipol polar

D. Ekstraksi gas superkritis (*Supercritical Gas Extraction*, SGE)

Metode ekstraksi menggunakan CO₂ dengan tekanan tinggi. Penggunaan karbondioksida dalam metode ini karena CO₂ bersifat inert, toksisitas rendah, aman buat lingkungan, harga terjangkau dan tidak mudah terbakar pada kondisi superkritisnya. Metode ini biasanya digunakan untuk mengekstraksi minyak atsiri dan senyawa yang bersifat mudah menguap atau termolabil (Ditjen POM RI, 2000; Hanani, 2016).

Ekstrak hasil proses ekstraksi yang masih banyak mengandung cairan penyari dapat dipisahkan dengan proses penguapan/pemekatan (evaporasi). Hal ini bertujuan untuk memperoleh ekstrak yang lebih pekat dan konsentrasi senyawa lebih besar. Pemekatan ekstrak akan lebih memudahkan dalam proses penyimpanan ekstrak. Prinsip proses penguapan adalah menghilangkan sebagian pelarut atau seluruh pelarut dengan pemanasan dan suhu yang digunakan tidak terlalu tinggi untuk mencegah terurainya senyawa dalam ekstrak. Proses penguapan dapat menggunakan alat yang sederhana seperti penangas air (waterbath), cara ini lebih mudah dan dapat digunakan untuk menguapkan cairan penyari yang titik didihnya tidak terlalu tinggi, akan tetapi proses pemekatan ini memerlukan waktu yang lebih lama. Alat lain yang digunakan untuk penguapan adalah oven, penggunaan alat ini biasanya digunakan untuk penguapan yang kadar cairannya tidak banyak. Penggunaan oven memiliki kelebihan karena suhu dapat diatur sesuai dengan titik didih larutan penyari. Saat ini proses penguapan lebih banyak menggunakan alat penguap putar (*rotary evaporator*). Kelebihan alat ini adalah proses penguapan berlangsung lebih cepat, alat ini bekerja pada suhu 40 – 50 °C sehingga kerusakan senyawa yang bersifat termolabil dapat dihindari (Hanani, 2016).

Untuk menjamin stabilitas senyawa dalam ekstrak maka ekstrak kental yang diperoleh dari proses penguapan dapat dilanjutkan dengan proses pengeringan dan didapatkan ekstrak kering. Pengeringan dapat dilakukan dengan alat pengering vakum, pengering beku (*freeze dryer*) dan pengering semprot. Pengering beku menggunakan suhu rendah atau beku dan waktu yang digunakan lebih lama. Pengering semprot menggunakan suhu tinggi sehingga tidak aman untuk senyawa yang bersifat termolabil. Cara pengeringan yang lebih sederhana adalah menggunakan penangas air dan aliran

udara panas, akan tetapi cara ini tidak dapat dilakukan untuk ekstrak yang cairan penyaringnya adalah air (Hanani, 2016).

Separasi dan pemurnian adalah proses untuk memisahkan (menghilangkan) senyawa yang tidak dikehendaki tanpa mempengaruhi senyawa kandungan yang dikehendaki sehingga akan diperoleh ekstrak yang lebih murni. Proses pada tahap ini adalah pengendapan, pemisahan dua cairan tak tercampur, sentrifugasi, dekantasi, filtrasi serta proses adsorpsi dan penukar ion (Ditjen POM RI, 2000).

Cara pemisahan dapat dilakukan untuk analisis fitokimia kualitatif ataupun kuantitatif. Pemilihan metode pemisahan harus memperhatikan sifat senyawa yang akan dipisahkan. Tahap pemisahan awal adalah ekstraksi cair-cair (fraksinasi), umumnya untuk memisahkan golongan senyawa berdasar polaritas. Metode ini menggunakan alat yang sederhana yaitu corong pisah dan menggunakan 2 pelarut yang tak tercampur, contohnya pelarut polar (air) dengan non polar (heksana) (Hanani, 2016).

Latihan 3

1. Sebutkan tahapan penanganan simplisia!
2. Apa yang dimaksud ekstrak dan ekstraksi?
3. Sebutkan faktor yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan larutan penyari!
4. Sebutkan macam metode ekstraksi dengan pelarut dan jelaskan prinsipnya!
5. Apa prinsip penguapan ekstrak dan apa tujuannya?

Jawaban 3

1. Tahapan pembuatan simplisia adalah pengumpulan bahan baku, sortasi basah, pencucian, pengubahan bentuk, pengeringan, sortasi kering dan pengepakan dan penyimpanan.
2. Ekstrak adalah hasil dari proses ekstraksi.
Ekstraksi adalah pemisahan senyawa dari simplisia dengan menggunakan cairan penyari/pelarut yang sesuai.
3. Faktor yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan larutan penyari adalah :
 - a. Selektivitas
 - b. Kemudahan bekerja dan proses dengan cairan penyari tersebut
 - c. Ekonomis
 - d. Ramah lingkungan
 - e. Keamanan
4. Metode ekstraksi terbagi menjadi:
Ekstraksi dengan menggunakan pelarut, meliputi :
 - a. Cara dingin
 1. Maserasi : prinsipnya adalah ekstraksi dengan merendam simplisia dengan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu kamar.
 2. Perkolasi : prinsipnya adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru dengan cara mengalirkan pelarut melalui simplisia hingga senyawa tersari sempurna.
 - b. Cara panas
 1. Refluks : prinsipnya adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
 2. Sokletasi : prinsipnya adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru pada suhu didih, dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
 3. Digesti : prinsipnya adalah maserasi kinetik yaitu dengan pengadukan kontinue pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruangan (40 – 50 °C)
 4. Infusa : prinsipnya adalah ekstraksi menggunakan pelarut air dengan suhu 96 – 98 °C selama 15 – 20 menit
 5. Dekok : prinsipnya mirip dengan infusa, tetapi waktu yang digunakan lebih lama yaitu 30 menit dan suhunya mencapai titik didih air.
5. Prinsip penguapan ekstrak adalah menghilangkan sebagian pelarut atau seluruh pelarut dengan pemanasan dan suhu yang digunakan tidak terlalu tinggi. Tujuan dilakukan

penguapan adalah untuk mendapatkan ekstrak yang lebih pekat dan konsentrasi senyawa menjadi lebih besar.

Rangkuman 3

Bahan baku obat tradisional sebagian besar adalah berupa tanaman obat. Tumbuhan obat akan mengalami beberapa tahapan pasca panen sebelum menjadi simplisia. Tahapan pembuatan simplisia adalah sebagai berikut : pengumpulan bahan baku, sortasi basah, pencucian, perubahan bentuk, pengeringan, sortasi kering, pengepakan dan penyimpanan.

Tahap selanjutnya adalah penyerbukan simplisia (pembuatan serbuk simplisia) dan dilanjutkan dengan tahap ekstraksi. Ekstraksi atau proses penyarian adalah pemisahan senyawa dari simplisia dengan menggunakan cairan penyari/pelarut yang sesuai. Pemilihan pelarut dalam proses ekstraksi disesuaikan dengan sifat kimia dan fisika dari bahan baku maupun senyawa target (metabolit sekunder) yang akan disari, dapat menarik senyawa target dengan optimal dan dapat terpisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan. Faktor utama untuk mempertimbangkan pemilihan cairan pelarut adalah selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan dan aman.

Proses ekstraksi dapat dilakukan dengan beberapa macam metode. Beberapa metode yang digunakan dalam proses ekstraksi antara lain ekstraksi dengan menggunakan pelarut, destilasi (penyulingan) dan ekstraksi modern.

Hasil dari proses ekstraksi adalah ekstrak. Ekstrak hasil proses ekstraksi yang masih banyak mengandung cairan penyari dapat dipekatkan dengan proses penguapan/pemekatan (evaporasi) dan dilanjutkan dengan proses pengeringan.

Tes Formatif 3

1. Pengeringan alamiah dapat dilakukan dengan cara mengeringkan dibawah sinar matahari langsung. Proses pengeringan ini tepat untuk simplisia
 - A. Buah
 - B. Akar
 - C. Daun
 - D. Bunga
 - E. Kayu
 2. Pemilihan cairan penyari untuk proses ekstraksi harus sesuai dengan syarat kefarmasian. Berikut adalah cairan penyari yang baik untuk ekstraksi tetapi bersifat toksik sehingga perlu dilakukan uji sisa pelarut jika akan digunakan
- A. Air
 - B. Etanol 96%
 - C. Etanol 70%
 - D. Metanol

- E. Alkohol
3. Sejumlah serbuk daun direndam dengan suatu cairan penyari dan sesekali dilakukan pengadukan. Proses ekstraksi tersebut menunjukkan metode ekstraksi
- A. Maserasi
 - B. Perkolasi
 - C. Sokletasi
 - D. Refluks
 - E. Ultrasonik
4. Suatu sampel bahan alam diekstraksi menggunakan pelarut air dengan suhu 100 °C dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi adalah 30 menit. Metoda ekstraksi yang digunakan adalah
- A. Refluks
 - B. Infusa
 - C. Dekok
 - D. Penyulingan
 - E. Ultrasonik
5. Untuk meningkatkan konsentrasi senyawa dalam ekstrak tanpa membuat ekstrak menjadi kering dapat dilakukan dengan suatu alat yang bekerja pada suhu 50 °C yang dibantu oleh alat vakum udara. Alat yang dimaksud adalah
- A. *Freeze dryer*
 - B. *Spray dryer*
 - C. *Vacuum rotary evaporator*
 - D. *Vacuum rotary evaporator*
 - E. Oven

Jawaban Tes Formatif 3

- 1. E
- 2. D
- 3. A
- 4. C
- 5. C

Modul 4 :
Standardisasi dan Penentuan Marker
Obat Bahan Alam

Metode Pembelajaran	Estimasi Waktu	CPMK
<ul style="list-style-type: none"> • Kuliah Interaktif • Diskusi • <i>Question Based Learning</i> 	150 menit	CPMK-3: Mampu menerapkan pengetahuan dan pemanfaatan Obat Bahan Alam yang aman, bermutu dan bermanfaat; (CPL-3)

4.1. Pendahuluan

4.1.1. Pengertian Standardisasi

(*Tiga Standarisasi Obat Herbal*, 2021) menuliskan bahwa dalam rangka meningkatkan mutu, keamanan dan manfaat obat tradisional, serta untuk melindungi konsumen ditegakkan trilogi “mutu, keamanan, manfaat”. Standarisasi suatu sediaan obat tradisional adalah suatu persyaratan yang harus dipenuhi agar terwujudnya keberulangan terhadap kualitas formula maupun terapeutik. Standarisasi suatu sediaan obat tradisional tidak sulit jika senyawa aktif diketahui sehingga dapat digunakan untuk membantu menentukan kualitas bahan obat. Pada prinsipnya standarisasi obat tradisional dilakukan mulai dari bahan baku sampai dengan sediaan jadi. Berdasarkan hal tersebut, standarisasi dikelompokkan menjadi 3, yaitu :

- Standardisasi Bahan : Sediaan bisa berupa simplisia atau ekstrak terstandar/bahan aktif yang diketahui kadarnya.
- Standarisasi Produk : Kandungan bahan aktif tetap/stabil
- Standarisasi Proses : Metode proses dan peralatan dalam pembuatan sesuai dengan Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik (CPOTB).

4.1.2. Kontrol Kualitas Obat Bahan Alam (Ravindra *et al.*, 2018)

Kontrol kualitas untuk efikasi dan keamanan produk herbal sangat penting. Kualitas dapat didefinisikan sebagai status obat yang ditentukan oleh identitas, kemurnian, kandungan, dan bahan kimia lainnya, sifat fisik atau biologis, atau oleh proses pembuatannya. Kontrol kualitas adalah istilah yang mengacu pada proses yang terlibat dalam menjaga kualitas dan validitas produk yang diproduksi. Pengendalian mutu didasarkan pada tiga definisi penting pada farmakope, yaitu identitas, kemurnian, dan konten atau pengujian.

a. Identitas

Identitas dapat dilihat dengan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Jika ada suatu penyakit pada suatu tumbuhan dapat menyebabkan perubahan pada tampilan fisik tumbuhan dan menyebabkan kesalahan identifikasi.

b. Kemurnian

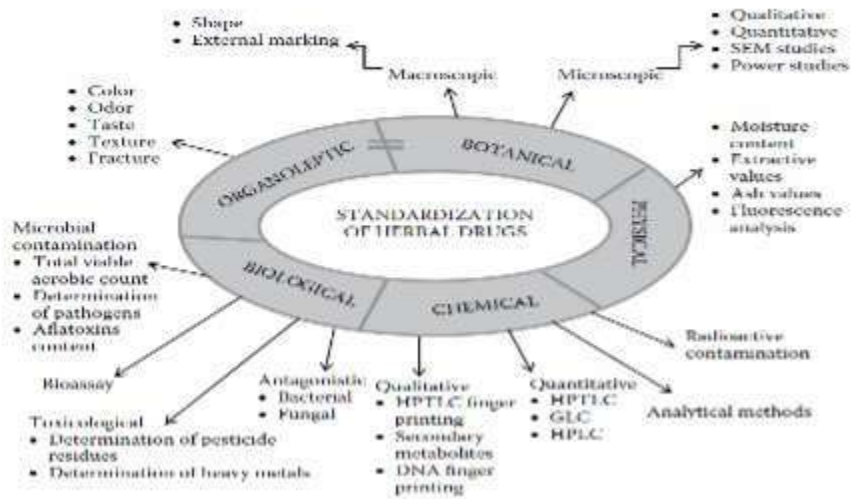
Kemurnian terkait erat dengan penggunaan obat-obatan yang aman dan berkaitan dengan faktor-faktor seperti nilai abu, kontaminan (misalnya ada benda asing dalam bentuk tumbuhan lain), dan logam berat. Namun, karena penerapan metode analisis yang lebih baik, evaluasi kemurnian modern juga mencakup kontaminasi mikroba, aflatoxin, radioaktivitas, dan residu pestisida. Metode analisis seperti analisis fotometrik (UV, IR, MS, dan NMR), kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), dan kromatografi gas (GC) dapat digunakan untuk menetapkan komposisi yang konstan dari sediaan herbal.

c. Kandungan atau Pengujian

Kandungan adalah properti yang paling sulit untuk dinilai, karena umumnya jamu mempunyai kandungan aktif yang tidak diketahui. Kadang-kadang penanda (*marker*) dapat digunakan berdasarkan definisi, kontrol kandungan dapat ditentukan secara kimiawi, terlepas dari apakah penanda memiliki aktivitas terapeutik atau tidak. Untuk membuktikan identitas dan kemurnian, kriteria seperti jenis sifat sensorik preparasi, konstanta fisik, pemalsuan, kontaminan, kelembaban, kadar abu, dan residu pelarut harus diperiksa. Identitas yang benar dari bahan baku herbal, atau kualitas nabati, sangat penting dalam membangun kendali mutu obat herbal (European Medicines Agency, 2011).

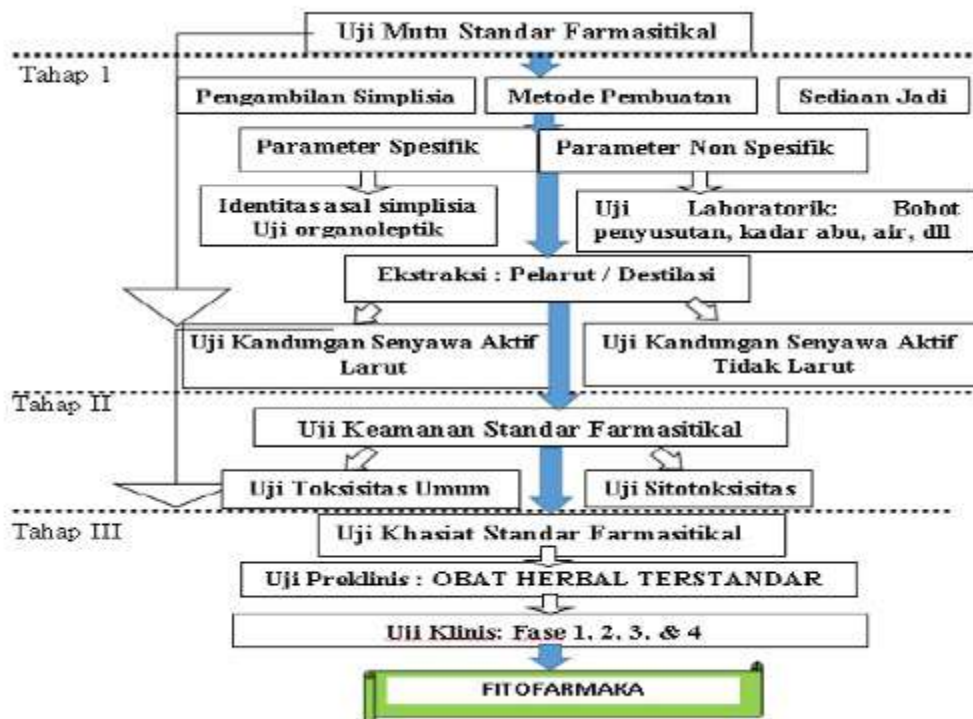
4.1.3. Standardisasi Formulasi Herbal

Standardisasi adalah proses evaluasi mutu dan kemurnian suatu obat herbal berdasarkan berbagai parameter seperti parameter morfologi, mikroskopis, dan fisik seperti kadar air, nilai abu, nilai ekstraktif, dan lain sebagainya, identifikasi, kimiawi, dan parameter biologi (Gambar 4.1). Standardisasi bahan baku herbal meliputi data tumbuhan obat, otentikasi tumbuhan, spesifikasi komposisi kimia dengan berbagai teknik kromatografi, dan penentuan aktivitas biologi seluruh tumbuhan. Obat herbal adalah berbagai macam bahan nabati termasuk daun, herba, akar, bunga, biji, kulit kayu, dan sebagainya. Spesifikasi yang komprehensif harus dikembangkan untuk setiap bahan herbal meskipun bahan awal pembuatan produk bahan alam adalah sediaan herbal (Ravindra *et al.*, 2018).



Gambar 4.1. Standardisasi Obat Herbal

Persyaratan mutu simplisia sejumlah tanaman tertera dalam buku Farmakope Indonesia, Ekstra Farmakope Indonesia, dan Materia Medika Indonesia. Standarisasi farmasitikal juga dilanjutkan dengan tahapan pengujian keamanan, pengujian khasiat preklinik (*in vitro* dan *in vivo*) serta pengujian klinik ke manusia menuju obat fitofarmaka yang dapat dipakai dipelayanan kesehatan (Yuslianti et al., 2016).



Gambar 4.2. Tahapan Standardisasi Bahan Alam Hingga Menjadi Fitofarmaka

Standarisasi obat bahan alam akan menuju kepada sediaan fitofarmaka dalam pengembangan obat tradisional di Indonesia. Fitofarmaka adalah produk yang mengandung bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian/galenik atau campuran dari bahan tersebut yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinik dan uji klinik, serta bahan baku dan produk jadinya telah distandarisasi (BPOM, 2019).

Sediaan dengan khasiat klinis yang lebih baik harus dipilih. Setelah semua parameter fisik, kimia dan farmakologi rutin harus diperiksa untuk semua batch untuk memilih produk jadi akhir dan untuk memvalidasi seluruh proses produksi (Mukherjee, 2019). Parameter kestabilan formulasi herbal yang meliputi parameter fisika, kimia, dan mikrobiologi adalah sebagai berikut:

- a. Parameter fisika meliputi warna, bau, kenampakan, kejernihan, viskositas, kadar air, pH, waktu hancur, kerapuhan, kekerasan, daya alir, flokulasi, sedimentasi, laju pengendapan, dan nilai abu.
- b. Parameter kimia meliputi uji batas, uji kimia, uji kimia, dan sebagainya. Analisis kromatografi tumbuhan dapat dilakukan dengan menggunakan KLT, HPLC, HPTLC, GC, UV, GC-MS fluorimetri, dan lain sebagainya.
- c. Parameter mikrobiologi meliputi total kandungan yang layak, jumlah kapang total, total enterobacteria, dan jumlah mereka. Pembatas dapat digunakan sebagai alat kuantitatif atau semi-kuantitatif untuk memastikan dan mengontrol jumlah pengotor, seperti reagen yang digunakan selama abstraksi berbagai tumbuhan, pengotor yang datang langsung dari bejana produksi dan dari pelarut, dan sebagainya.

4.2. Metode Standardisasi Obat Herbal

4.2.1. Metode Botani

1) Makroskopik

Identitas makroskopis tumbuhan obat meliputi bahan yang didasarkan pada bentuk, ukuran, warna, sifat permukaan, tekstur, dan potongan dari patahan kayu atau kulit kayunya. Dikenal juga sebagai evaluasi organoleptik berdasarkan studi tentang morfologi dan sensorik dari profil keseluruhan obat bahan alam. Permukaan retak pada kulit kayu kina, *quillai*, cascara, dan kayu *quassia* merupakan karakteristik penting. Bau aromatik buah *umbelliferous* dan rasa manis *licorice* adalah contoh dari jenis evaluasi ini di mana bau obat bergantung pada jenis dan kualitas prinsip bau (minyak atsiri) yang ada. Bentuk obatnya bisa silindris (*sarpsilla*), sub-silindris (*podophyllum*), kerucut (*aconite*), cerutu (*jalap*), dan sebagainya. Sedangkan ukuran melambangkan panjang, lebar, tebal, diameter, dan lain sebagainya.

Warna berarti warna luar yang bervariasi, dari putih hingga hitam kecoklatan dan merupakan karakteristik diagnostik yang penting. Penampilan secara umum (penandaan luar) dari berat obat mentah sering menunjukkan apakah obat tersebut kemungkinan besar akan memenuhi standar yang ditentukan, termasuk kerutan (kasar atau halus), annulasi (struktur cincin melintang), retakan (pecah), pembengkakan (hasil membulat), dan bekas

luka (bercak tersisa setelah daun, batang atau akar gugur). Rasa adalah jenis sensasi tertentu yang dirasakan oleh lapisan epitel lidah (World Health Organization, 2011). Rasa asam, asin (garam), manis (sakarín), pahit atau tidak memiliki rasa. Karakteristik makroskopis yang berbeda dari jamu adalah sebagai berikut :

a. Ukuran

Penggaris ukur dalam milimeter cukup untuk mengukur panjang, lebar, dan ketebalan bahan mentah herbal. Biji dan buah yang kecil dapat diukur dengan cara mensejajarkan 10 buah pada selembar kertas kalibrasi, dengan jarak antar garis 1 mm, dan membagi hasilnya dengan 10.

b. Warna

Warna sampel harus dibandingkan dengan warna sampel pada referensi. Periksa sampel tersebut di bawah cahaya matahari yang menyebar. Bisa juga menggunakan sumber cahaya buatan dengan panjang gelombang yang mirip dengan sinar matahari.

c. Karakteristik Permukaan, Tekstur, dan Karakteristik Retakan

Menggunakan lensa pembesar (6 – 10 kali perbesaran). Pembasahan dengan air atau reagen yang sesuai, mungkin diperlukan untuk mengamati karakteristik permukaan sampel yang dipotong. Sentuh sampel untuk menentukan apakah itu lunak atau keras. Membengkokkan dan memecahnya untuk mendapatkan informasi tentang kerapuhan dan tampilan bidang yang pecah, apakah itu berserat, halus, kasar, berbutir, dan sebagainya.

d. Bau

Pertama, tentukan kekuatan bau (tidak ada bau, berbau lemah, berbau berbeda, atau berbau kuat) dan kemudian sensasi bau (aromatik, seperti buah, apek, berjamur, tengik, dll.). Jika sampel tidak berbahaya, letakkan sebagian kecil sampel di telapak tangan atau di gelas kimia dengan ukuran yang sesuai dan perlahan dan berulang kali hirup udara di atas bahan tersebut. Jika tidak ada bau yang jelas tercium, hancurkan sampel di antara ibu jari dan jari telunjuk atau di antara telapak tangan menggunakan tekanan lembut. Jika sampel diketahui berbahaya, hancurkan dengan cara mekanis dan kemudian tuangkan sedikit air mendidih ke sampel yang dihancurkan dalam gelas kimia.

2) Mikroskopik

Metode ini digunakan untuk identifikasi obat pada tingkat sel. Melalui berbagai teknik mikroskopis, dilihat dari struktural dan penampilan seluler dari tumbuhan, diperiksa untuk menentukan asal tumbuhan dan menilai kualitasnya. Ini digunakan untuk menentukan struktur obat herbal secara terorganisir berdasarkan karakter histologisnya. Ini termasuk pemeriksaan secara keseluruhan, hanya bagian tertentu saja atau serbuk dari obat herbal mentah (Li et al., 2008). Kontrol kualitas jamu secara tradisional didasarkan pada penampilan dan saat ini evaluasi mikroskopis sangat diperlukan dalam identifikasi awal jamu, serta dalam mengidentifikasi fragmen kecil dari jamu mentah atau bubuk dan deteksi benda asing serta pada pemalsuan obat herbal. Metode ini berguna untuk mengidentifikasi spesies dari fragmen atau bubuk dan untuk membedakan spesies dengan karakter morfologi yang serupa, serta untuk mengevaluasi kualitas farmasetik dari jamu (Beringer *et al.*, 2005). Evaluasi yang utama secara visual, tidak cukup jika menggunakan

lensa pembesar sederhana, hanya dapat digunakan untuk memastikan bahwa tanaman dari spesies yang dibutuhkan, dan bagian tanaman sedang digunakan tersebut benar (Ruzin, 2000).

a. Pengujian Mikroskopik

Analisis mikroskopis diperlukan untuk menentukan spesies yang benar dan / atau ada bagian spesies yang benar. Penggunaan mikroskop untuk mengetahui identitas obat herbal yaitu otentikasi mikroskopis mengacu pada pengamatan struktur sel dan ciri-ciri internal dengan menggunakan mikroskop dan turunannya. Selain mikroskop cahaya biasa, mikroskop lain juga telah digunakan untuk meningkatkan akurasi otentikasi, seperti mikroskop cahaya terpolarisasi dan mikroskop fluoresensi. Penggunaan mikroskop ini memperluas jumlah fitur yang tersedia untuk digunakan dalam identifikasi (Liang et al., 2006). Kemajuan terbaru dalam mikroskop cahaya normal telah sangat meningkatkan kegunaannya dalam otentikasi obat-obatan herbal. Ekstraksi ciri dan pengukuran kesamaan serta penggunaan distribusi panjang tali telah digunakan secara efektif dalam klasifikasi butir pati. Ini memberikan akurasi dan fleksibilitas yang lebih besar dalam menangkap informasi tentang butiran pati yang berguna dalam otentikasi obat-obatan herbal (Chu et al., 2009).

Mikroskop fluoresensi mengungkapkan fluoresensi yang dipancarkan dari jaringan herbal di bawah penerangan. Banyak jaringan herbal, berdasarkan struktur kimianya atau metabolit sekundernya, memiliki kemampuan untuk memancarkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu mengikuti penyerapan cahaya dengan panjang gelombang yang lebih pendek dan energi yang lebih tinggi (Li et al., 2008). Rincian struktur sel dan susunan sel berguna untuk membedakan spesies yang serupa.

b. Peralatan

Gunakan mikroskop dengan mikrometer okuler untuk mengukur ukuran benda kecil. Skala harus dikalibrasi menggunakan mikrometer, yang terdiri dari slide kaca dengan ukuran biasa, skala diukir atau difoto, biasanya panjangnya 1 atau 2 mm, dalam perbedaan 0,1 dan 0,01 mm. Mikrometer okuler terdiri dari cakram kaca kecil, yang diameternya berskala 100 garis yang diukir atau difoto. Disk ditempatkan di lensa okuler. Sebuah mikroskop dilengkapi dengan bagian-bagian berikut:

- Lensa
Lensa menyediakan berbagai pembesaran dan berbagai kondensor, tahap mekanis bertingkat, sasaran dengan perbesaran $4\times$, $10\times$ dan $40\times$, dan warna filter kaca misalnya biru-hijau, titik mata pada lensa okuler yang tinggi lebih disukai untuk pemakai kacamata.
- Lampu : Lampu yang terpisah atau menjadi satu dengan mikroskop
- Mikrometer
Skala mikrometer dan ocular mikrometer dimasukan ke perbesaran $6\times$, ditempatkan di bagian diafragma atau bagian lain yg disukai pada lensa mata mikrometer.
- Bagian lainnya

Satu set filter polarisasi; satu set lampiran gambar untuk mikroskop; sebuah *microburner* (tipe Bunsen); *slide* dan kaca penutup ukuran standar dan satu set peralatan bedah tumbuhan.

c. Prosedur Standar Untuk Identifikasi Mikroskopis

Identifikasi mikroskopis digunakan untuk memeriksa bagian melintang atau membujur, serbuk, permukaan atau jaringan yang rusak dari obat herbal mentah tunggal dan / atau ramuan herbal yang dipasang pada slide kaca.

d. Persiapan Awal

Bagian tanaman yang dikeringkan mungkin memerlukan pelunakan sebelum persiapan menggunakan mikroskop, lebih disukai dengan ditempatkan di lingkungan yang lembab atau dengan merendamnya di dalam air. Untuk bahan dalam jumlah kecil, letakkan segumpal kapas yang dibasahi dengan air ke bagian bawah tabung reaksi dan tutup dengan selembur kertas saring. Letakkan bahan yang akan diperiksa di atas kertas, tutup tabungnya, dan diamkan semalaman atau sampai bahan tersebut lembut dan cocok untuk dipotong. Gunakan desikator untuk jumlah material yang lebih banyak, tempatkan air ke bagian bawah sebagai ganti agen pengering. Langkah-langkah berikut harus diterapkan untuk bahan yang berbeda:

- Kulit kayu, kayu, serta bahan padat dan keras lainnya biasanya perlu direndam dalam air, etanol, dan gliserol selama beberapa jam atau semalaman sampai cukup lunak untuk dipotong. Terkadang diperlukan untuk merebus dengan air mendidih selama beberapa menit.
- Semua kandungan yang larut dalam air dapat dikeluarkan dari sel dengan merendamnya di dalam air.
- Butir pati dapat dibuat gelatin dengan pemanasan dalam air. Dalam kasus tertentu, bahan dapat dibasahi dengan air selama beberapa menit untuk melembutkan permukaan dan memudahkan pemotongan bagian sampel yang dibutuhkan

e. Persiapan Spesimen

Spesimen yang berkualitas baik sangat penting untuk identifikasi mikroskopis. Metode pembuatan slide harus dipilih sesuai dengan sifat bahan yang ada dan tujuan penelitian.

f. Bagian Melintang

Ada empat metode utama untuk memasang penampang melintang :

- *Free hand mounting*

Ini digunakan untuk slide sementara. Dalam metode ini, bahan dipotong dengan pisau dan diiris halus dari kiri atas ke kanan bawah dalam satu gerakan. Hindari menggergaji secara maju mundur, jaga agar spesimen dan pisau tetap dilumasi dengan air

- *Glide mounting*

Metode ini menggunakan mesin seperti papan luncur, cocok untuk lignum, akar lignin, batang atau bahan padat lainnya. Alat ini dikenal sebagai mikrotom geser karena komposisi spesimen, pisau, *holder*, dan orientasi spesimen. Konstruksi yang kokoh memberikan kualitas yang memastikan hasil bagian yang sangat baik

dan dapat hasil yang sama jika dilakukan kembali. Ketebalan bagian dan kemiringan vertikal dan horizontal pisau dapat disesuaikan.

- *Cryology mounting*

Metode ini terutama digunakan untuk membuat slide jaringan hewan dan jaringan herbal yang segar dan muda. Potong sampel menjadi potongan-potongan kecil (berdiameter sekitar 1-2 cm) dan tempelkan dengan *cryomatrix* pada tempatnya (*cryocaste*), lalu dibekukan, dilanjutkan mengiris menggunakan mesin, pasang pada slide kaca dan segel.

- *Paraffin mounting*

Metode ini melibatkan penyematan spesimen dalam parafin, kemudian mengiris blok nya. Langkah-langkahnya antara lain pengambilan sampel, pemasangan, pengeringan, vitrifikasi, perendaman olefin, penempelan olefin, pemotongan, penghilangan paraffin, pewarnaan dengan misalnya safranin dan *fast green*, vitrifikasi setelah mengganti larutan pencelupan dengan etanol dengan konsentrasi gradien rendah hingga tinggi, dan akhirnya menyegel spesimen yang dipasang dengan gum arab atau gum netral.

g. Klarifikasi Partikel Secara Mikroskopik

Adanya kandungan sel tertentu, seperti butiran pati, butiran *aleurone*, plastida, lemak, dan minyak, dapat membuat bagian tidak tembus cahaya dan mengaburkan karakteristik tertentu. Reagen yang melarutkan sebagian dari kandungan ini dapat digunakan untuk membuat bagian yang tersisa menonjol dengan jelas atau menghasilkan efek tembus. Ini membuat bagian lebih transparan dan menampilkan detail struktur. Pelarut yang paling sering digunakan adalah kloral hidrat TS, TS Laktokloral, TS Sodium hipoklorit, *Xylene*, dan minyak bumi.

h. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel mempengaruhi keakuratan dari hasil identifikasi. Oleh karena itu, prosedur pengambilan sampel secara acak dan terpercaya harus dilakukan secara ketat. Pengambilan sampel melibatkan sampel referensi dan sampel uji. Sampel referensi (RS) penting untuk identifikasi mikroskopis. Ini harus ditentukan setelah identifikasi taksonomi botani yang ketat dari tanaman asli. Untuk sampel uji (TS), asal, tempat produksi, spesifikasi, kelas, dan gaya pengemasan harus diperhatikan. Integritas kemasan, tingkat higienis, jejak air, penyebaran jamur, dan kontaminasi dengan benda asing juga harus diperiksa dan dicatat secara rinci. Jumlah rata-rata sampel untuk pengujian tidak boleh kurang dari tiga. Sepertiga dari sampel digunakan untuk analisis, 1/3 digunakan untuk verifikasi, sedangkan 1/3 sisanya disimpan setidaknya selama satu tahun.

i. Fragmen

Untuk potongan tisu, letakkan di atas kaca objek, tambahkan bahan pembasah, dan sobek dengan jarum bedah, lalu ditutup.

j. Fotografi

Fotografi dengan metode penyimpanan digital membuatnya semakin nyaman untuk menyimpan dan berbagi gambar yang sesuai. Atur fungsi waktu pencahayaan, kontras, pemilihan pemotongan, dan pengukuran mikroskopik harus dikuasai.

3) Pengujian Serbuk

Teteskan 1 atau 2 tetes air, gliserol / etanol TS atau TS hidrat kloral pada kaca objek (cairan lain dapat digunakan). Basahi jarum, kemudian di totolkan ujung jarum ke serbuk sampel, lalu pindahkan sejumlah kecil sampel yang menempel pada ujung jarum ke dalam tetesan cairan di slide. Aduk rata, tapi hati-hati, dan tutup dengan kaca penutup. Tekan perlahan kaca penutup dengan gagang jarum, dan buang kelebihan cairan dari tepi kaca penutup dengan selembur kertas saring. Jika spesimen ingin dibebaskan dari gelembung udara, rebus dengan hati-hati di atas api kecil dari bunsen sampai udaranya benar-benar hilang. Perawatan harus diambil untuk mengganti cairan yang menguap sehingga ruang di bawah kaca penutup benar-benar terisi dengan cairan (WHO, 1998).

Tabel 4.1. Derajat Kehalusan Serbuk (Menurut FI IV)

Klasifikasi Serbuk	Ukuran Partikel
Sangat Kasar (5/8)	Semua partikel akan melewati saringan No.5, dan tidak lebih dari 40% melalui saringan No.8
Kasar (10/40)	Semua partikel akan melewati saringan No.10, dan tidak lebih dari 40% melalui saringan No.40
Agak Kasar (22/60)	Semua partikel akan melewati saringan No.22, dan tidak lebih dari 40% melalui saringan No.60
Agak Halus (44/85)	Semua partikel akan melewati saringan No.44, dan tidak lebih dari 40% melalui saringan No.85
Halus (85)	Semua partikel akan melewati saringan No.85
Sangat Halus (120)	Semua partikel akan melewati saringan No.120
Sangat Halus (200/300)	Semua partikel akan melewati saringan No.200, dan tidak lebih dari 40% melalui saringan No.300

Pengayak dibuat dari kawat logam atau bahan lain yang cocok dengan penampang melintang yang sama diseluruh bagian. Jenis pengayak dinyatakan dengan nomor yang menunjukkan lobang setiap 2,54 cm dihitung searah dengan panjang kawat.

Tabel 4.2. Derajat Halus Serbuk & Nomor Pengayak

Klasifikasi Serbuk	Simplisia Nabati & Hewani			Bahan Kimia		
	Nomor Nominal Serbuk	Batas Derajat Halus	Nomor Pengayak	Nomor Nominal Serbuk	Batas Derajat Halus	Nomor Pengayak
Sangat Kasar	8	20	60			
Kasar	20	40	60	20	60	40
Setengah Kasar	40	40	80	40	60	60
Halus	60	40	100	80	60	120
Sangat Halus	80	100	80	120	100	120

4) Deteksi Histokimia

Ini termasuk ukuran, bentuk, dan posisi relatif dari sel dan jaringan, serta sifat kimiawi dinding sel, fragmen sel atau jaringan tumbuhan. Ini diperlukan dalam identifikasi awal dari herbal, identifikasi fragmen kecil simplisia herbal atau bubuk, dan deteksi zat asing (serangga, jamur, jamur).

a. Dinding Sel Selulosa

Tambahkan 1–2 tetes zinc chloride TS beryodium dan diamkan selama beberapa menit. Sebagai alternatif, tambahkan 1 tetes yodium (0,1 mol / L), diamkan selama 1 menit, buang reagen berlebih dengan selembat kertas saring dan tambahkan 1 tetes asam sulfat. Dinding sel selulosa diwarnai biru sampai biru-ungu. Pada penambahan 1–2 tetes *cuoxam*, dinding sel selulosa akan membengkak dan perlahan-lahan larut.

b. Lignifikasi Dinding Sel

Basahi serbuk atau bagian pada kaca objek dengan volume kecil phloroglucinol TS dan biarkan selama 2 menit atau sampai hampir kering. Tambahkan 1 tetes asam klorida dan tutup dengan kaca penutup. Lignifikasi dinding sel diwarnai merah muda sampai merah ceri.

c. Dinding Sel Kultikular & Suberisasi

Tambahkan 1–2 tetes Sudan merah dan diamkan selama beberapa menit atau hangatkan perlahan; suberisasi atau dinding sel kutikula diwarnai oranye-merah atau merah.

d. Biji Aleuron

Tambahkan beberapa tetes yodium / etanol, biji aleuron akan berubah menjadi coklat kekuningan menjadi coklat. Kemudian tambahkan beberapa tetes trinitrofenol etanol, biji-bijian akan menguning. Tambahkan sekitar 1 ml merkuri nitrat dan biarkan larut, warna larutan berubah menjadi merah bata. Jika spesimen berminyak, buat bebas lemak dengan merendam dan mencucinya dalam pelarut yang sesuai sebelum melakukan pengujian.

e. Kalsium Karbonat

Kristal atau endapan kalsium karbonat larut perlahan dengan buih ketika asam asetat (60 g / L) atau asam klorida (70 g / L) ditambahkan.

f. Kalsium Oksalat

Kristal kalsium oksalat tidak larut dalam asam asetat, tetapi larut dalam asam klorida tanpa buih, juga larut dalam asam sulfat, tetapi kristal kalsium sulfat berbentuk jarum terpisah saat didiamkan setelah sekitar 10 menit. Dalam cahaya terpolarisasi, kristal kalsium oksalat bersifat *birefringent* (pembiasan ganda). Kalsium oksalat paling baik dilihat setelah sampel diklarifikasi (misalnya dengan kloral hidrat).

g. Lemak, Minyak Lemak, Minyak Menguap, dan Resin

Tambahkan 1–2 tetes Sudan merah dan diamkan selama beberapa menit atau dipanaskan perlahan, jika perlu. Zat lemak diwarnai dari oranye-merah hingga merah. Memabasahi sampel dengan etanol dan panaskan dengan lembut. Minyak atsiri dan resin larut dalam pelarut, sedangkan lemak dan minyak lemak (kecuali minyak jarak dan minyak puring) tetap utuh.

h. Hidroksiantrakuinon

Tambahkan 1 tetes kalium hidroksida, sel yang mengandung 1,8-dihydroxyanthraquinones akan berwarna merah.

i. Inulin

Tambahkan 1 tetes 1-naftol dan asam sulfat, akan timbul membentuk granul bulat dari kristal inulin berubah menjadi merah kecoklatan dan larut.

j. Mucilago

Tambahkan 1 tetes tinta Cina ke sampel kering; lendir muncul sebagai fragmen transparan yang membesar secara bulat dengan latar belakang hitam. Cara lainnya, tambahkan 1 tetes tionina ke sampel kering, diamkan selama sekitar 15 menit, lalu cuci dengan etanol. Lendir akan berubah dari warna ungu ke merah (selulosa dan dinding sel lignifikasi masing-masing diwarnai biru dan ungu kebiruan).

k. Pati

Tambahkan sejumlah kecil yodium (0,02 mol / L), akan menghasilkan warna biru atau biru kemerahan. Sebagai alternatif, tambahkan sedikit gliserol / etanol dan periksa di bawah mikroskop dengan cahaya terpolarisasi. Indeks bias ganda diamati memberikan efek pada maltosa dengan berpotongan menyilang di hilum (Tong, 2007, 2008).

l. Tanin

Tambahkan 1 tetes besi klorida (50 g / L), akan berubah menjadi hitam kebiruan atau hitam kehijauan.

m. Stomata Daun

Pada daun dewasa, ada empat jenis stomata yang sangat berbeda dibedakan menurut bentuk dan susunan sel di sekitarnya, terutama sel anak, yaitu:

- Anomositik atau *ranunculaceous* (tipe sel tidak beraturan)
Stoma dikelilingi oleh jumlah sel yang bervariasi, umumnya tidak berbeda dengan epidermis.
- Anisositik atau *cruciferous* (tipe sel tidak sama)

Stoma biasanya dikelilingi oleh tiga atau empat sel anak, salah satunya lebih kecil dari yang lain.

- Diacytic atau *caryophyllaceous* (tipe sel silang)

Stoma disertai dengan dua sel anak, dinding yang umum berada di sudut kanan ke stoma.

- Paracytic atau *rubiceous* (tipe sel paralel)

Stoma memiliki dua sel anak, yang sumbu panjangnya sejajar dengan sumbu stoma.

5) Pengukuran Spesimen

a. Penentuan Indeks Stomata

Tempatkan potongan daun, sekitar 5 buah × 5 mm² dalam ukuran, dalam tabung reaksi yang berisi sekitar 5 mL kloral hidrat dan panaskan pada penangas air selama sekitar 15 menit atau sampai fragmen transparan. Pindahkan fragmen ke kaca objek dan persiapkan seperti yang dijelaskan sebelumnya, epidermis bawah paling atas, dalam hidrat kloral; tempatkan setetes kecil gliserol / etanol di satu sisi kaca penutup untuk mencegah bahan mengering. Periksa di bawah mikroskop dengan obyektif 40X dan lensa mata 6X, yang dilengkapi dengan peralatan gambar. Tandai pada kertas gambar tanda silang (x) untuk setiap sel epidermis dan lingkaran (o) untuk setiap stoma. Hitung indeks stomata sebagai berikut:

$$\text{Indeks stomata} = \frac{S \times 100}{E + S}$$

Dimana :

S = jumlah stomata di suatu area daun

E = jumlah sel epidermis (termasuk trichome) pada areal daun yang sama

b. Nomor stomata

c. Rasio palisade

d. Nomor *vein-islet* (area jaringan untuk fotosintesis)

e. Nomor vein termination (batas area setiap mm dari permukaan daun)

4.2.2. Metode Fisika.

Konstanta fisika terkadang menjadi pertimbangan untuk mengevaluasi obat-obatan tertentu. Ini termasuk kadar air, berat jenis, rotasi optik, indeks bias, titik leleh, viskositas, dan kelarutan dalam pelarut yang berbeda. Semua sifat fisika ini berguna dalam identifikasi dan deteksi unsur-unsur yang ada di tumbuhan.

A. Materi Organik Asing

Obat herbal harus dibuat dari bagian tanaman yang disebutkan dan tidak boleh ada bagian lain dari tanaman yang sama atau tanaman lain. Ini harus sepenuhnya bebas dari tanda-tanda kontaminasi yang terlihat oleh jamur atau serangga dan kontaminasi hewan lainnya, termasuk kotoran hewan. Tidak ada bau abnormal, perubahan warna, lendir atau tanda-tanda kerusakan yang harus dideteksi. Bagian dari bahan tanaman

obat atau bahan selain yang diberi nama dengan batasan yang ditentukan untuk bahan tanaman tersebut disebut sebagai bahan organik asing. Ini mungkin organisme, bagian atau produk dari suatu organisme, selain yang disebutkan dalam spesifikasi dan deskripsi bahan tumbuhan yang bersangkutan, harus sepenuhnya bebas dari jamur atau serangga, termasuk kotoran dan kontaminan yang terlihat seperti pasir dan batu, benda asing yang beracun dan berbahaya, dan residu kimiawi. Tidak boleh ada bahan atau residu asing yang beracun, berbahaya, atau berbahaya lainnya. Selama penyimpanan, produk harus disimpan di tempat yang bersih dan higienis agar tidak terjadi kontaminasi.

Materi hewan seperti serangga dan kontaminan mikroba yang “tak terlihat”, yang dapat menghasilkan racun, juga merupakan salah satu kontaminan potensial dari obat-obatan herbal. Pemeriksaan makroskopis dapat dengan mudah digunakan untuk menentukan keberadaan benda asing, meskipun mikroskopis sangat diperlukan dalam kasus khusus tertentu (misalnya pati yang sengaja ditambahkan untuk "mengencerkan" bahan tanaman). Pemeriksaan makroskopis dapat dengan mudah digunakan untuk menentukan keberadaan benda asing di seluruh atau bahan tanaman yang dipotong. Selain itu, jika benda asing terdiri, misalnya, residu kimiawi, KLT sering diperlukan untuk mendeteksi kontaminan.

B. Viskositas

Viskositas zat cair konstan pada suhu tertentu, dan merupakan indeks komposisinya. Oleh karena itu, dapat digunakan sebagai sarana standarisasi obat cair.

C. Titik Lebur

Dalam kasus fotokimia murni, titik leleh sangat tajam dan konstan. Obat herbal mentah yang berasal dari tumbuhan atau hewan, yang mengandung bahan kimia campuran, dapat dijelaskan dengan kisaran titik leleh tertentu.

D. Daya larut

Adanya zat kontaminasi dapat ditunjukkan dengan studi kelarutan, misalnya asafoetida murni larut dalam karbon disulfida.

E. Kandungan Kelembaban & Zat Mudah Menguap.

Kadar air obat harus diminimalkan untuk mencegah dekomposisi obat mentah baik karena perubahan kimiawi atau kontaminasi mikroba. Kadar air ditentukan dengan memanaskan obat pada 105 °C dalam oven dengan berat konstan. Untuk obat yang mengandung zat yang mudah menguap, menggunakan metode distilasi toluene.

F. Rotasi Optik

Senyawa aktif secara optik memiliki sifat memutar bidang cahaya terpolarisasi. Properti ini dikenal sebagai rotasi optik. Biasanya, putaran optik ditentukan pada suhu 25 °C dengan menggunakan lampu natrium sebagai sumber cahayanya. Menggunakan

alat Polarimeter. Sebagai contoh, minyak jarak memiliki rotasi optik dari $+ 3,5^\circ$ hingga $+ 6^\circ$.

G. Indeks Bias

Ketika seberkas cahaya berpindah dari satu medium ke medium lain dengan densitas berbeda, rasio kecepatan cahaya dalam ruang hampa terhadap kecepatannya dalam zat disebut sebagai indeks bias medium kedua. Ini konstan untuk obat murni dan bervariasi dengan panjang gelombang cahaya, suhu, dan tekanan insiden. Indeks bias diukur dengan alat refraktometer, contohnya indeks bias minyak jarak adalah 1,4758-1,527.

H. Kadar Abu

Residu yang tersisa setelah insinerasi adalah kandungan abu obat. Ini melibatkan komponen anorganik yang tidak mudah menguap. Nilai abu yang tinggi merupakan indikasi kontaminasi, substitusi, pemalsuan atau kecerobohan dalam pembuatan obat herbal mentah. Untuk menentukan kadar abu, bahan tanaman dibakar dan sisa abu diukur sebagai abu total dan abu tidak larut asam. Abu total adalah ukuran dari jumlah total bahan yang tersisa setelah pembakaran dan termasuk abu yang berasal dari bagian tanaman itu sendiri dan abu yang tidak larut dalam asam. Yang terakhir adalah residu yang diperoleh setelah mendidihkan abu total dengan asam klorida encer dan membakar sisa bahan tak larut. Prosedur kedua mengukur jumlah silika yang ada, terutama dalam bentuk pasir dan tanah yang mengandung silika.

a. Total Abu

Total abu dirancang untuk mengukur jumlah total bahan yang dihasilkan setelah insinerasi lengkap, bahan obat pada suhu serendah mungkin (sekitar 450°C) untuk menghilangkan semua karbon. Ini termasuk "abu fisiologis", yang berasal dari jaringan tanaman itu sendiri, dan abu "non-fisiologis", yang merupakan residu dari materi asing (misalnya pasir dan tanah) yang menempel pada permukaan tanaman. Abu total biasanya terdiri dari karbonat, fosfat, silikat, dan silika.

Penentuan kadar abu total caranya adalah dengan menempatkan sekitar 2-4 g bahan yang dikeringkan dengan udara di dalam wadah yang sebelumnya telah dinyalakan dan dilapisi aspal (biasanya dari platina atau silika). Sebarkan bahan dalam lapisan yang rata dan nyalakan dengan meningkatkan panas secara bertahap hingga $500\text{--}600^\circ\text{C}$ hingga berwarna putih, yang menandakan tidak adanya karbon. Dinginkan dalam desikator dan timbang. Jika abu bebas karbon tidak dapat diperoleh dengan cara ini, dinginkan wadah dan basahi residu dengan sekitar 2 mL air atau larutan jenuh amonium nitrat. Keringkan di atas penangas air, lalu di atas hot plate, dan nyalakan dengan berat konstan. Biarkan residu menjadi dingin dalam desikator yang sesuai selama 30 menit, lalu ditimbang. Hitung kandungan total abu dalam mg per g bahan yang dikeringkan.

b. Kadar Abu Yang Tidak Larut Asam

Abu tidak larut asam adalah residu yang diperoleh setelah mengekstraksi abu total dengan asam klorida encer (HCl), dan menyalakan sisa bahan tidak larut. Ini memberi gambaran tentang materi bumi, terutama pasir dan tanah yang mengandung silika. Caranya adalah dengan menambahkan 25 mL asam klorida ke bejana yang berisi abu total, tutup dengan gelas arloji dan didihkan perlahan selama 5 menit. Bilas kaca arloji dengan 5 mL air panas dan tambahkan cairan ini ke bejana. Kumpulkan bahan yang tidak larut pada kertas saring tanpa abu dan cuci dengan air panas sampai filtrat menjadi netral. Pindahkan kertas saring yang berisi bahan yang tidak dapat larut ke wadah asli, keringkan di atas kompor listrik, dan nyalakan hingga berat konstan. Biarkan residu mendingin dalam desikator yang sesuai selama 30 menit, lalu timbang. Hitung kandungan abu tidak larut asam dalam mg per g bahan.

c. Kadar Abu Yang Larut Dalam Air

Kadar abu total yang larut dalam air disebut abu larut air. Ini adalah indikator yang baik dari adanya ekstraksi sebelumnya dari garam yang larut dalam air dalam obat atau preparasi yang salah atau jumlah bahan anorganik. Abu larut air merupakan selisih bobot antara abu total dan residu setelah dilakukan perlakuan terhadap abu total dengan air. Penentuan abu larut air dengan cara menambahkan 25 mL air ke wadah yang berisi abu total dan didihkan selama 5 menit. Kumpulkan materi yang tidak larut dalam wadah kaca sinter atau pada kertas saring tanpa abu. Cuci dengan air panas dan nyalakan dalam wadah selama 15 menit pada suhu tidak melebihi 450 °C. Kurangi berat residu ini dalam mg dari berat abu total. Hitung kandungan abu yang larut dalam air dalam mg per g bahan yang dikeringkan dengan udara.

I. Nilai Kepahitan

Bahan tumbuhan obat yang memiliki rasa pahit yang kuat digunakan sebagai terapi, kebanyakan sebagai bahan yang membangkitkan selera. Kepahitan mereka merangsang sekresi di saluran pencernaan, terutama cairan lambung. Sifat pahit dari bahan tanaman ditentukan dengan membandingkan konsentrasi pahit ambang dari ekstrak bahan dengan larutan encer kuinin hidroklorida. Nilai kepahitan dinyatakan dalam satuan yang setara dengan kepahitan larutan yang mengandung 1 g kuinin hidroklorida dalam 2000 mL. Sensasi pahit tidak dirasakan oleh seluruh permukaan lidah, tetapi terbatas pada bagian tengah permukaan atas lidah. Air minum yang aman harus digunakan sebagai sarana ekstraksi jamu dan untuk obat kumur setelah pengecapan. Rasanya akan cepat kusam jika menggunakan air suling.

Nilai kepahitan dihitung dalam satuan per g menggunakan rumus berikut :

$$\frac{2000 \times c}{a \times b}$$

Dimana :

a = konsentrasi stok larutan uji (ST) (mg / mL)

b = volume larutan uji ST (dalam mL) dalam tabung dengan nilai ambang konsentrasi pahit

c = volume kina hidroklorida R (dalam mg) dalam tabung dengan nilai ambang batas konsentrasi pahit

J. Aktivitas Hemolitik

Bahan tanaman obat dari famili *Caryophyllaceae*, *Araliaceae*, *Sapindaceae*, *Primulaceae*, dan *Dioscoreaceae* banyak mengandung saponin. Sifat saponin yang paling khas adalah kemampuannya untuk menyebabkan hemolisis, ketika ditambahkan ke suspensi darah, saponin menghasilkan perubahan pada membran eritrosit yang menyebabkan hemoglobin berdifusi ke media sekitarnya. Aktivitas hemolitik bahan tumbuhan atau sediaan yang mengandung saponin ditentukan dengan perbandingan dengan bahan acuan saponin yang memiliki aktivitas hemolitik 1000 unit/g.

$$\text{Aktivitas hemolitik} = 1000 \times \frac{a}{b}$$

Dimana

1000 = aktivitas hemolitik dari standar saponin yang ditentukan

a = jumlah baku saponin yang menghasilkan hemolisis total (g)

b = jumlah bahan tanaman yang menghasilkan hemolisis total (g)

K. *Swelling Index* (Nilai Pembengkakan)

Banyak bahan herbal yang memiliki kegunaan terapeutik atau farmasi spesifik karena sifat pembengkakannya, terutama gom arab dan yang mengandung mucilago, pektin, atau hemiselulosa dalam jumlah yang cukup besar. Indeks pembengkakan adalah volume dalam mL yang diambil oleh pembengkakan 1 gram bahan tanaman dalam kondisi tertentu. Penentuannya didasarkan pada penambahan air atau zat pembengkakan sebagaimana ditentukan dalam prosedur pengujian untuk setiap bahan tanaman (baik utuh, potong, atau serbuk). Dengan menggunakan silinder ukur bertutup kaca, material diguncang berulang kali selama 1 jam dan kemudian didiamkan selama jangka waktu yang ditentukan. Volume campuran (dalam mL) kemudian dibaca.

Catatan: Pencampuran seluruh bahan herbal dengan bahan pembengkakan mudah dilakukan, tetapi bahan yang dipotong atau dihancurkan memerlukan pengocokan kuat pada interval tertentu untuk memastikan pemerataan bahan dalam bahan pembengkakan.

L. *Foaming Index* (Nilai Pembusaan)

Kemampuan berbusa dari rebusan berair dari bahan tumbuhan dan ekstraknya diukur dalam kaitannya dengan indeks pembusaan. Banyak bahan tanaman obat mengandung saponin yang dapat menyebabkan busa terus-menerus saat rebusan air

dikocok. Caranya adalah dengan mengurangi ukuran bahan herbal menjadi bubuk kasar (ukuran ayakan no.1250), timbang dengan teliti, dan pindahkan ke labu berbentuk kerucut yang berisi air mendidih. Pertahankan pada titik didih sedang selama 30 menit. Dinginkan dan saring ke dalam labu ukur dan tambahkan air secukupnya melalui penyaring untuk mengencerkan volume. Tuang hasil rebusan ke dalam tabung reaksi dan sesuaikan volume cairan di tiap tabung dengan 10 mL air 10 mL. Tutup mulut tabung reaksi dan kocok dengan gerakan memanjang selama 15 detik, dua getar per detik. Diamkan selama 15 menit dan ukur tinggi busa. Hasilnya dinilai sebagai berikut:

- Jika tinggi busa di setiap tabung kurang dari 1 cm, indeks pembusaannya kurang dari 1000.
- Jika tinggi busa lebih dari 1 cm di setiap tabung, indeks pembusaan lebih dari 1000.

Indeks berbusa dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$Foaming\ Index = \frac{1000}{a}$$

Dimana :

a = volume dalam mL rebusan yang digunakan untuk membuat pengenceran dalam tabung di mana terdapat busa hingga ketinggian 1 cm.

M. Nilai Ekstrak

Jumlah konstituen aktif yang ada dalam bahan obat mentah saat diekstraksi dengan pelarut tertentu disebut nilai ekstraktif. Ini digunakan untuk bahan yang belum ada uji kimia atau biologi yang sesuai. Metode berikut digunakan untuk menentukan nilai ekstraktif : Metode dingin, metode panas, metode soxhlet.

a. Total kandungan bahan padat

Residu yang diperoleh jika jumlah sediaan yang ditentukan dikeringkan hingga berat konstan di bawah kondisi yang ditentukan disebut kandungan padatan total. Untuk ekstrak bubuk, kandungan padat tidak kurang dari 95% dan untuk ekstrak setengah padat tidak kurang dari 70%.

b. Kandungan Air

Kelebihan air dalam bahan herbal dapat menyebabkan pertumbuhan mikroba, keberadaan jamur atau serangga, dan kerusakan setelah hidrolisis. Oleh karena itu, batasan kadar air harus ditetapkan untuk setiap bahan herbal yang diberikan. Ini terutama penting untuk bahan yang mudah menyerap kelembapan atau cepat rusak jika ada air. Metode azeotropik digunakan untuk mengukur langsung keberadaan air dalam suatu bahan. Ini ditentukan dengan metode titrimetri Karl Fisher dan metode kromatografi gas. Jika sampel didistilasi bersama dengan pelarut yang tidak bercampur, seperti toluena atau xilena, air yang ada dalam sampel diserap oleh pelarut. Air dan pelarut didistilasi bersama dan dipisahkan dalam tabung penerima pada

pendinginan. Jika pelarutnya anhidrat, air mungkin tetap terserap di dalamnya, yang menyebabkan hasil yang salah.

Oleh karena itu, disarankan untuk menjenuhkan pelarut dengan air sebelum digunakan. Pengujian kehilangan pengeringan menentukan air dan bahan yang mudah menguap. Hal ini ditentukan dengan mengambil sekitar 2–5 g bahan kering udara yang disiapkan atau jumlah yang ditentukan dalam prosedur uji untuk bahan herbal yang bersangkutan, ditimbang secara akurat, dalam botol timbang datar yang sebelumnya dikeringkan dan diratakan. Pengeringan dapat dilakukan dengan memanaskan hingga 100–105° C atau dalam desikator di atas fosfor pentoksida di bawah tekanan atmosfer atau tekanan yang diturunkan pada suhu kamar untuk jangka waktu tertentu. Keringkan sampai dua penimbangan berturut-turut tidak berbeda lebih dari 5 mg. Hitung penurunan berat dalam mg per g bahan yang dikeringkan dengan udara. Kandungan air menurut Perka BPOM nomor 12 tahun 2014 $\leq 10\%$.

c. Kandungan Minyak Atsiri

Minyak yang mudah menguap adalah komponen cair dari sel tumbuhan, tidak bercampur dengan air, mudah menguap pada suhu biasa, dan dapat disuling dengan uap pada tekanan biasa. Minyak yang mudah menguap dicirikan oleh baunya, penampilan seperti minyak, dan kemampuannya untuk menguap pada suhu kamar. Secara kimiawi, senyawa ini biasanya terdiri dari campuran monoterpen, seskuiterpen, dan turunannya yang teroksidasi.

Banyak jamu yang mengandung minyak atsiri yang digunakan sebagai penyedap rasa, misalnya kandungan minyak atsiri cengkeh tidak kurang dari 15% v / w. Untuk menentukan volume minyak, bahan tanaman disuling dengan air dan distilat dikumpulkan dalam tabung ukur. Bagian berair terpisah secara otomatis dan dikembalikan ke labu destilasi. Jika minyak atsiri memiliki massa jenis lebih tinggi dari atau mendekati air atau sulit dipisahkan dari fasa air karena pembentukan emulsi, pelarut dengan massa jenis rendah dan titik didih yang sesuai dapat di masukan ke tabung pengukuran. Minyak atsiri terlarut kemudian akan mengapung di atas fase air.

d. *Lost on Drying* (Untuk Bahan yang Mudah Menguap)

Untuk mengukur bahan yang mudah menguap, tanaman diencerkan dengan air dan distilat dikumpulkan dalam tabung ukur. Bagian berair memisahkan dan kembali ke labu destilasi. Pelarut dengan massa jenis rendah dengan titik didih yang sesuai dapat ditambahkan ke tabung pengukur untuk dengan mudah memisahkan minyak atsiri.

e. Pengujian Tanin (Sifat Adstringen)

Tanin adalah zat yang mampu mengubah kulit hewan menjadi kulit dengan mengikat protein menjadi zat yang tidak larut dalam air yang tahan terhadap enzim proteolitik. Ketika proses ini diterapkan pada jaringan hidup, ini dikenal sebagai aksi astringen dari tanin. Secara kimiawi, tanin adalah zat kompleks; biasanya terjadi sebagai campuran polifenol yang sulit dipisahkan dan dikristalisasi. Mereka mudah teroksidasi dan dipolimerisasi dalam larutan. Jika ini terjadi, mereka kehilangan banyak efek astringennya dan, oleh karena itu, hanya memiliki sedikit nilai terapeutik.

Jumlah tanin dalam persentase ditentukan dengan rumus berikut :

$$\text{Persentase kuantitas tanin} = \frac{[T1 - (T2 - T0)] \times 500}{w}$$

Dimana :

w = berat bahan tanaman dalam gram

T1 = berat bahan yang diekstraksi dalam air

T2 = berat bahan tidak terikat, serbuk kulit

T0 = berat bahan serbuk kulit larut dalam air

4.2.3. Metode Kimia

Sebagian besar obat memiliki konstituen kimiawi yang pasti yang dikaitkan dengan aktivitas biologis atau farmakologisnya. Mereka dapat dipisahkan dengan analisis dan uji kimia yang berbeda. Isolasi, pemurnian, dan identifikasi konstituen aktif adalah metode evaluasi kimiawi. Uji kimia kualitatif digunakan untuk mengidentifikasi obat tertentu atau untuk menguji kemurniannya, juga dapat digunakan untuk mendeteksi pemalsuan. Evaluasi kimiawi juga mencakup skrining fitokimia yang dilakukan untuk menetapkan profil kimiawi suatu obat. Uji kimia kualitatif meliputi nilai asam, nilai saponifikasi, dan sebagainya. Beberapa diantaranya berguna dalam evaluasi resin (nilai asam, abu sulfat), balsam (nilai asam, nilai saponifikasi, dan nilai ester), minyak atsiri (nilai asetil dan ester), dan getah (penentuan metoksi dan keasaman volatil).

A. Metode Analitik

Secara umum, kendali mutu didasarkan pada tiga definisi farmakope yang penting, yaitu identitas, kemurnian, dan kandungan atau pengujian. Farmakope merupakan sumber terbaik untuk menjaga kendali mutu jamu (AOAC, 2005) Informasi tambahan, terutama pada metode kromatografi dan / atau spektroskopi, dapat ditemukan dalam literatur ilmiah umum. Ekstrak tumbuhan atau tumbuhan dapat dievaluasi dengan berbagai metode biologi untuk menentukan aktivitas farmakologis, potensi, dan toksisitas. Teknik kromatografi sederhana seperti KLT dapat memberikan informasi tambahan yang berharga untuk menetapkan identitas bahan tanaman.

Hal ini penting terutama untuk spesies yang mengandung unsur aktif yang berbeda. Informasi kualitatif dan kuantitatif dapat dikumpulkan mengenai ada atau tidaknya metabolit atau pemecahan produk (AOAC, 2005). Sidik jari TLC adalah kunci penting untuk obat-obatan herbal yang terdiri dari minyak esensial, resin, dan gom, yang merupakan campuran kompleks dari unsur-unsur yang tidak lagi memiliki struktur organik. Ini adalah solusi yang kuat dan relatif cepat untuk membedakan antara kelas kimia, di mana makroskopi dan mikroskop mungkin gagal.

Instrumen seperti ultraviolet dan spektroskopi tampak mudah dioperasikan, dan prosedur validasinya sangat mudah, tetapi pada saat yang sama juga tepat. Meskipun pengukuran dilakukan dengan cepat, persiapan sampel dapat memakan waktu dan hanya berfungsi dengan baik untuk sampel yang kurang kompleks, dan senyawa

dengan absorbansi di daerah UV-Visible. HPLC adalah metode yang disukai untuk analisis kuantitatif dari campuran yang lebih kompleks. Pemisahan komponen yang mudah menguap seperti minyak esensial dan lemak dapat dicapai dengan HPLC, tetapi paling baik dilakukan dengan GC atau GC-MS. Penentuan kandungan secara kuantitatif telah dipermudah oleh perkembangan terkini dalam instrumentasi analitik. Kemajuan terbaru dalam isolasi, pemurnian, dan penjelasan struktur dari metabolit alami telah memungkinkan untuk menetapkan strategi yang tepat untuk penentuan dan analisis kualitas dan proses standarisasi sediaan herbal. KLT, HPLC, GC, KLT kuantitatif (QTLC), dan KLT kinerja tinggi (HPTLC) dapat menentukan homogenitas suatu ekstrak tumbuhan.

Teknik kromatografi yang saling berhubungan sering digunakan untuk standarisasi dan untuk mengontrol kualitas bahan baku dan produk jadi. TLC dan HPLC adalah teknik analisis utama yang umum digunakan. Ketika bahan aktif tidak diketahui atau terlalu kompleks, kualitas ekstrak tumbuhan dapat dinilai dengan kromatogram “sidik jari”. Berdasarkan konsep kesetaraan foto, sidik jari kromatografi dapat digunakan untuk pengendalian mutu obat-obatan herbal. Selain itu, metode berdasarkan teori informasi, perkiraan kesamaan, pengenalan pola kimia, kromatogram korelatif spektral, resolusi multivariat, dan kombinasi sidik jari kromatografi dan evaluasi kemometri untuk mengevaluasi sidik jari adalah alat yang ampuh untuk kontrol kualitas produk herbal.

B. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis sangat berguna untuk penentuan kualitatif sejumlah kecil pengotor. Prinsip kromatografi lapis tipis dan penerapan teknik ini dalam analisis farmasi dijelaskan dalam International Pharmacopoeia (IP). Karena efektif dan mudah dilakukan, serta peralatan yang dibutuhkan tidak mahal, teknik ini sering digunakan untuk mengevaluasi bahan herbal dan sediaanannya. Parameter berikut harus ditentukan saat memisahkan cairan, yaitu jenis adsorben dan metode aktivasi, metode pembuatan dan konsentrasi larutan uji dan referensi. Volume larutan yang akan ditolkan pada kertas, fase gerak dan jarak migrasi, kondisi pengeringan (termasuk suhu) dan metode deteksi, Nilai R_f, fluoresensi, dan warna.

a. Peralatan

Peralatan tersebut terdiri dari bagian-bagian berikut:

- Piring kaca dengan ketebalan seragam di seluruh area, panjang 15-20 cm, dan cukup lebar untuk mengakomodasi jumlah larutan uji dan referensi yang diperlukan.
- Sebuah alat untuk merapikan zat lapisan dengan ketebalan yang seragam ke pelat kaca
- Sebuah rak untuk menahan pelat yang disiapkan (biasanya 10 pelat dengan jarak yang diatur) untuk pengeringan dan penyimpanan; rak harus cukup ukurannya untuk dimasukkan ke dalam oven pengering dan desikator

- Ruang (*chamber*) kromatografi dari bahan transparan, biasanya kaca, dengan tutup yang pas, dengan ukuran yang sesuai agar pelat uji bisa dimasukkan ke dalamnya.
 - Alat penyemprot yang sesuai dengan nosel semprot halus, terbuat dari bahan yang tahan terhadap reagen yang akan digunakan
 - Sinar ultraviolet *chamber* yang memancarkan panjang gelombang pendek (254 nm) dan panjang (365 nm).
- b. Metodologi
- Siapkan bubuk bahan pelapis dan air atau cairan pelarut, dengan menggunakan alat penyebar, lapisi pelat yang sudah dibersihkan dengan lapisan setebal 0,25 mm. lalu keringkan dengan udara.
 - Untuk mengaktifkan, panaskan pada 110 °C selama 30 menit, lalu biarkan dingin. Periksa keseragaman lapisan dalam cahaya yang ditransmisikan dan tekstur dalam cahaya yang dipantulkan. Jika pelat tidak akan segera digunakan, simpan dalam desikator yang mengandung silika gel.
 - Untuk membentuk tepi, lepaskan strip sempit (lebar 2–5 mm) dari bahan pelapis dari sisi pelat.
 - Tuangkan ke dalam ruang tersebut sejumlah fase gerak yang cukup dengan kedalaman sekitar 5 mm. Untuk mencapai kejenuhan, lapisi setidaknya setengah dari total luas dinding bagian dalam dari kertas atau pelat TLC.
 - Tutup *chamber* dan biarkan selama minimal 1 jam pada suhu ruang. Semua operasi selama pelat terkena udara sebaiknya dilakukan pada kelembaban relatif 50-60%, dan pelat harus ditangani dengan hati-hati.
 - Kemudian tempatkan titik larutan uji dan referensi ke garis awal menggunakan mikropipet atau jarum suntik yang sudah lulus uji dalam µl.
 - Bintik-bintik tersebut harus setidaknya 15 mm dari sisi pelat, dan setidaknya berjarak 15 mm. Tandai jarak fase gerak yang ingin dinaiki seperti yang ditentukan dalam prosedur pengujian, biasanya 10–15 cm dari garis awal.
 - Hasil pemisahan sering kali dapat ditingkatkan dengan menerapkan solusi untuk membentuk pita horizontal dengan panjang 10–15 mm dan lebar tidak lebih dari 5 mm.
 - Biarkan bintik-bintik mengering, lalu letakkan pelat secara vertikal di dekat *chamber*, pastikan titik aplikasi berada di atas permukaan fase gerak, lalu ditutup. Kembangkan kromatogram pada suhu kamar kecuali ditentukan lain dalam prosedur pengujian, yang memungkinkan pelarut naik pada jarak yang ditentukan.
 - Lepaskan pelat, tandai posisi bagian depan pelarut, dan biarkan pelarut menguap pada suhu kamar atau seperti yang ditentukan.
 - Amati bintik-bintik yang muncul di siang hari, kemudian di bawah sinar ultraviolet gelombang pendek dan gelombang panjang.
 - Tandai bagian tengah setiap titik dengan jarum. Ukur dan catat jarak dari pusat masing-masing titik ke titik penerapan, dan tunjukkan untuk setiap titik panjang

gelombang yang diamati. Kemudian semprotkan bintik-bintik dengan reagen yang ditentukan, dan amati dan bandingkan bintik-bintik dengan bahan referensi.

c. Penentuan Nilai Rf

Hitung rasio jarak yang ditempuh pada adsorben oleh senyawa tertentu dengan yang ditempuh oleh ujung depan pelarut (nilai Rf) atau rasio jarak yang digerakkan oleh senyawa dan bahan referensi yang dinyatakan sebagai berikut:

$$Rf = \frac{a}{b}, \quad Rf = \frac{a}{c}$$

Dimana :

a = jarak antara titik penerapan dan pusat titik materi yang sedang diperiksa

b = jarak antara titik penerapan dan muka pelarut

c = jarak antara titik penerapan dan pusat titik materi referensi

Catatan: Nilai Rf dapat bervariasi dengan setiap percobaan tergantung pada kondisi saturasi dalam ruang kromatografi, aktivitas lapisan adsorben, dan komposisi fase gerak.

C. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah pendahuluan dari evaluasi kimiawi. Uji kimia kualitatif ini berguna untuk mengidentifikasi unsur kimia dan mendeteksi pemalsuan.

a. Deteksi Alkaloid

Porsi kecil pelarut bebas, kloroform, alkohol, dan air diaduk secara terpisah dengan beberapa tetes asam klorida encer dan disaring. Filtrat dapat diuji secara hati-hati dengan berbagai pereaksi alkaloid, seperti pereaksi Mayer (endapan krim), pereaksi Dragendorff (endapan oranye-coklat), pereaksi Hager (endapan kuning), dan pereaksi Wagner (endapan coklat kemerahan).

b. Deteksi Karbohidrat & Glikosida

Sejumlah kecil (200 mg) ekstrak alkohol dan ekstrak lainnya dilarutkan secara terpisah dalam 5 mL air suling dan disaring. Filtrat dapat diuji Molisch untuk mendeteksi keberadaan karbohidrat. Sebagian kecil ekstrak dihidrolisis dengan asam klorida encer selama beberapa jam dalam penangas air dan menjalani uji Liebermann-Burchard, Legal, dan Borntranger untuk mendeteksi keberadaan glikosida yang berbeda. Sebagian kecil ekstrak dilarutkan dalam air dan diolah dengan reagen Fehling, Barfoed, dan Benediktus untuk mendeteksi keberadaan gula yang berbeda.

c. Deteksi Fitosterol

Ekstrak petroleum eter, aseton, dan alkohol direfluks secara terpisah dengan larutan kalium hidroksida dengan alkohol, sampai terjadi saponifikasi lengkap. Campuran saponifikasi diencerkan dengan akuades dan diekstraksi dengan eter. Ekstrak halus diuapkan dan residu (materi tak tersaponifikasi) dilanjutkan dengan uji Liebermann dan Burchard.

d. Deteksi Minyak & Lemak Tetap

Beberapa tetes 0,5 N larutan kalium hidroksida dengan alkohol ditambahkan ke sejumlah kecil ekstrak petroleum eter atau benzena bersama dengan setetes fenoltalein. Campuran dipanaskan di atas penangas air selama 1-2 jam. Pembentukan sabun atau netralisasi parsial alkali menunjukkan adanya minyak dan lemak tetap.

e. Deteksi Saponin

Sekitar 1 mL ekstrak alkohol dan air diencerkan secara terpisah dengan air suling hingga 20 mL dan dikocok dalam silinder ukur selama 15 menit. Lapisan busa berukuran 1 cm menunjukkan adanya saponin. Larutan uji ini dapat digunakan untuk uji hemolisis.

f. Deteksi Senyawa Fenolik, Tanin

Sejumlah kecil ekstrak alkohol dan air diuji untuk melihat keberadaan senyawa fenolik dan tanin yang dilarutkan dengan larutan besi klorida encer (5%), larutan gelatin 1% yang mengandung 10% natrium klorida, dan 10% timbal asetat dan larutan bromin encer.

g. Deteksi Protein & Asam Amino Bebas

Sejumlah kecil ekstrak alkohol dan air dilarutkan dalam beberapa mL air dan dilakukan tes Biuret dan Ninhydrin dari Millon.

h. Deteksi Gom & Mucilago

Sekitar 10 mL ekstrak air ditambahkan ke 25 mL alkohol absolut dengan pengadukan konstan. Endapan dikeringkan di udara. Endapan diperiksa sifat pembengkakannya dan keberadaan karbohidrat.

i. Deteksi Minyak Atsiri

Sekitar 50 g bahan sampel dalam bentuk bubuk diambil, lalu dimasukkan ke dalam alat destilasi minyak atsiri dan dilakukan distilasi hidro untuk mendeteksi minyak atsiri. Hasil suling dikumpulkan dalam labu destilasi, di mana bagian berair secara otomatis dipisahkan dari minyak atsiri jika ada di dalam ekstrak, dan akan kembali lagi ke labu destilasi.

D. Kontaminasi Radioaktif

Paparan ini tidak dapat dihindari karena banyak sumber yang terjadi secara alami, termasuk radionukleotida, di dalam tanah dan atmosfer. Kontaminasi dari radionuklida yang dapat dilepaskan ke lingkungan sebagai akibat dari kecelakaan nuklir, dapat mencakup produk fisi, aktinida, dan produk aktivasi, terjadi secara cepat atau lambat. Pertumbuhan mikroba di herba biasanya tidak disinari. Proses ini dapat mensterilkan bahan tanaman, tetapi bahaya radioaktivitas harus dipertimbangkan. Sifat dan intensitas radionuklida yang dilepaskan dapat berbeda-beda dan bergantung pada sumbernya (reaktor, pabrik daur ulang, pabrik bahan bakar, unit produksi isotop, dll). Kontaminasi berbahaya, bagaimanapun, mungkin merupakan akibat dari kontaminasi nuklir. WHO telah mengembangkan pedoman jika terjadi kontaminasi luas oleh radionuklida akibat kecelakaan nuklir secara umum. Jumlah jamu yang terkontaminasi radioaktif yang biasanya dikonsumsi oleh seseorang tidak mungkin menjadi risiko kesehatan. Oleh

karena itu, saat ini, tidak ada batasan yang diusulkan untuk kontaminasi radioaktif (World Health Organization, 2011).

4.2.4. Metode Biologi

Beberapa obat memiliki aktivitas biologis dan farmakologis spesifik yang digunakan untuk evaluasi. Sebenarnya, kegiatan ini disebabkan oleh jenis penyusun tertentu yang ada dalam ekstrak tumbuhan. Untuk evaluasi, percobaan dilakukan pada organ hewan hidup yang utuh dan terisolasi. Dengan bantuan *bioassay* (pengujian obat pada hewan hidup), kekuatan obat dalam pembuatannya juga dapat dievaluasi (Rakholiya et al., 2013). Obat yang tidak dapat diuji dengan cara kimia atau fisika dievaluasi dengan metode biologis.

A. *Bioassay*

Telah ditetapkan dengan baik bahwa potensi biologis dari kandungan suatu herbal tidak hanya disebabkan oleh satu kandungan saja, tetapi terdiri dari campuran unsur tanaman bioaktif dan sifat relatif dari senyawa bioaktif tunggal, tapi dapat bervariasi dari satu kelompok ke kelompok lainnya sementara aktivitas biologis tetap dalam batas yang diinginkan. Kebutuhan melakukan *Bioassay* :

- *Bioassay* membantu menentukan konsentrasi senyawa yang tidak diketahui selain potensinya.
- Zat yang digunakan dalam sistem biologi seperti obat-obatan, vaksin, toksin, desinfektan, antiseptik, dan lain-lain, dapat distandarisasi melalui *bioassay*.
- Kekhususan kandungan suatu senyawa dapat diamati dengan menggunakan uji bio, misalnya, identifikasi jenis bakteri yang dapat dipilih obat yang sesuai.
- Estimasi Vitamin B-12 dapat dilakukan dengan *bioassay*.
- Terkadang komposisi kimiawi sampel berbeda, tetapi memiliki aktivitas biologis yang sama, misalnya glikosida jantung yang diisolasi dari sumber yang berbeda, katekolamin, dan sebagainya.
- Untuk sampel di mana tidak ada metode pengujian lain yang tersedia, *bioassay* adalah pilihan yang dapat diandalkan.
- Jika metode kimiawi tidak tersedia, atau terlalu kompleks atau tidak sensitif terhadap dosis rendah *bioassay* dapat dilakukan.
- Penentuan profil efek samping, termasuk derajat toksisitas obat.

❖ Tipe – tipe *Bioassay*

a. Titik Akhir atau Uji Kuantal

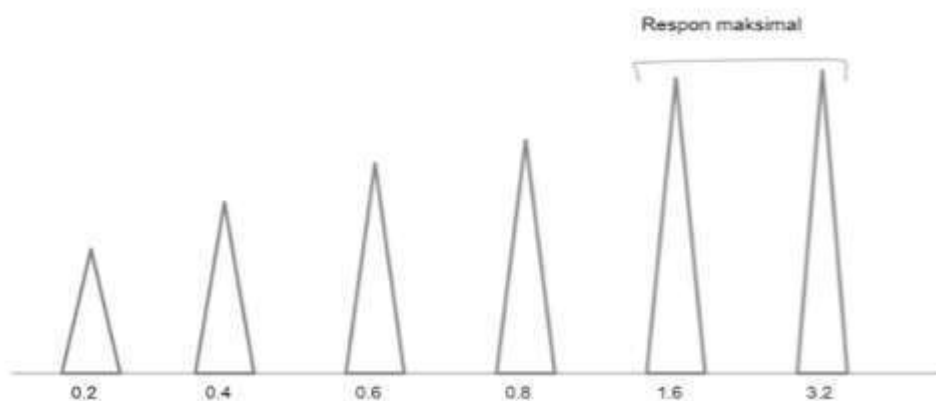
Ini adalah pengujian yang paling sederhana, yang menghasilkan respons "Semua atau Tidak Ada" pada hewan yang berbeda. Dalam *bioassay* ini, efek farmakologis yang dihasilkan oleh dosis ambang sampel ditentukan dan dibandingkan dengan obat atau larutan standar. Penentuan LD50 (LD = Lethal dose) atau ED50 (ED = efektif dosis) dilakukan dengan cara ini, misalnya digitalis obat gagal jantung diproduksi pada kucing, obat kejang hipoglikemik pada mencit, dan sebagainya.

b. Pengujian Tingkatan Respon

Respon yang dihasilkan dalam *bioassay* ini didasarkan pada dosis sampel. Ketika dosis sampel meningkat, ada peningkatan respons jaringan. Namun, setelah dosis tertentu, respons dosis jaringan tidak meningkat lebih jauh. Kondisi ini dikenal sebagai efek langit-langit. Kurva diperoleh dengan memplot grafik antara dosis dan respons masing-masing pada sumbu X dan Y (Gambar 4.3). Kurva berbentuk sigmoid, namun kurva garis lurus diperoleh dari dosis log.

Konsentrasi senyawa yang tidak diketahui =

$$\frac{\text{Dosis ambang batas larutan standar}}{\text{Dosis ambang batas larutan uji}} \times \text{Konsentrasi larutan standar}$$

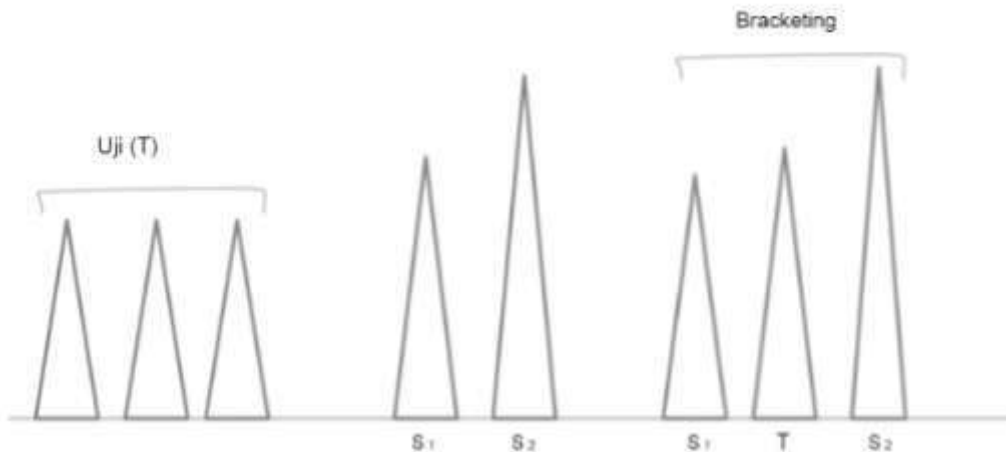


Gambar 4.3. Tingkatan Respon

Berdasarkan metode yang digunakan selama prosedur penilaian titik kadar untuk menentukan jenis aktivitas dan potensi sampel, empat metode pengujian diklasifikasikan sebagai:

1) Titik pencocokan atau metode *bracketing*

Dalam metode ini, berbagai dosis sampel uji diberikan dan dibandingkan dengan dosis konstan standar dengan cara yang sama seperti bracketing dengan meningkatkan dan menurunkan dosis sampel uji. Kekurangan dari metode ini adalah metode ini hanya dapat diterapkan jika sampel obat uji terlalu kecil dan sulit untuk memperkirakan margin kesalahan (Gambar 4.4), misalnya histamin pada ileum babi, hipofisis posterior pada rahim tikus, dan sebagainya.



Gambar 4.4. Metode Pencocokan

2) Uji interpolasi

Bioassay ini dilakukan untuk menentukan kuantitas persiapan potensi yang tidak diketahui yang menghasilkan efek signifikan pada hewan uji atau organ atau jaringan yang diisolasi dalam kondisi standar. Respon yang dihasilkan oleh yang tidak diketahui dinyatakan sebagai respon persentase dari standar, dan jumlah senyawa uji yang dibutuhkan untuk menghasilkan respon farmakologis yang sama dengan standar dibandingkan.

3) *Bioassay* banyak titik

Bioassay ini melibatkan interpolasi dan metode *bracketing*. Ini selanjutnya dapat dibagi menjadi 3 poin (2 + 1), 4 poin (2 + 2) dan 6 poin (3 + 3) *bioassay*. Prosedur 2 + 1 atau 2 + 2 ini diulangi sebanyak 3 kali atau 4 kali berdasarkan metode penyilangan semua sampel.

- Uji tiga titik (uji dosis 2 + 1)

Ini adalah cara yang cepat dan nyaman dan menunjukkan dua respons Standar (S) dan satu respons Uji (T). Caranya adalah kurva respons dosis log (LDR) diplot dengan konsentrasi yang berbeda dari larutan obat standar dan tes yang diberikan larutan. Dua dosis standar, Q₁ dan Q₂, dipilih dalam rasio 2: 3 dari bagian linier LDR dan tanggapan S₁ dan S₂ diperoleh, masing-masing. Satu uji dosis R dipilih dan mendapat respon T antara S₁ dan S₂. Data dicatat sebagai:

Q ₁	Q ₂	R
R	Q ₁	Q ₂
Q ₂	R	Q ₁
Q ₁	Q ₂	R

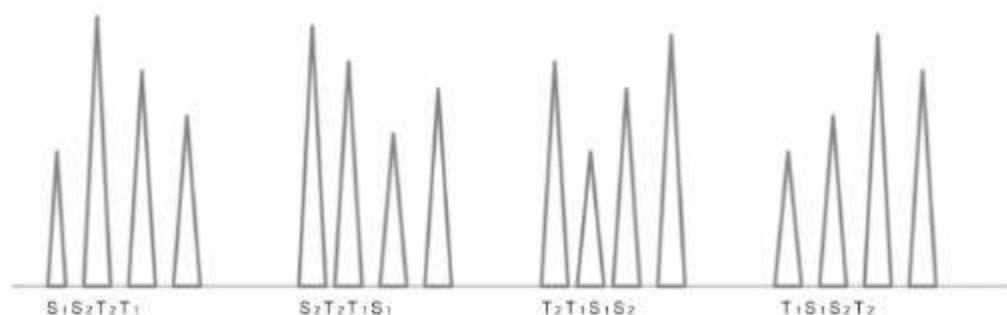
Perhitungan :

$$\text{Log rasio potensi [M]} = \frac{(T-S_1)}{(S_2-S_1)} \times \text{Log rasio dosis}$$

- Uji empat titik (uji dosis 2 + 2)

Ini menunjukkan dua tanggapan dari standar (S) dan dua tanggapan dari sampel uji (T), misalnya, bioassay Ach. Caranya adalah, kurva respons dosis log (LDR) diplot dengan konsentrasi berbeda dari larutan standar dan pengujian yang diberikan larutan. Dua dosis standar, yaitu Q 1 dan Q 2, dipilih dari bagian linier dari kurva respon dosis (DRC) dan tanggapan S1 dan S2 dicatat (Gambar 4.5). Dua dosis uji, R 1 dan R 2, dipilih dan tanggapan T1 dan T2 antara S1 dan S2 diperoleh. Di sini, $Q_2 / Q_1 = R_2 / R_1$. Data dicatat sebagai:

1	2	1	2
2	1	2	1
1	2	1	2
2	1	2	1



Gambar 4.5. Uji empat poin

B. Kontaminasi Mikroba

a. *Total Viable Aerobic Count* (TVC)

Jumlah total aerobik yang layak (TVC) dari bahan herbal yang diperiksa ditentukan dengan metode seperti filtrasi membran, jumlah pelat, atau pengenceran serial. Bakteri dan jamur aerobik (jamur dan ragi) ditentukan oleh TVC. Biasanya, level maksimum yang diizinkan ditetapkan untuk produk tertentu, tetapi ketika TVC melebihi level ini, maka tidak perlu melanjutkan dengan penentuan organisme tertentu, materi harus ditolak tanpa diuji lebih lanjut.

❖ Prosedur Pengujian

Jumlah pelat cawan petri dengan diameter 9–10 cm digunakan untuk bakteri. Kedalam salah satu cawan, tambahkan campuran 1 ml bahan herbal yang telah diolah sebelumnya dan tambahkan sekitar 15 mL agar kasein-kedelai cair pada suhu tidak melebihi 45 °C. Cara lainnya, oleskan secara rata bahan pada permukaan media yang dipadatkan dalam cawan petri. Jika perlu, encerkan bahan untuk mendapatkan jumlah koloni yang diharapkan tidak lebih dari 300. Siapkan setidaknya dua cawan menggunakan pengenceran yang sama, balikkan, dan inkubasi pada suhu 30–35 °C selama 48–72 jam, kecuali yang lebih dapat diandalkan hitungan diperoleh dalam periode waktu yang lebih singkat.

Gunakan filter membran dengan ukuran pori nominal tidak lebih dari 0,45 μm , dan dengan efektivitas yang telah terbukti dalam menahan bakteri. Misalnya, filter selulosa nitrat digunakan untuk larutan encer, berminyak, dan beralkohol lemah, sedangkan filter selulosa asetat lebih baik untuk larutan beralkohol kuat. Umumnya, digunakan cakram filter dengan diameter sekitar 50 mm. Namun, filter dengan diameter berbeda juga digunakan untuk menyesuaikan volume pengenceran dan pencucian yang sesuai.

b. Aflatoksin

Aflatoksin adalah zat beracun di spora jamur *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus*. Racun diketahui menghasilkan kanker pada manusia yang tinggal di daerah hangat dan lembab di dunia. Kapan pun pengujian untuk aflatoksin diperlukan, ini harus dilakukan setelah menggunakan prosedur pembersihan yang sesuai di mana harus sangat hati-hati untuk tidak memaparkan personel atau lingkungan kerja atau umum ke zat berbahaya dan beracun ini. Kacang dan sereal yang disimpan terkontaminasi oleh jamur. Keberadaan aflatoksin dapat ditentukan dengan metode kromatografi menggunakan campuran aflatoksin standar B1, B2, G1, dan G2. Kuantitas aflatoksin yang direkomendasikan adalah, jika menggunakan metode IP, tidak lebih dari 2 $\mu\text{g} / \text{kg}$ aflatoksin B1 dan aflatoksin total 4 $\mu\text{g} / \text{kg}$, dan metode dari farmakope Amerika (USP), tidak lebih dari 5 ppb aflatoksin B1 dan total aflatoksin 20 ppb. Berdasarkan Perka BPOM nomor 12 tahun 2014, kadar aflatoksin total (aflatoksin B1, B2, G1, dan G2) $\leq 20 \mu\text{g} / \text{kg}$ dengan syarat aflatoksin B1 $\leq 5 \mu\text{g} / \text{kg}$.

C. Standarisasi Toksikologi

a. Pestisida

Jamu dan produk herbal harus bebas dari bahan kimia beracun atau setidaknya dikendalikan untuk tidak adanya tingkat yang tidak aman (WHO, 2017). Obat-obatan herbal dapat mengandung residu pestisida yang terakumulasi selama proses pertanian, seperti penyemprotan, perawatan tanah selama budidaya, dan pemberian fumigasi selama penyimpanan. Banyak pestisida mengandung klorin dalam molekulnya, yang dapat diukur dengan analisis total dari klorin organik. Dengan cara yang sama, insektisida yang mengandung fosfat dapat dideteksi dengan mengukur fosfor organik total. Jenis yang berbeda dari pestisida adalah fungisida, herbisida, insektisida, acaricid, nematocid, rodenticid, dan bakterisida.

Kromatografi (kebanyakan kolom dan gas) direkomendasikan sebagai metode utama untuk menentukan residu pestisida. Kromatografi kolom dan gas (GC) paling sering digunakan. Metode ini dapat digabungkan dengan spektrometri massa (MS). Kotoran yang ada dalam jamu dihilangkan dengan partisi dan / atau kromatografi adsorpsi, dan masing-masing pestisida diukur dengan GC, MS atau GC-MS. WHO telah menetapkan batasan umum untuk residu pestisida dalam pengobatan (World Health Organization, 2011).

Sebaiknya uji bahan herbal yang tidak diketahui dengan kelompok senyawa yang luas daripada untuk masing-masing pestisida. Berbagai cara tersedia, yaitu pestisida

yang mengandung klorin dalam molekulnya dapat dideteksi dengan pengukuran total klorin organik. Insektisida yang mengandung fosfat dapat diukur dengan analisis fosfor organik total, sedangkan pestisida yang mengandung arsen dan timbal dapat dideteksi masing-masing dengan pengukuran arsen total atau timbal total. Demikian pula, pengukuran total terikat karbon disulfida dalam sampel akan memberikan informasi apakah ada residu dari famili fungisida dithiocarbamate. Pestisida lain yang berasal dari tumbuhan adalah daun tembakau dan nikotin, bunga piretrum, ekstrak piretrum, dan piretroid, akar derris dan rotenoid.

D. Penentuan Residu Pestisida

Batas sisa yang dapat diterima (ARL) dari pestisida bahan tanaman dalam mg per kg dapat dihitung berdasarkan asupan harian maksimum yang dapat diterima dari pestisida untuk manusia seperti yang direkomendasikan oleh WHO dan asupan harian rata-rata dari bahan tanaman obat. Kandungan pestisida tidak boleh lebih dari 1%.

$$ARL = \frac{ADI \times E \times 60}{MDI \times 100}$$

Dimana :

ADI = Asupan maksimum pestisida harian (mg / kg berat badan)

E = Faktor ekstraksi, yang menentukan laju transisi pestisida dari bahan tumbuhan ke dalam bentuk sediaan

MDI = Rata-rata asupan harian tumbuhan obat

60 = Berat badan dewasa (Dalam pembilang)

100 = Faktor konsumsi (Dalam penyebut)

E. Penentuan Arsenik & Logam Berat

Kontaminasi oleh logam beracun bisa tidak disengaja atau disengaja. Kontaminasi logam berat seperti merkuri, timbal, tembaga, kadmium, dan arsen pada obat herbal dapat dikaitkan dengan banyak penyebab, termasuk pencemaran lingkungan, dan dapat menimbulkan bahaya yang relevan secara klinis bagi kesehatan pengguna dan oleh karena itu harus dibatasi. Arsenik dan logam berat berbahaya bahkan dalam jumlah kecil dan harus dihilangkan dari obat-obatan herbal. Arsenik melimpah di alam dan keberadaannya dalam bahan herbal seharusnya tidak berbeda dengan keberadaannya yang luas dalam makanan. Spektrometri serapan atom (SSA / AAS) digunakan untuk menentukan jumlah atau konsentrasi logam berat tertentu. AAS menggunakan fenomena bahwa atom dalam keadaan dasar menyerap cahaya dengan panjang gelombang tertentu, karakteristik atom tertentu, ketika cahaya melewati lapisan uap atom unsur yang akan ditentukan. Kontaminasi bahan tanaman obat dengan arsen dan logam berat dapat dikaitkan dengan banyak penyebab, termasuk pencemaran lingkungan dan jejak pestisida. Isi timbal dan kadmium dapat ditentukan dengan voltametri terbalik atau dengan spektrofotometri emisi

atom. Jumlah maksimum bahan tanaman kering berikut ini, yang didasarkan pada nilai ADI, diusulkan untuk timbal (10 mg / kg) dan kadmium (0,3 mg / kg).

Pelabelan produk herbal harus tepat untuk mengurangi risiko penggunaan yang tidak tepat dan reaksi yang merugikan. Informasi tentang mutu jamu kepada konsumen merupakan fenomena penting terkait keamanan penggunaan jamu. Label adalah sumber utama pemberian informasi jamu. Sayangnya, tidak ada organisasi atau badan pemerintah yang mengesahkan jamu atau suplemen sebagai diberi label dengan benar. Adalah kebenaran yang sama bahwa label obat herbal seringkali tidak dapat dipercaya untuk mengungkapkan apa yang ada di dalam wadah. Kata tersebut tidak dapat dianggap "standar" seperti yang tertulis pada label karena tidak ada definisi hukum dari kata tersebut "Standar." Produk telah diproduksi sesuai standar farmakope, daftar bahan aktif dan jumlahnya, petunjuk mengenai dosis dan frekuensi asupan obat, harus ada pada label.

4.3. Validasi

Validasi produk herbal merupakan langkah penting menuju standarisasi jamu di mana penipu yang menjual jamu oplosan adalah hal biasa. Hal ini diperlukan untuk memastikan validasi ilmiah dan pemantauan berkala terhadap kualitas dan khasiat produk herbal oleh pengawas obat di mana produk herbal dipasarkan sebagai agen terapeutik, dan terlepas dari apakah produk tersebut benar-benar memiliki efek positif untuk menyembuhkan dan mengurangi keparahan penyakit. Validasi adalah proses untuk membuktikan bahwa metode analisis dapat diterima untuk tujuan yang dimaksudkan untuk metode farmasi. Ini mencakup studi tentang spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, jangkauan, deteksi, dan batas kuantitatif, tergantung pada apakah metode analisis yang digunakan adalah kualitatif atau kuantitatif (Ernst, 2000).

Dimungkinkan bahwa pengenalan validasi ilmiah akan mengontrol produksi produk herbal yang tidak murni atau dipalsukan dan pada akhirnya akan memastikan penggunaan rasionalnya. Hal ini mengarah pada regulasi industri sehingga hanya personel yang memenuhi syarat dan penyedia kesehatan yang diizinkan untuk meresepkan obat. Dianjurkan untuk menggunakan monograf resmi yang diterbitkan di farmakope sehingga standar ditentukan dan tersedia, dan bahwa prosedur analitis yang digunakan divalidasi sepenuhnya. Ini sangat penting, karena validasi bisa menjadi proses yang memakan waktu. Dianjurkan untuk menggunakan monograf resmi yang diterbitkan di farmakope sehingga standar ditentukan dan tersedia, dan bahwa prosedur analitis yang digunakan divalidasi sepenuhnya. Ini sangat penting, karena validasi bisa menjadi proses yang memakan waktu. Dianjurkan untuk menggunakan monograf resmi yang diterbitkan di farmakope sehingga standar ditentukan dan tersedia, dan bahwa prosedur analitis yang digunakan divalidasi sepenuhnya. Ini sangat penting, karena validasi bisa menjadi proses yang memakan waktu.

Latihan 4

1. Standarisasi suatu sediaan obat tradisional adalah suatu persyaratan yang harus dipenuhi agar terwujudnya keberulangan terhadap kualitas formula maupun terapeutik. Berdasarkan hal tersebut, standarisasi dikelompokkan menjadi 3, yaitu
2. Kontrol kualitas adalah istilah yang mengacu pada proses yang terlibat dalam menjaga kualitas dan validitas produk yang diproduksi. Pengendalian mutu didasarkan pada tiga definisi penting pada farmakope, yaitu
3. Stimuno merupakan salah satu produk fitofarmaka. Yang dimaksud dengan fitofarmaka adalah
4. Skrining fitokimia adalah tahap awal dari uji kualitatif secara kimiawi, meliputi....
5. Mendeteksi arsenik & logam berat pada ekstrak herbal menggunakan alat

Jawaban 4

1. Jawaban :
 - Standarisasi Bahan : Sediaan bisa berupa simplisia atau ekstrak terstandar/bahan aktif yang diketahui kadarnya.
 - Standarisasi Produk : Kandungan bahan aktif tetap/stabil
 - Standarisasi Proses : Metode proses dan peralatan dalam pembuatan sesuai dengan Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik (CPOTB).
2. Jawaban :
 - a. Identitas
Identitas dapat dilihat dengan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Jika ada suatu penyakit pada suatu tumbuhan dapat menyebabkan perubahan pada tampilan fisik tumbuhan dan menyebabkan kesalahan identifikasi.
 - b. Kemurnian
Kemurnian terkait erat dengan penggunaan obat-obatan yang aman dan berkaitan dengan faktor-faktor seperti nilai abu, kontaminan (misalnya ada benda asing dalam bentuk tumbuhan lain), dan logam berat. Namun, karena penerapan metode analisis yang lebih baik, evaluasi kemurnian modern juga mencakup kontaminasi mikroba, aflatoxin, radioaktivitas, dan residu pestisida. Metode analisis seperti analisis fotometrik (UV, IR, MS, dan NMR), KLT, HPLC, dan GC dapat digunakan untuk menetapkan komposisi yang konstan dari sediaan herbal.
 - c. Kandungan atau Pengujian
Kandungan adalah properti yang paling sulit untuk dinilai, karena umumnya jamu mempunyai kandungan aktif yang tidak diketahui. Kadang-kadang penanda (*marker*) dapat digunakan berdasarkan definisi, kontrol kandungan dapat ditentukan secara kimiawi, terlepas dari apakah penanda memiliki aktivitas terapeutik atau tidak.
3. Jawaban:
Fitofarmaka adalah produk yang mengandung bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian/galenik atau campuran dari bahan tersebut yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara

ilmiah dengan uji praklinik dan uji klinik, serta bahan baku dan produk jadinya telah distandarisasi.

4. Jawaban:

Deteksi alkaloid, Deteksi karbohidrat & glikosida, Deteksi fitosterol, Deteksi minyak & lemak tetap, Deteksi saponin, Deteksi fenolik & tannin, Deteksi protein & asam amino bebas, Deteksi gom & mucilage, Deteksi minyak atsiri.

5. Jawaban: AAS (*Atomic Absorption Spectrofotometer*)

Rangkuman 4

Obat herbal biasanya merupakan campuran dari banyak konstituen. Banyak herbal yang belum diketahui bahan aktifnya. Metode analisis selektif atau senyawa referensi mungkin tidak tersedia secara komersial. Kebutuhan akan standarisasi jamu saat ini sangat penting mengingat penerimaan global terhadap produk jamu sebagai obat untuk berbagai penyakit ringan dan penyakit berat. Jaminan keamanan dan khasiat obat herbal memerlukan pemantauan kualitas produk mulai dari pengumpulan hingga pemrosesan hingga produk jadi. Pedoman yang ketat harus diikuti untuk keberhasilan produksi obat herbal yang berkualitas. Diantaranya adalah identifikasi tumbuhan yang tepat, skrining fitokimia, dan standarisasi. Pedoman WHO adalah pendekatan universal yang direkomendasikan yang harus diikuti oleh berbagai badan pemerintah untuk pengendalian kualitas herbal dan monografi herbal. Ini harus disiapkan dengan menggunakan berbagai parameter kualitas. Ini akan memperkuat proses pengaturan dan meminimalkan pelanggaran kualitas. Pengendalian mutu dan standarisasi obat herbal dilakukan melalui beberapa tahapan. Sumber dan kualitas bahan baku serta praktik pertanian yang baik dan proses pembuatannya tentunya merupakan langkah penting untuk pengendalian mutu obat herbal dan berperan sangat penting dalam menjamin kualitas dan stabilitas sediaan herbal.

Test Formatif 4

1. Produk yang mengandung bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian/galenik atau campuran dari bahan tersebut yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinik dan uji klinik, serta bahan baku dan produk jadinya telah distandarisasi, disebut
 - a. Jamu
 - b. Simplisia
 - c. Obat herbal terstandar
 - d. Sediaan galenic
 - e. Fitofarmaka

2. Warna, bau, kenampakan, kejernihan, viskositas, kadar air, pH, waktu hancur, kerapuhan, kekerasan, daya alir, flokulasi, sedimentasi, laju pengendapan, dan nilai abu, termasuk parameter secara
 - a. Fisika
 - b. Biologi
 - c. Kimia
 - d. Organoleptik
 - e. Mikrobiologi

3. Dalam metode ini, bahan dipotong dengan pisau dan diiris halus dari kiri atas ke kanan bawah dalam satu gerakan. Hindari menggergaji secara maju mundur, jaga agar spesimen dan pisau tetap dilumasi dengan air....
 - a. *Free hand mounting*
 - b. *Glide mounting*
 - c. *Paraffin mounting*
 - d. *Cryologi mounting*
 - e. *Kloral hidrat mounting*

4. Semua partikel akan melewati saringan No.22, dan tidak lebih dari 40% melalui saringan No.60. merupakan kategori derajat kehalusan serbuk berdasarkan FI IV yaitu
 - a. Halus (22/60)
 - b. Kasar (22/60)
 - c. Agak kasar (22/60)
 - d. Sangat kasar (22/60)
 - e. Sangat halus (22/60)

5. Menurut Perka BPOM nomor 12 tahun 2014, kadar air dari suatu sediaan simplisia adalah
 - a. $\leq 5\%$
 - b. $\leq 10\%$
 - c. $\leq 15\%$
 - d. $\leq 20\%$
 - e. $\leq 25\%$

Jawaban Tes Formatif 4

1. E
2. A
3. A
4. C
5. B

MATERI 5: METODE UJI PARAMETER NON SPESIFIK

Metode Pembelajaran	Estimasi Waktu	CPMK
<ul style="list-style-type: none"> • Kuliah Interaktif • Diskusi • <i>Question Based Learning</i> 	150 menit	<ul style="list-style-type: none"> • CPMK-4: Menunjukkan penguasaan konsep teoritis tentang standarisasi dan penentuan marker Obat Bahan Alam ;(CPL-4)

5.1. Pendahuluan

Standardisasi didefinisikan sebagai kualitas suatu sediaan farmasi yang memiliki nilai tetap dan reproduibel, serta menentukan jumlah minimum dari satu atau beberapa komponen yang terkandung di dalamnya. Tujuan dari standardisasi obat tradisional adalah untuk menyediakan produk yang terstandar, reproduibel, dan memiliki kualitas tinggi, serta memberikan rasa aman dan meningkatkan kepercayaan masyarakat terhadap obat tradisional. Standardisasi mutu ekstrak dilakukan untuk memenuhi parameter standar umum (non spesifik) dan parameter standar spesifik. Parameter standar non spesifik adalah semua aspek yang tidak terkait dengan aktifitas farmakologi secara langsung namun mempengaruhi aspek keamanan dan stabilitas ekstrak serta sediaan yang dihasilkan. Standardisasi dan analisis aspek nonspesifik diarahkan pada batas maksimal yang diperkenankan terhadap material berbahaya yang ada di dalam ekstrak meliputi kadar air, bobot jenis, susut pengeringan, sisa pelarut, kadar abu, cemaran mikroba, cemaran logam berat, dan cemaran residu pestisida (Depkes RI, 2000).

5.2. Penetapan Kadar Air

Pengertian penetapan kadar air adalah pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan dilakukan dengan cara yang tepat diantara cara titrasi, destilasi atau gravimetri. Tujuan dari penetapan kadar air adalah menetapkan residu air setelah proses pengentalan atau pengeringan ekstrak. Pengukuran kadar air dapat ditentukan dengan metode:

A. Titrasi langsung

Kecuali dinyatakan lain, masukkan lebih kurang 20 ml metanol P ke dalam labu titrasi. Titrasi dengan pereaksi Karl Fischer hingga titik akhir tercapai. Masukkan dengan cepat sejumlah zat yang ditimbang seksama yang diperkirakan mengandung 10 mg sampai 50 mg air, ke dalam labu titrasi, aduk selama 1 menit. Titrasi dengan pereaksi Karl Fischer yang telah diketahui kesetaraan airnya. Hitung jumlah air dalam mg dengan rumus:

$$V \times F$$

Dimana :

V = Volume pereaksi Karl Fischer pada titrasi kedua

F = Faktor kesetaraan air.

B. Titrasi tidak langsung

Masukkan lebih kurang 20 ml metanol P ke dalam labu titrasi. Titrasi dengan pereaksi dari Karl Fischer hingga titik akhir tercapai. Masukkan dengan cepat sejumlah zat yang ditimbang seksama yang diperkirakan mengandung 10 mg sampai 50 mg air, campur. Tambahkan pereaksi Karl Fischer berlebihan dan yang diukur seksama, biarkan selama beberapa waktu hingga reaksi sempurna. Titrasi kelebihan pereaksi dengan larutan baku air-metanol. Hitung jumlah dalam mg, air, dengan rumus:

$$FV1 - aV2$$

Dimana :

F = faktor kesetaraan air pereaksi *Karl Fischer*,

V1 = volume dalam ml pereaksi *Karl Fischer* yang diukur seksama

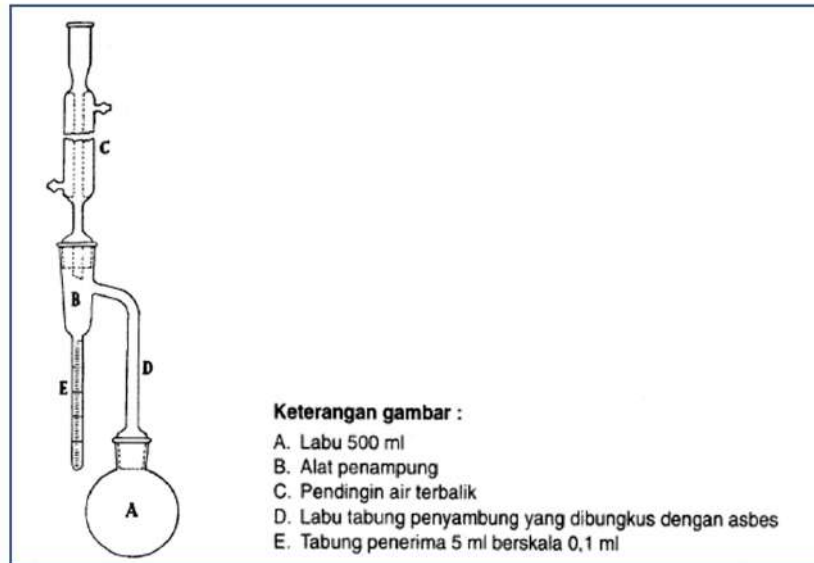
a = kadar cair dalam mg tiap ml dari larutan baku air-metanol

V2 = volume dalam ml larutan baku air-metanol.

C. Destilasi

Ke dalam labu kering masukkan sejumlah zat yang ditimbang seksama yang diperkirakan mengandung 2 ml sampai 4 ml air. Jika zat berupa pasta, timbang dalam sehelai lembaran logam dengan ukuran yang sesuai dengan leher labu. Untuk zat yang dapat menyebabkan gejala mendadak, tambahkan pasir kering yang telah dicuci secukupnya hingga mencukupi dasar labu atau sejumlah tabung kapiler, panjang lebih kurang 100 mm yang salah satu ujungnya tertutup. Masukkan lebih kurang 200 ml toluen ke dalam labu, hubungkan alat. Tuang toluen ke dalam tabung penerima melalui alat pendingin. Panaskan labu hati-hati selama 15 menit.

Setelah toluen mula mendidih, suling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, cuci bagian dalam pendingin dengan toluen, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluen. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Biarkan tabung penerima pendingin hingga suhu kamar. Jika ada tetes air yang melekat pada pendingin tabung penerima, gosok dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan basahi dengan toluen hingga tetesan air turun. Setelah air dan toluen memisah sempurna, baca volume air. Hitung kadar air dalam %.



Gambar 5.1. Alat destilasi

D. Gravimetri

Masukkan lebih kurang 10 g ekstrak dan timbang saksama dalam wadah yang telah ditara. Keringkan pada suhu 105 °C selama 5 jam dan ditimbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%. Penetapan kadar air dengan metode ini tidak sesuai untuk ekstrak yang mempunyai kandungan minyak atsiri tinggi. Dalam hal demikian metode ini lebih tepat disebut penetapan susut pengeringan.

5.3. Penentuan Bobot Jenis

Pengertian penentuan bobot jenis adalah masa per satuan volume pada suhu kamar tertentu (25 °C) yang ditentukan dengan alat khusus piknometer atau alat lainnya. Tujuan penentuan bobot jenis adalah memberikan batasan tentang besarnya masa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang dan memberikan gambaran kandungan kimia terlarut.

❖ **Prosedur:**

Gunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25 °C. Atur hingga suhu ekstrak cair lebih kurang 20 °C, masukkan ke dalam piknometer. Atur suhu piknometer yang telah diisi hingga suhu 25 °C, buang kelebihan ekstrak cair dan ditimbang. Kurangkan bobot piknometer kosong dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25 °C.

Rumus:

$$BJ = \frac{\text{Pikno+Ekstrak}}{\text{Pikno+Air}} \times BJ \text{ Air}$$

5.4. Penetapan Susut Pengerinan

Pengertian penetapan susut pengerinan adalah pengukuran sisa zat setelah pengerinan pada temperatur 105 °C selama 30 menit atau sampai berat konstan, yang dinyatakan sebagai nilai prosen. Dalam hal khusus (jika bahan tidak mengandung minyak menguap/atsiri dan sisa pelarut organik menguap) identik dengan kadar air, yaitu kandungan air karena berada di atmosfer/lingkungan udara terbuka. Tujuan penetapan susut pengerinan adalah untuk memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengerinan.

❖ **Prosedur:**

Botol timbang dangkal bertutup dalam kondisi kosong dipanaskan 105 °C selama 30 menit, dinginkan, tara. Masukkan 1-2 g ekstrak, ratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol, hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm. Jika ekstrak yang diuji berupa ekstrak kental, ratakan dengan bantuan pengaduk. Masukkan ke dalam oven, buka tutupnya dan keringkan pada suhu 105 °C selama 30 menit. Dalam keadaan tertutup dinginkan dlm eksikator hingga suhu kamar, timbang.

Catatan:

- Sebelum tiap pengerinan, biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator.
- Jika sulit kering dan mencair pada pemanasan, tambahkan 1 g silika yg telah ditimbang seksama (sebelumnya silika dikeringkan dan disimpan dalam eksikator sampai suhu kamar). Campuran ekstrak+silika dipanaskan lagi pada suhu tersebut sampai bobot tetap.
- Lakukan hingga bobot tetap: perbedaan 2x penimbangan berturut-turut setelah dikeringkan/dipijar selama 1 jam < 0,25% atau perbedaan penimbangan tsb < 0,5 mg.

5.5. Penetapan Sisa Pelarut

Pengertian penetapan sisa pelarut adalah menentukan kandungan sisa pelarut tertentu (yang memang ditambahkan) yang secara umum dengan kromatografi gas. Untuk ekstrak cair berarti kandungan pelarutnya, misalnya kadar alkohol. Tujuan penetapan sisa pelarut adalah memberikan jaminan bahwa selama proses tidak meninggalkan sisa pelarut yang memang seharusnya tidak boleh ada. Sedangkan untuk ekstrak cair menunjukkan jumlah pelarut (alkohol) sesuai dengan yang ditetapkan.

A. Cara Destilasi (Penetapan Kadar Etanol)

Kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi, lakukan penetapan dengan cara destilasi. Cara ini sesuai untuk penetapan sebagian besar ekstrak cair dan tingtura asalkan kapasitas labu destilasi cukup (umumnya 2 sampai 4 kali cairan yang akan dipanaskan) dan kecepatan destilasi diatur sedemikian sehingga diperoleh destilat yang jernih. Destilat yang keruh dapat dijernihkan dengan pengocokan menggunakan talk P atau kalsium karbonat P, saring, setelah itu suhu filtrat diatur dan kandungan etanol ditetapkan dari bobot jenis. Lakukan semua pekerjaan dengan hati-hati untuk mengurangi kehilangan etanol oleh penguapan.

Untuk mencegah buih yang mengganggu dalam cairan selama destilasi. tambahkan asam kuat seperti asam fosfat P, asam sulfat P atau asam tanat P atau cegah dengan penambahan

larutan kalsium klorida P sedikit berlebih, atau sedikit parafin P atau minyak silikon sebelum destilasi. Cegah gejala selama destilasi dengan penambahan keping-keping berpori dari bahan yang tidak larut seperti silikon karbida P, atau manik-manik.

Cara untuk cairan yang diperkirakan mengandung etanol 30% atau kurang. Pipet tidak kurang dari 25 ml cairan uji ke dalam alat destilasi yang sesuai, catat destilasi hingga diperoleh destilat lebih kurang 2 ml lebih kecil dari volume cairan uji yang dipipet. Atur suhu destilat hingga sama dengan suhu pada waktu pemipetan. Tambahkan air secukupnya hingga volume sama dengan volume cairan uji. Destilat jernih atau keruh lemah dan hanya mengandung lebih dari sesepora sisa zat mudah menguap lainnya. Tetapkan bobot jenis cairan pada suhu 25°C seperti yang tertera pada Penetapan Bobot Jenis. Hitung persentase dalam volume dari etanol dalam cairan menggunakan Tabel Bobot Jenis dan Kadar Etanol.

Untuk cairan yang diperkirakan mengandung etanol lebih dari 30%, lakukan menurut cara di atas, lebih kurang dua kali volume cairan uji. Kumpulkan destilat hingga lebih kurang 2 ml lebih kecil dari dua kali volume cairan uji yang dipipet, atur suhu sama dengan cairan uji. Tambahkan air secukupnya hingga volume dua kali volume cairan uji yang dipipet, campur, dan tetapkan bobot jenis. Kadar etanol dalam volume destilat, sama dengan setengah kadar etanol dalam cairan uji etanol atau kurang. Pipet 25 ml cairan uji, masukkan ke dalam corong pisah, tambahkan air volume sama. Jenuhkan campuran dengan natrium klorida P, tambahkan 25 ml heksana P dan kocok untuk mengekstraksi zat mudah menguap lain yang mengganggu. Pisahkan lapisan bawah ke dalam corong pisah kedua. Ulangi ekstraksi dua kali, tiap kali dengan 25 ml heksana P. Ekstraksi kumpulan larutan heksana P tiga kali, tiap kali dengan 10 ml larutan jenuh natrium klorida P. Destilasi kumpulan larutan garam, tampung destilat hingga sejumlah volume mendekati volume cairan uji semula.

Untuk cairan yang diperkirakan mengandung etanol lebih dari 50% encerkan cairan uji dengan air hingga kadar etanol lebih kurang 25%, kemudian lanjutkan menurut cara di atas mulai dari "Jenuhkan campuran dengan natrium klorida P..." Jika hanya mengandung sedikit minyak atsiri dan hasil destilasi keruh, perlakuan dengan pelarut heksana P seperti di atas tidak dilakukan, destilat dapat dijernihkan dan dapat digunakan untuk penetapan bobot jenis dengan mengocok dengan heksana P lebih kurang seperlima bagian volume atau dengan penyaringan melalui lapisan tipis talk.

B. Cara Kromatografi Gas-Cair

Alat kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dan kolom kaca 1,8 m X 4 mm berisi fase diam 53 dengan ukuran partikel 100 mesh hingga 120 mesh. Gunakan nitrogen P atau helium P sebagai gas pembawa. Sebelum digunakan kondisikan kolom semalam pada suhu 235°C alirkan gas pembawa dengan laju aliran lambat. Atur aliran gas pembawa dan suhu (lebih kurang 120°C) sehingga baku internal asetone nitril tereluasi dalam waktu 5 menit sampai 10 menit.

❖ Larutan

• *Larutan baku I.*

Encerkan 5,0 ml etanol mutlak P dengan air hingga 250,0 ml.

• *Larutan baku internal.*

Encerkan 5,0 ml asetone nitril P dengan air hingga kadar etanol lebih kurang 2% v/v.

- *Larutan uji II.*
Pipet masing-masing 10 ml larutan uji I dan larutan baku internal ke dalam labu tentukur 100 ml, encerkan dengan air sampai tanda,
- *Larutan baku II.*
Pipet masing-masing 10 ml larutan baku I dan larutan baku internal ke dalam labu tentukur 100 ml, encerkan dengan air sampai tanda.
- *Prosedur.*
Suntikkan masing-masing 2 kali, lebih kurang 0,5 ml larutan uji II dan larutan baku II ke dalam kromatograf. rekam kromatogram dan tetapkan perbandingan respons puncak. Hitung persentase etanol.

5.6. Penetapan Kadar Abu

Prinsip penetapan kadar abu adalah dengan cara bahan dipanaskan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik. Tujuannya adalah memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Kadar abu dinyatakan dalam % (b/b).

A. Penetapan Kadar Abu Total

Lebih kurang 2-3 g ekstrak yang telah digerus dan ditimbang saksama, dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, ratakan. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan, timbang. Jika cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas 2 ml, saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

B. Penetapan Kadar Abu Larut dalam Air

Abu yang diperoleh dari kadar abu total, didihkan dengan 25 ml aquades (tutup dgn kaca arloji) selama 5 menit. Kumpulkan bagian yang tidak larut dalam air, saring dengan kertas saring bebas abu. Bilas dengan dgn air panas, pijarkan bahan yg larut air dalam krus di dalam oven pada suhu >450 °C selama 15 menit hingga bobot tetap, dinginka dlm desikator 30 menit dan ditimbang. Hitung kadar abu yang tidak larut asam terhadap bahan yang telah dikeringkan.

C. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Dalam Asam

Tujuan: ukur keberadaan cemaran silika dari pasir/tanah. Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, didihkan dengan 25 ml asam sulfat encer P (tutup dengan kaca arloji) selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijarkan hingga bobot tetap, dinginkan dlm desikator 30 menit dan timbang. Hitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

5.7. Penetapan Cemaran Mikroba

Pengertian penetapan cemaran mikroba adalah menentukan adanya mikroba patogen secara analisis mikrobiologi. Tujuannya yaitu memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak boleh mengandung mikroba patogen dan non patogen melebihi batas yang ditetapkan yang akan berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan berbahaya bagi kesehatan. Batasan cemaran mikroba:

- ALT : < 104 kol/g
- MPN coliform : < 3 kol/g
- Angka kapang /kamir : < 103 kol/g
- Mikroba patogen : negatif (*Salmonella thypi*, *E. Coli*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus flavus*, *S.aureus*)

A. Penetapan Angka Lempeng Total (ALT)

- Prinsip:
Pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada media lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai.
- Media : *Plate Count Agar* (PCA)
- Perekasi :
Pepton dilution Fluid (PDF), *Fluid Casein Digest Soy Lecithin Polysorbat* (FCDSL), minyak mineral (parafin cair), tween 80 dan 20.

❖ Prosedur:

Disiapkan 5 buah tabung atau lebih yang masing-masing telah diisi dengan 9 ml pengencer PDF. Dari hasil homogenisasi pada penyiapan contoh dipipet pengenceran 10:1 sebanyak 1 ml ke dalam tabung yang berisi pengencer PDF pertama hingga diperoleh pengenceran 10:2 dan dikocok hingga homogen. Dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10:6 atau sesuai dengan yang diperlukan. Dari setiap pengenceran dipipet 1 ml ke dalam cawan petri dan dibuat duplo. Ke dalam tiap cawan petri dituangkan 15-20 ml media PCA ($45 \pm 1^\circ$). Segera cawan petri digoyang dan diputar sedemikian rupa hingga suspensi tersebar merata. Untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer dibuat uji kontrol (blangko). Pada satu cawan hanya diisi 1 ml pengencer dan media agar, dan pada cawan yang lain diisi pengencer dan media. Setelah media memadat, cawan petri diinkubasi pada suhu 35- 37 °C selama 24-48 jam dengan posisi terbalik. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung.

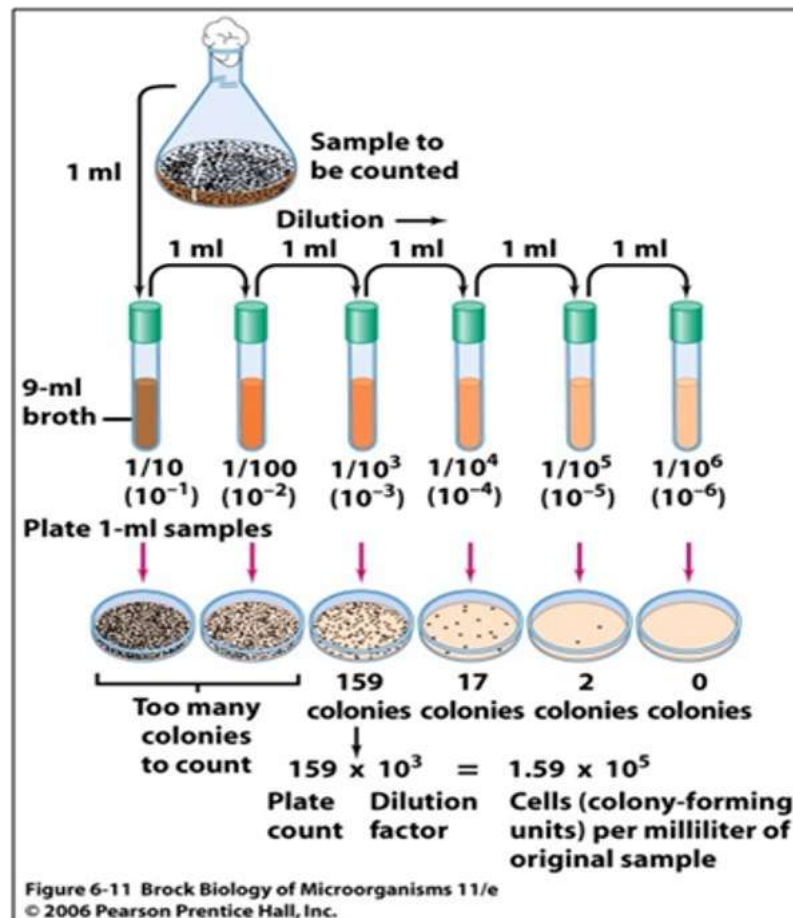
❖ Penghitungan :

Dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 30-300. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Hasil dinyatakan sebagai Angka Lempeng Total dalam tiap gram contoh. Bila ditemui jumlah koloni kurang dari 30 atau lebih dari 300, maka diikuti petunjuk sebagai berikut :

- 1) Bila hanya salah satu di antara kedua cawan yang menunjukkan jumlah antara 30-300 koloni, dihitung rata-rata dari kedua cawan dan dikalikan dengan faktor pengenceran
- 2) Bila pada cawan petri dari dua tingkat pengenceran yang berurutan menunjukkan jumlah antara 30-300 koloni, maka dihitung jumlah koloni dan dikalikan faktor pengenceran kemudian diambil angka rata-rata. Jika pada tingkat pengenceran yang

lebih tinggi didapati jumlah koloni lebih besar dari dua kali jumlah koloni yang seharusnya, maka dipilih tingkat pengenceran terendah (misal pada pengenceran 10⁻² diperoleh 140 koloni dan pada pengenceran 10⁻³ diperoleh 32 koloni, maka dipilih jumlah koloni pada tingkat pengenceran 10⁻².

- 3) Bila dari seluruh cawan petri tidak ada satupun yang menunjukkan jumlah antara 30-300 koloni, maka dicatat angka sebenarnya dari tingkat pengenceran terendah dan dihitung sebagai Angka Lempeng Total Perkiraan
- 4) Bila tidak ada pertumbuhan pada semua cawan dan bukan disebabkan karena faktor inhibitor, maka Angka Lempeng Total dilaporkan sebagai kurang dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah.
- 5) Bila jumlah koloni per cawan lebih dari 3000, maka cawan dengan tingkat pengenceran tertinggi dibagi dalam beberapa sektor (2, 4 atau 8). Jumlah koloni dikalikan dengan faktor pembagi dan faktor pengencerannya, hasil dilaporkan sebagai Angka Lempeng Total Perkiraan.
- 6) Bila jumlah koloni lebih dari 200 pada 1/8 bagian cawan, maka jumlah koloni adalah 200 x 8 x faktor pengenceran. Angka Lempeng Total Perkiraan dihitung sebagai lebih besar dari jumlah koloni yang diperoleh.



Gambar 5.2. Prosedur Penetapan ALT

B. Uji Nilai Dugaan Terdekat (MPN) Coliform

- Prinsip:

Melihat adanya pertumbuhan bakteri coliform setelah cuplikan diinokulasi pada media yang sesuai. Adanya reaksi fermentasi dan pembentukan gas di dalam tabung durham menandakan adanya bakteri coliform.

- Media dan Pereaksi :

PDF, MCB/LB, BGLB, EMBA, VRBA, MR-VP, Trypton Broth, Simmon's Citrate Agar, Nutrient agar.

❖ Prosedur uji ada 3 tahap :

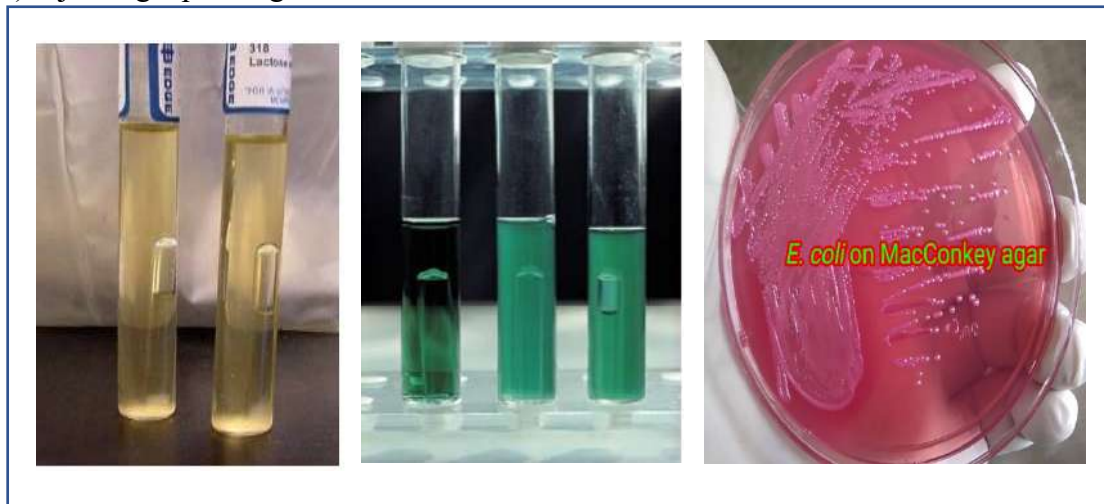
1) Uji Prakiraan / Presumptive Test

Memakai media Mac Conkey Broth (MCB) atau Lactosa Broth (LB) dalam tabung reaksi yg didalam nya ada tb durham, inokulasi sample dan inkubasi 24 - 48 jam pd suhu 37°C, hasil yang positif lanjut ke uji konfirmasi.

2) Uji Konfirmasi

Memakai media BGLB dalam tabung reaksi yg didalam nya ada tabung durham, inokulasi sample dan inkubasi 24 - 48 jam pd suhu 37°C. Dilakukan pengamatan terhadap pembentukan gas. Jumlah tabung yang positif gas dicatat dan hasil pengamatan tersebut dirujuk ke tabel Nilai Duga Terdekat (NDT)/ Minimal Presumtif Number (MPN) (Tabel 5.1.). Angka yang diperoleh pada tabel MPN menyatakan jumlah bakteri coliform dalam tiap gram contoh yang diuji.

3) Uji Lengkap : dengan media selektif



(a)

(b)

(c)

Gambar 5.3. Metode Penetapan ALT

Ket: (a) Presumptive Test pada media LB, (b) Confirmed Test pada media BGLB, (c) Complete Test pada media selektif

Tabel 5.1. Tabel MPN (cara 3 tabung). Indeks MPN dan batas kepercayaan 95% limits bila digunakan tiga tabung.

nomor tabung yang positif			indeks MPN per 100 ml	95% batas kepercayaan	
10 ml	1 ml	0,1 ml		terendah	tertinggi
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

Catatan: Jika semua tabung positif (3 3 3) maka nilai MPN > 240

5.8. Penetapan Angka Kapang dan Kamir

- Prinsip: menentukan adanya jamur secara mikrobiologis
- Tujuan: memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung cemaran jamur melebihi batas yang ditetapkan
- Media : Potato Dextrosa agar (PDA), Czapek Dox Agar (CDA) atau malt agar, air suling agar 0,05% (ASA)

❖ Prosedur :

Disiapkan 3 buah tabung yang masing-masing telah diisi 9 ml ASA. Dari hasil homogenisasi pada penyiapan contoh dipipet 1 ml pengenceran 10-1 ke dalam tabung ASA pertama hingga diperoleh pengenceran 10-2, dan dikocok sampai homogen. Dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10-4. Dari masing-masing pengenceran dipipet 0,5 ml, dituangkan pada permukaan PDA, segera digoyang sambil diputar agar suspensi tersebar merata dan dibuat duplo. Untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer, dilakukan uji blangko. Ke dalam satu cawan petri dituangkan media dan dibiarkan memadat. Ke dalam cawan petri lainnya dituangkan media dan pengencer, kemudian dibiarkan memadat. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 20-25°C selama 5-7 hari. Sesudah 5 hari inkubasi, dicatat jumlah koloni jamur yang tumbuh, pengamatan terakhir pada inkubasi 7 hari. Koloni ragi dibedakan karena bentuknya bulat kecil-

kecil putih hampir menyerupai bakteri. Lempeng Agar yang diamati adalah lempeng dimana terdapat 40 - 60 koloni Kapang/Khamir.

❖ Penghitungan :

Jika pada pengenceran 10^{-4} terdapat sebanyak 40 koloni, maka nilai AKK adalah $40 \times 10^{-4} = 40 \cdot 10^{-4}$ koloni per gram. Contoh, untuk beberapa kemungkinan lain yang berbeda dari pernyataan di atas, maka diikuti petunjuk sebagai berikut:

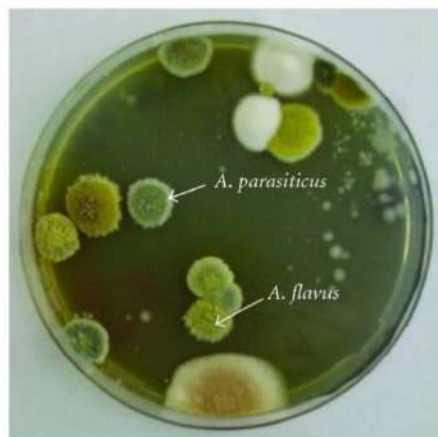
- 1) Bila hanya salah satu diantara kedua cawan petri dari pengenceran yang sama menunjukkan jumlah antara 40-60 koloni, dihitung jumlah koloni dari kedua cawan dan dikalikan dengan faktor pengenceran.
- 2) Bila pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni lebih besar dari dua kali jumlah koloni pada pengenceran di bawahnya, maka dipilih tingkat pengenceran terendah (misal pada pengenceran 10^{-2} diperoleh 60 koloni dan pada pengenceran 10^{-3} diperoleh 20 koloni, maka dipilih jumlah koloni pada tingkat pengenceran 10^{-2} yaitu 60 koloni).
- 3) Bila dari seluruh cawan petri tidak ada satupun yang menunjukkan jumlah antara 40-60 koloni, maka dicatat angka sebenarnya dari tingkat pengenceran terendah dan dihitung sebagai Angka Kapang/Khamir perkiraan.
- 4) Bila tidak ada pertumbuhan pada semua cawan dan bukan disebabkan karena faktor inhibitor, maka Angka Kapang/Khamir dilaporkan sebagai kurang dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah.

5.9. Penetapan Cemar Aflatoksin

Aspergillus flavus adalah jamur penghasil metabolit aflatoksin (bersifat hepatotoksik).

Media: Potato Dekstrosa Agar (PDA), Czapek Dox Agar (CDA), dan Air suling agar (ASA)

Inkubasi: 5-7 hari pada suhu ruang. Keberadaannya ditandai dengan koloni berwarna hijau kekuningan sangat cerah.



Gambar 5.4. Jamur *Aspergillus flavus*

❖ Identifikasi

Thadap media biakan, ekstrak yang diuji dan baku aflatoksin dilakukan Kromatografi Lapis Tipis sebagai berikut:

- Fase diam = silika gel

- Fase gerak = kloroform:aseton:heksana (85:15:20)
- Perbandingan: aflatoksin B1, B2, dan G1, G2
- Deteksi: sinar UV 366 bercak berwarna biru/hijau kebiruan
- Jika positif (secara kualitatif), maka dapat ditetapkan kadarnya dengan metode KLT-densitometer atau HPLC

5.10. Penetapan Cemaran Logam Berat

Prinsip penetapan cemaran logam berat adalah menentukan kandungan logam berat dengan SSA (Spektrofotometri Serapan Atom). Kadar logam berat dalam sisa abu total meliputi Pb, Cd, Hg, As, dsb. Penetapan kadar dengan menggunakan digesti basah sistem terbuka:

- Timbang 200-250 mg simplisia yang dikering anginkan, masukkan ke dalam krus silika. Tambahkan 1,0 ml campuran digesti (2 bagian asam nitrat (1000g/L) dan 1 bagian asam perkolat (1170 g/L))
- Tutup krus silika tanpa menggunakan tekanandan masukkan kedalam tanur yang mempunyai pengatur suhu dan waktu
- Panaskan perlahan lahan hingga 102 °C selama 2 jam
- Naikkan suhu pelan-pelan hingga 240 °C, pertahankan selam 4 jam
- Larutkan residu inorganik dalam 2,5 ml asam nitrat (1000 g/L) LP dan gunakan untuk uji penetapan kadar logam berat.
- Bandingkan dengan larutan blanko
- Penetapan kadar dengan spektrofotometri serapan atom (AAS)

5.11. Penetapan Residu Pestisida

Prinsip penetapan residu pestisida adalah menentukan kandungan sisa pestisida yang mungkin pernah ditambahkan atau mengkontaminasi pada bahan simplisia yang dibuat menjadi ekstrak. Tujuannya adalah memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung pestisida melebihi batas yang ditetapkan.

A. Metode I

Metode analisis multiresidu pestisida organoklor (DDT) dan organofosfat (diazinon) kadar < 5g/kg sampel. Metode: GC-MS atau GC-FID.

B. Metode II : dengan KLT menggunakan fase diam alumina dan deteksi fotokimiawi

1) Fase diam :

Aluminium oksida (Al_2O_3) netral atau lempeng KLT alumina dengan ketebalan 0,25 cm

2) Fase gerak :

Pestisida organoklor = campuran aseton : n -heptana (2:98 v/v)

Pestisida organofosfat = metilsikloheksana

3) Pereaksi semprot :

- Pestisida organoklor : pereaksi kromogenik (0,1 gram $AgNO_3$ dalam 1 ml air, ditambah 20 ml 2-fenoksietanol dan encerkan dengan aseton ad 200 ml, campur tambahkan 1 tetes H_2O_2 30%. Simpan ditmepat gelap semalam kemudian dienaptuangkan kedalam botol penyemprot.

- b) Pestisida organofosfat : pereaksi kromogenik a. 1 g tetrabromo-fenolftalein etil ester dalam 100 ml aseton. Encerkan 10 ml larutan ini dengan aseton ad 50 ml.
- c) Larutan perak nitrat : Larutkan 0,5 gram AgNO_3 dalam 25 ml air dan encerkan dengan aseton ad 100 ml.
- d) Larutan asam sitrat : 5 gram sitrat granil dalam 50 ml air dan encerkan dengan aseton ad 100 ml.

4) Pemaparan

Pestisida organoklor : dengan UV dan baku pembandingan terlihat jelas setelah 15-20 menit

Pestisida organofosfat : bercak biru muda atau ungu diatas dasar kuning.

Latihan 5

1. Sebutkan aspek yang harus ditetapkan pada parameter non-spesifik dalam ketentuan umum mutu ekstrak menurut Depkes-BPOM !
2. Sebutkan metode yang dapat digunakan untuk penetapan kadar air!
3. Jelaskan tujuan penetapan kadar abu, dan apa saja yang termasuk ke dalam pengujian kadar abu?
4. Berapa batasan cemaran mikroba yang diperbolehkan?
5. Jelaskan 3 tahap pengujian coliform!

Jawaban 5

1. Jawaban :

- kadar air
- bobot jenis
- susut pengeringan
- sisa pelarut
- kadar abu
- cemaran mikroba
- cemaran logam berat
- cemaran residu pestisida

2. Jawaban :

- Titrasi
- Destilasi
- Gravimetri

3. Jawaban :

Prinsip penetapan kadar abu adalah dengan cara bahan dipanaskan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik. Tujuannya adalah memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Kadar abu dinyatakan dalam % (b/b). Penetapan kadar abu dilakukan terhadap kadar abu total, kadar abu larut dalam air, dan kadar abu tak larut asam.

4. Jawaban :

Batasan cemaran mikroba:

- ALT : < 104 kol/g
- MPN coliform : < 3 kol/g
- Angka kapang /kamir : < 103 kol/g
- Mikroba patogen : negatif (*Salmonella thypi*, *E. Coli*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus flavus*, *S.aureus*)

5. Jawaban :

Prosedur uji ada 3 tahap :

- Uji Prakiraan / Presumptive Test, memakai media Mac Conkey Broth (MCB) atau Lactosa Broth (LB) dalam tabung reaksi yg didalam nya ada tb durham, inokulasi sample dan inkubasi 24 - 48 jam pd suhu 37°C, hasil yang positif lanjut ke uji konfirmasi
- Uji Konfirmasi, memakai media BGLB dalam tabung reaksi yg didalam nya ada tabung durham, inokulasi sample dan inkubasi 24 - 48 jam pd suhu 37°C. Dilakukan pengamatan

terhadap pembentukan gas. Jumlah tabung yang positif gas dicatat dan hasil pengamatan tersebut dirujuk ke tabel Nilai Duga Terdekat (NDT)/ Minimal Presumptif Number (MPN). Angka yang diperoleh pada tabel MPN menyatakan jumlah bakteri coliform dalam tiap gram contoh yang diuji.

- Uji Lengkap : dengan media selektif

Rangkuman 5

Parameter standar non spesifik adalah semua aspek yang tidak terkait dengan aktifitas farmakologi secara langsung namun mempengaruhi aspek keamanan dan stabilitas ekstrak serta sediaan yang dihasilkan. Standardisasi dan analisis aspek nonspesifik diarahkan pada batas maksimal yang diperkenankan terhadap material berbahaya yang ada di dalam ekstrak meliputi kadar air, bobot jenis, susut pengeringan, sisa pelarut, kadar abu, cemaran mikroba, cemaran logam berat, dan cemaran residu pestisida.

Penetapan kadar air dapat dilakukan dengan 3 metode yaitu titrasi, destilasi, dan gravimetri. Penentuan bobot jenis adalah masa per satuan volume pada suhu kamar tertentu (25 °C) yang ditentukan dengan alat khusus piknometer atau alat lainnya. Penetapan susut pengeringan adalah pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105 °C selama 30 menit atau sampai berat konstan, yang dinyatakan sebagai nilai prosen. Tujuan penetapan sisa pelarut adalah memberikan jaminan bahwa selama proses tidak meninggalkan sisa pelarut yang memang seharusnya tidak boleh ada, sedangkan untuk ekstrak cair menunjukkan jumlah pelarut (alkohol) sesuai dengan yang ditetapkan. Penetapan sisa pelarut dapat dilakukan dengan metode destilasi dan kromatografi gas. Penetapan kadar abu dilakukan terhadap kadar abu total, kadar abu larut dalam air, dan kadar abu tak larut asam.

Pengertian penetapan cemaran mikroba adalah menentukan adanya mikroba patogen secara analisis mikrobiologi dengan tujuan memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak boleh mengandung mikroba patogen dan non patogen melebihi batas yang ditetapkan yang akan berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan berbahaya bagi kesehatan. Penetapan cemaran mikroba dilakukan terhadap Angka Lempeng Total (ALT), MPN Coliform, angka Kapang & Khamir, cemaran aflatoksin dan bakteri patogen. Prinsip penetapan cemaran logam berat adalah menentukan kandungan logam berat dengan SSA (Spektrofotometri Serapan Atom). Prinsip penetapan residu pestisida adalah menentukan kandungan sisa pestisida yang mungkin pernah ditambahkan atau mengkontaminasi pada bahan simplisia yang dibuat menjadi ekstrak.

Tes Formatif 5

1. Penetapan kadar air menggunakan cara titrasi menggunakan pereaksi yaitu
 - A. Toluena
 - B. Etanol
 - C. Karl-Fischer
 - D. Asam sulfat
 - E. Sitoborat

2. Pada penetapan sisa pelarut menggunakan kromatografi gas-cair, menggunakan gas pembawa
 - A. Oksigen
 - B. Nitrogen
 - C. Fluorin
 - D. Hidrogen
 - E. Argon

3. Pada uji konfirmasi cemaran koliform, yang menjadi medianya adalah
 - A. PCA
 - B. MCB
 - C. LB
 - D. BGLB
 - E. PDA

4. Jamur yang menghasilkan cemaran aflatoksin yang bersifat hepatotoksik adalah
 - A. *Aspergillus flavus*
 - B. *Penicillium* sp.
 - C. *Fusarium* sp.
 - D. *Colletotrichum* sp.
 - E. *Neurospora* sp.

5. Deteksi isolat cemaran aflatoksin menggunakan KLT, dilakukan dengan sinar UV pada panjang gelombang
 - A. 540 nm
 - B. 235 nm
 - C. 488 nm
 - D. 366 nm
 - E. 723 nm

Jawaban Test Formatif 5

1. C
2. B
3. D
4. A
5. D

MATERI 6: APLIKASI PENGUJIAN PARAMETER NON SPESIFIK

Metode Pembelajaran	Estimasi Waktu	CPMK
<ul style="list-style-type: none"> • Kuliah Interaktif • Diskusi • <i>Question Based Learning</i> 	150 menit	<ul style="list-style-type: none"> • CPMK-4: Menunjukkan penguasaan konsep teoritis tentang standarisasi dan penentuan marker Obat Bahan Alam ;(CPL-4)

6.1. Pendahuluan

Indonesia merupakan salah satu negara dengan kekayaan hayati terbesar di dunia yang memiliki lebih dari 30.000 spesies tanaman tingkat tinggi. Hingga saat ini, tercatat 7000 spesies tanaman telah diketahui khasiatnya namun kurang dari 300 tanaman yang digunakan sebagai bahan baku industri farmasi secara regular. Sekitar 1000 jenis tanaman telah diidentifikasi dari aspek botani sistematik tumbuhan dengan baik (Saifuddin, dkk.,2011).

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah matoa (*Pometia pinnata* J.R. & G. Forst). Matoa merupakan jenis tanaman suku Sapindaceae yang tersebar di wilayah Asia Tenggara (Malaysia dan Indonesia). Tanaman ini telah dimanfaatkan oleh Bangsa Asia (Papua, Malaysia dan Indonesia) sebagai salah satu bahan obat tradisional yang diketahui mengandung golongan senyawa berupa flavonoid, tanin dan saponin. Secara empiris tanaman matoa telah banyak digunakan dalam pengobatan di beberapa daerah. Daun matoa dapat digunakan sebagai obat demam, sakit kulit dan bengkak keseleo (Fadillah, 2020).

Penelitian ini mengacu pada penelitian dan pengembangan standarisasi tumbuhan obat, dikarenakan standarisasi merupakan tahapan penting dalam melakukan penelitian dan pengembangan obat bahan alam di Indonesia untuk menjamin mutu dan keamanan dari sediaan obat tersebut. Dalam penelitian ini dilakukan standarisasi simplisia dan ekstrak secara kualitatif yang meliputi parameter non spesifik (susut pengeringan, kadar abu, kadar abu tidak larut asam, kadar air, bobot jenis, cemar mikroba, ALT, kapang dan khamir).

6.2. Penetapan Susut Pengeringan

Ditimbang ekstrak sebanyak 1 g dan dimasukkan kedalam kurs porselin tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105 °C selama 30 menit dan telah ditera. Sebelum ditimbang, ekstrak diratakan dalam kurs porselin, dengan menggoyangkan kurs hingga membentuk lapisan setebal 5–10 mm. Masukkan kedalam oven, buka tutupnya, keringkan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Dinginkan dalam eksikator. Lakukan replikasi sebanyak 3 kali kemudian dihitung persentasenya.

Hasil & pembahasan

Tabel 6.1. Hasil Pengukuran Susut Pengering

Pengujian	Kadar (%)			Rerata (%)	Syarat
	I	II	III		
Susut Pengeringan	7,82	6,99	6,28	7,03	≤10%

Parameter susut pengeringan merupakan pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105 °C selama 30 menit atau sampai berat konstan yang dinyatakan sebagai nilai

persen. Dengan mengetahui susut pengeringan dapat memberikan batasan maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (Depkes RI, 2000). Nilai susut pengeringan yang diperoleh dari ekstrak daun matoa adalah sebesar 7,03%. Hal ini menunjukkan besarnya kadar air dan senyawa-senyawa yang hilang selama proses pengeringan adalah 7,03%. Persyaratan yang baik untuk susut pengeringan adalah kurang dari 10%, karena susut pengeringan juga mewakili kandungan air yang menguap.

6.3. Kadar Abu

a. Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 1 g ekstrak ditimbang seksama dimasukkan dalam kurs yang sebelumnya telah ditimbang. Setelah itu ekstrak dipijar dengan menggunakan oven 600 ± 25 °C hingga mendapatkan bobot konstan. Kemudian ditimbang hingga bobot yang tepat.

b. Penetapan Kadar Abu yang Tidak Larut dalam Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu dididihkan dengan 25 ml asam sulfat encer selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut asam kemudian di saring dengan kertas saring bebas abu yang sebelumnya telah ditimbang dan residunya dibilas dengan air panas. Abu yang tersaring dengan kertas saring dimasukkan kembali kedalam kurs yang sama. kemudian di masukkan kedalam oven hingga mendapatkan bobot yang tepat.

Hasil & pembahasan

Tabel 6.2. Hasil Pengukuran Kadar Abu

Pengujian	Kadar (%)			Rerata (%)	Syarat
	I	II	III		
Kadar abu total	2,39	2,09	2,91	2,46	$\leq 10,2$ %
Kadar abu tidak larut asam	0,077	0,040	0,030	0,049	≤ 2 %

Penentuan kadar abu dilakukan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Pada tahap ini ekstrak dipanaskan hingga senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sampai tinggal unsur mineral dan anorganik saja sedangkan untuk penetapan kadar abu yang tidak larut asam dimaksudkan untuk mengevaluasi ekstrak terhadap kontaminasi bahan bahan yang mengandung silika seperti tanah dan pasir. Kadar abu total yang diperoleh dari ekstrak daun matoa sebesar 2,46% sedangkan untuk kadar abu tidak larut asam sebesar 0,049% juga memenuhi syarat WHO yaitu tidak boleh lebih dari 2%. Kadar abu hendaknya mempunyai nilai kecil karena parameter ini menunjukkan adanya cemaran logam berat yang tahan pada suhu tinggi.

6.4. Bobot Jenis

Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak 5% dalam pelarut etanol dengan alat piknometer. Digunakan piknometer kering, bersih dan telah dikalibrasi

dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25 °C, lalu dimasukkan kedalam piknometer yang telah diisi hingga suhu 25 °C.

Hasil & pembahasan

Tabel 6.3. Hasil Pengukuran Bobot Jenis

Parameter	Sampel	Replikasi sampel			Rerata (g/mL)
		I	II	III	
Bobot Jenis	Daun matoa	0,903	0,8949	0,906	0,9013

Bobot jenis diartikan sebagai perbandingan kerapatan suatu zat terhadap kerapatan air dengan nilai masa persatuan volume. Penentuan bobot jenis bertujuan untuk memberi batasan tentang besarnya massa persatuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai menjadi ekstrak kental yang masih dapat dituang, bobot jenis juga terkait dengan kemurnian ekstrak dari kontaminasi (Depkes RI, 2000). Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak kental yang diencerkan 5% terlebih dahulu dengan etanol 70% sebagai pelarut. Hasil dari pengukuran bobot jenis ekstrak etanol daun matoa yaitu 0,9013 g/mL.

6.5. Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen. Toluena yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu. Kemudian ditimbang seksama ekstrak sebanyak 10 g dan dimasukkan kedalam labu alas bulat dan ditambahkan toluena yang telah dijenuhkan. Labu dipanaskan hati-hati selama 100 menit, setelah toluena mulai mendidih, penyulingan diatur 2 tetes/detik, lalu 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling dilanjutkan pemanasan selama 5 menit. Biarkan tabung penerima dingin hingga suhu kamar. Volume air dibaca sesudah toluena dan air memisah sempurna. Lakukan replikasi sebanyak tiga kali kemudian dihitung persentasenya.

Hasil & pembahasan

Tabel 6.4. Hasil Pengukuran Kadar Air

Pengujian	Kadar (%)			Rerata (%)	Syarat
	I	II	III		
Kadar Air	5	5	5	5	≤10%

Penetapan kadar air dilakukan untuk menetapkan residu air setelah proses pengentalan atau pengeringan. Hasil penetapan kadar air ekstrak daun matoa sebesar 5%. Range kadar air tergantung jenis ekstrak, untuk ekstrak kering kadar air <10%. Kadar air menentukan stabilitas suatu ekstrak, biasanya kadar air yang berisiko adalah lebih dari 10% (Saifudin, dkk.,2011).

6.6. Cemaran Mikroba

Pada penyiapan sampel sebanyak 1 g ekstrak dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dilarutkan dalam 10 mL DMSO 10% dikocok hingga homogen didapatkan pengenceran

10^{-1} . Disiapkan 3 tabung, lalu masukkan 9 mL pengencer 10^{-1} ke dalam tabung pertama, kocok hingga homogen didapatkan pengenceran 10^{-2} , selanjutnya dilanjutkan dengan pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} (Depkes RI, 2000 ; Saifuddin, dkk.,2011).

A. Angka Lempengan Total (ALT)

Dipipet 1 ml dari tiap pengenceran ke dalam cawan petri yang steril (duplo), dengan menggunakan pipet yang berbeda dan steril untuk tiap pengenceran. Ke dalam tiap cawan petri dituangkan 15 ml media Nutrient Agar yang telah dicairkan kemudian cawan petri digoyang agar suspensi tercampur rata. Kemudian dibiarkan hingga campuran dalam cawan petri memadat. Cawan petri dengan posisi terbalik kemudian dimasukkan ke dalam lemari inkubator suhu 37°C selama 24 jam. Catat pertumbuhan koloni pada masing-masing cawan yang mengandung 30-300 koloni setelah 24 jam. Hitung ALT dalam koloni/g sampel dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang sesuai.

B. Kapang dan Khamir

Sebanyak 1 mL dari tiap pengenceran dipipet dengan pipet steril kedalam masing-masing cawan petri berisi 15 ml medium PDA. PDA yang masih cair lalu digoyang agar suspensi tersebar merata, lalu diinkubasi pada suhu 25°C selama 3 hari. kemudian diamati dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh dan dikalikan dengan faktor pengenceran. Dilakukan sebanyak tiga kali.

Hasil & pembahasan

Tabel 6.5. Hasil Pengukuran Cemar Bakteri

Parameter	Hasil (koloni/g)	Syarat (koloni/g) Dirjen POM
Cemaran bakteri	$8,2 \times 10^4$	1×10^6
Cemaran kapang	$1,7 \times 10^3$	1×10^4

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah mikroorganisme yang diperoleh dan untuk menunjukkan ada tidaknya bakteri tertentu dalam ekstrak. Pada ekstrak daun matoa terdapat cemaran bakteri sebesar $8,2 \times 10^4$ koloni/g dan cemaran kapang/khamir sebesar $1,7 \times 10^3$ koloni/g. Menurut SK Dirjen POM No : 03726/B/SK/VIII/89, ini berada dibawah batas maksimum yaitu 10^6 koloni/g untuk bakteri dan 10^4 koloni/g untuk kapang. Rendahnya pertumbuhan bakteri ini juga bisa disebabkan karena ekstrak yang digunakan adalah ekstrak etanol yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau mikroba dalam ekstrak. Pada kontrol media juga tidak ditumbuhi bakteri dan jamur yang berarti bahwa tidak ada kontaminan dari media yang digunakan.

Latihan 6

1. Jelaskan tujuan dari penetapan susut pengeringan!

2. Pada penentuan kadar abu, apa tujuan dari pemijaran ekstrak dalam suhu tinggi? Dan apa tujuan dari pengukuran kadar abu tak larut asam?
3. Jelaskan tujuan dari pengukuran bobot jenis!
4. Jelaskan cara penetapan kadar air dengan cara destilasi menggunakan toluen!
5. Jelaskan cara membuat penyiapan sampel pada uji cemaran mikroba!

Jawaban 6

1. Jawaban :
Tujuan penetapan susut pengeringan untuk dapat memberikan batasan maksimal tentang besarnya kadar air dan senyawa yang hilang pada proses pengeringan.
2. Jawaban :
Ekstrak dipanaskan hingga senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sampai tinggal unsur mineral dan anorganik saja sedangkan untuk penetapan kadar abu yang tidak larut asam dimaksudkan untuk mengevaluasi ekstrak terhadap kontaminasi bahan-bahan yang mengandung silika seperti tanah dan pasir.
3. Jawaban :
Penentuan bobot jenis bertujuan untuk memberi batasan tentang besarnya massa persatuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai menjadi ekstrak kental yang masih dapat dituang, bobot jenis juga terkait dengan kemurnian ekstrak dari kontaminasi.
4. Jawaban :
Toluen yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu. Kemudian ditimbang seksama ekstrak sebanyak 10 g dan dimasukkan kedalam labu alas bulat dan ditambahkan toluen yang telah dijenuhkan. Labu dipanaskan hati-hati selama 100 menit, setelah toluen mulai mendidih, penyulingan diatur 2 tetes/detik, lalu 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling dilanjutkan pemanasan selama 5 menit. Biarkan tabung penerima dingin hingga suhu kamar. Volume air dibaca sesudah toluen dan air memisah sempurna. Lakukan replikasi sebanyak tiga kali kemudian dihitung persentasenya.
5. Jawaban :
Pada penyiapan sampel sebanyak 1 g ekstrak dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dilarutkan dalam 10 mL DMSO 10% dikocok hingga homogen didapatkan pengenceran 10^{-1} . Disiapkan 3 tabung, lalu masukkan 9 mL pengencer 10^{-1} kedalam tabung pertama, kocok hingga homogen didapatkan pengenceran 10^{-2} , selanjutnya dilanjutkan dengan pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} .

Rangkuman 6

Matoa merupakan jenis tanaman suku Sapindaceae yang tersebar di wilayah Asia Tenggara (Malaysia dan Indonesia). Tanaman ini telah dimanfaatkan oleh Bangsa Asia (Papua, Malaysia

dan Indonesia) sebagai salah satu bahan obat tradisional yang diketahui mengandung golongan senyawa berupa flavonoid, tanin dan saponin. Secara empiris tanaman matoa telah banyak digunakan dalam pengobatan di beberapa daerah. Daun matoa dapat digunakan sebagai obat demam, sakit kulit dan bengkak keseleo.

Penelitian ini mengacu pada penelitian dan pengembangan standarisasi tumbuhan obat, dikarenakan standarisasi merupakan tahapan penting dalam melakukan penelitian dan pengembangan obat bahan alam di Indonesia untuk menjamin mutu dan keamanan dari sediaan obat tersebut. Dalam penelitian ini dilakukan standarisasi simplisia dan ekstrak secara kualitatif yang meliputi parameter non spesifik (susut pengeringan, kadar abu, kadar abu tidak larut asam, kadar air, bobot jenis, cemaran mikroba, ALT, kapang dan khamir).

Pada pengujian non spesifik ekstrak etanol daun matoa didapatkan hasil susut pengeringan sebesar 7,03%. Bobot jenis sebesar 0,9013 g/mL. Kadar abu total sebesar 2,46% dan kadar abu tidak larut asam sebesar 0,049%. Kadar air sebesar 5%. Cemaran bakteri sebesar $8,2 \times 10^4$ koloni/g dan cemaran kapang sebesar $1,7 \times 10^3$ koloni/g. Hasil pengujian parameter nonspesifik telah memenuhi persyaratan ekstrak yang telah ditetapkan oleh Depkes RI dan WHO.

Tes Formatif 6

1. Penetapan susut pengeringan dilakukan pada suhu
 - A. 90 °C
 - B. 105 °C
 - C. 150 °C
 - D. 200 °C
 - E. 250 °C
2. Pelarut yang dipergunakan untuk penetapan kadar abu tak larut asam adalah
 - A. Air
 - B. Etanol
 - C. Eter
 - D. Asam sulfat
 - E. Kloroform
3. Kadar air yang dipersyaratkan pada ekstrak kering adalah
 - A. <1%
 - B. <5%
 - C. <10%
 - D. <15%
 - E. <20%
4. Medium yang digunakan untuk mengukur Angka Lempeng Total (ALT) pada penelitian tersebut adalah
 - A. *Nutrient agar*
 - B. *Lactosa broth*
 - C. MCB

- D. PDA
- E. CDA

5. Suhu dan lama inkubasi pengukuran kapang & khamir adalah
- A. 25 °C, selama 24 jam
 - B. 37 °C, selama 24 jam
 - C. 25 °C, selama 48 jam
 - D. 37 °C, selama 48 jam
 - E. 25 °C, selama 72 jam

Jawaban Tes Formatif 6

- 1. B
- 2. D
- 3. C
- 4. A
- 5. E

MATERI 7 : METODE UJI PARAMETER SPESIFIK

Metode Pembelajaran	Estimasi Waktu	CPMK
<ul style="list-style-type: none"> • Kuliah Interaktif • Diskusi • <i>Question Based Learning</i> 	150 menit	CPMK-4: Menunjukkan penguasaan konsep teoritis tentang standarisasi dan penentuan marker Obat Bahan Alam; (CPL-4)

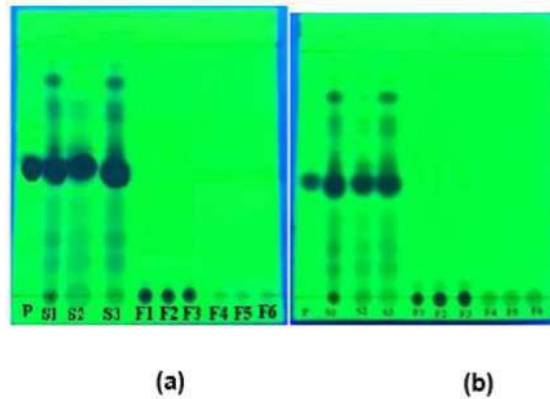
7.1. Pendahuluan

Penentuan parameter spesifik dilakukan dengan mengukur aspek kandungan kimia (baik kualitatif maupun kuantitatif), dimana kandungan kimia tersebut yang bertanggung jawab terhadap aktifitas farmakologi tertentu. Senyawa marker merupakan senyawa yang secara alami terdapat dalam tumbuhan baik dengan atau tanpa aktifitas farmakologi. Contohnya seperti senyawa zerumbon yang terdeteksi dalam lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet*) dan lempuyang pahit (*Zingiber littorale*). Senyawa zerumbon ini memiliki aktifitas farmakologi dengan menghambat sel neoplasma (antikanker). Senyawa zerumbon ini dapat dikatakan sebagai senyawa aktif karena senyawa tersebut langsung bertanggungjawab terhadap aktifitas. Berbeda halnya dengan kurkuminoid yang menjadi senyawa utama karena secara kuantitatif dominan di dalam rimpang kunyit (*Curcuma longa*) meskipun bukan yang bertanggung jawab secara langsung terhadap aktifitas farmakologi.

Senyawa identitas merupakan senyawa yang khas, unik, eksklusif hanya terdapat pada suatu tanaman obat, misal lunamarin, lunakrin dan lunasin yang terdapat pada sanrego (*Lunasia amara*). Sedangkan, senyawa aktual adalah senyawa apapun asalkan terdapat didalam tanaman yang dianalisis. Ketentuan umum mutu ekstrak menurut (Depkes RI, 2000) (BPOM RI, 2004) menyebutkan bahwa aspek yg harus ditetapkan pada parameter spesifik adalah:

7.1.1. Profil KLT

Tujuan dari uji profil KLT adalah untuk menunjukkan setidaknya senyawa aktif (*marker*) betul ada di dalam ekstrak atau secara kimiawi otentik yakni berasal dari tanaman yang benar. Uji ini merupakan analisis kualitatif pendahuluan yang kegagalannya menghentikan dalam upaya kuantitatifnya. Parameter dalam uji ini adalah senyawa marker muncul sebagai bercak terpisah. Akan tetapi, pengujian ini memiliki beberapa kendala seperti marker muncul tidak sebagai bercak tunggal meskipun senyawa pembanding otentik tersedia, atau tidak tersedia marker yang otentik.



Gambar 7.1. Profil KLT. Hasil Identifikasi Alkaloid dari Ekstrak Etanol Lada Hitam (a); Lada Putih (b) Dibawah Sinar UV 254 nm

Keterangan: P (Standar piperin); S1 (Fraksi alkaloid dari ekstrak etanol 60%); S2 (Fraksi alkaloid dari ekstrak etanol 70%); S3 (Fraksi alkaloid dari ekstrak etanol 96%); F1 (Fraksi eter dari ekstrak etanol 60%); F2 (Fraksi eter dari ekstrak etanol 70%); F3 (Fraksi eter dari ekstrak etanol 96%); F4 (Fraksi asam dari ekstrak etanol 60%); F5 (Fraksi asam dari ekstrak etanol 70%); F6 (Fraksi asam dari ekstrak etanol 96%) (Hikmawanti *et al.*, 2016)

Keberhasilan memunculkan profil KLT senyawa target dipengaruhi oleh beberapa faktor :

- Sistem kromatografi (fase diam dan fase gerak)
- Jenis pelarut (terhadap senyawa target dalam ekstrak)
- Jumlah penimbangan ekstrak (terlalu kecil sehingga marker tidak terbaca maka jumlah penimbangan harus ditingkatkan)
- Pemilihan metode visualisasi dengan cara fisika (sinar UV 254 / 366nm) dilanjutkan dengan cara kimia (reagen spesifik / semprot)

Dalam kromatografi lapis tipis (KLT), system yang dapat dipakai yakni system fase normal dan system fase terbalik. Sistem kromatografi fase normal menggunakan fase diam KLT silika gel GF254 dengan fase gerak normal CHCl_3 : MeOH (MeOH < 20%). Adapun fase gerak dengan komposisi lain seperti heksan : etil asetat (7:3, 5:5, 3:7). Pemisahan untuk senyawa inti aromatic disarankan menggunakan aseton : benzene (benzene > aseton). Namun, untuk senyawa golongan alkaloid dapat menggunakan fase gerak seperti methanol, CHCl_3 , atau heksan dengan salah satu komponen yang bersifat basa (dietilamin atau beberapa tetes amonia). Senyawa yang terlalu polar seperti polifenol sederhana, glikosida steroid, glikosida flavonoid menggunakan fase gerak CHCl_3 : MeOH dengan penambahan sedikit air. Jika terlalu polar menggunakan MeOH : CH_3COOH glasial : H_2O : asam formiat (dimana rasio asam kecil). Untuk mempertajam pemisahan dapat ditambahkan beberapa tetes asam atau basa lemah.

Saat system fase normal tidak memberikan hasil yang baik maka dapat digunakan system fase terbalik. Sistem fase terbalik menggunakan fase diam berupa C18 yang terikat silika. Fase gerak yang digunakan dalam system ini seperti MeOH : Asetonitril (1:1, 3:1, 2:1) atau MeOH : Asetonitril (2:2:1 atau 1:2:1).

7.1.2. Penetapan Kadar Marker

Pengujian ini dilakukan dengan tujuan menunjukkan secara kuantitatif kadar dari senyawa marker yang ada didalam ekstrak sehingga bisa ditentukan berapa jumlah senyawa yang bertanggungjawab terhadap aktifitas farmakologi di dalam ekstrak. Parameternya ditunjukkan dengan terbacanya senyawa yang dianalisis dalam hal ini senyawa target dalam kadar tertentu. Namun, dalam penetapan kadar marker tidak lepas dari adanya permasalahan yang dihadapi, seperti :

- a. Senyawa target yang tidak berwarna
- b. Senyawa marker tersedia dalam jumlah terbatas
- c. Bentuk peak pada pembacaan densitometer maupun HPLC tidak terbatas
- d. Linearitas dan reproduibilitas rendah

7.1.3. Penetapan Kadar Total Golongan Metabolit

Tujuan dalam pengujian ini adalah memberikan informasi kadar golongan metabolit sekunder sebagai parameter mutu ekstrak dalam kaitannya dengan efek farmakologis. Parameter yang dapat dilihat yakni kadar metabolit sekunder pada range tertentu.

Pada penetapan ini seringkali didapatkan beberapa kendala, seperti golongan senyawa tidak terdeteksi, beberapa metode standar tidak aplikatif, kadar yang diperoleh tidak spesifik, dan bahkan tidak semua instrument dapat diterapkan untuk analisis kadar total.

Dengan penerapan metode spektrofotometri, titrimetric, volumetric, gravimetric atau metode lainnya, dapat ditetapkan kadar total metabolit sekunder. Metode harus sudah teruji validitasnya, selektivitas hingga batas linearitasnya. Adapun beberapa golongan metabolit sekunder yang dapat dikembangkan dan ditetapkan metodenya, yaitu :

A. Golongan Fenolat

Pada identifikasi senyawa fenol sederhana dengan penambahan larutan garam besi (III) klorida dalam air atau etanol akan memberikan warna hijau hingga biru hitam. Analisis kuantitatif fenol yang menghasilkan kadar fenol total ditentukan dengan menggunakan pereaksi Folin Ciocalteu. Penetapan ini menggunakan asam galat sebagai pembanding sehingga kadar fenol total dinyatakan setara dengan asam galat (*gallic acid equivalent*). Absorbansi diukur dari hasil penentuan panjang gelombang maksimum pada range 749.5 – 767nm. Adapun metode lain dengan pembentukan senyawa kompleks menggunakan natrium nitrit - natrium molibdat, yang diukur pada panjang gelombang maksimum 505nm (Hanani, 2015).

Contoh Kasus :

Penelitian yang dilakukan oleh (Hikmawanti *et al.*, 2020) pada ekstrak daun *Cordia sebestena* L. yang ditentukan kandungan fenolik totalnya.

❖ *Alat dan Bahan*

Seperangkat alat maserasi, vacuum rotary evaporator seri N-1200 BS (EYELA, Shanghai, China), dan Spektrofotometer UV-Vis (Seri UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Jepang). Pelarut n-heksana, diklorometana (DCM), etil asetat dan etanol 70% serta daun *Cordia sebestena* L.

❖ **Ekstraksi**

Daun *Cordia sebestena* L. sebanyak 250 g diekstraksi dengan menggunakan berbagai pelarut seperti n-heksana, diklorometana (DCM), etil asetat dan etanol 70%. Ekstraksi maserasi dilakukan 2 kali selama 24 jam. Setiap filtrate diuapkan menggunakan vacuum rotary evaporator pada suhu 40 °C.

❖ **Identifikasi kadar fenol total**

Penentuan kadar fenolik total dilakukan dengan teknik kolorimetri dengan Folin Ciocalteu dengan menggunakan asam galat sebagai standar. Sampel ekstrak dicampurkan dengan reagen Folin Ciocalteu, kemudian didiamkan selama 3 menit. Larutan campuran ditambahkan natrium karbonat dan segera ditambahkan dengan air hingga tanda batas. Larutan diinkubasi pada suhu kamar (25 °C) selama 30 menit. Absorbansi dapat diukur dengan Spektrofotometer UV Vis ketika sudah diketahui panjang gelombang maksimumnya (range 760-765nm). Kurva standar dibuat dengan menggunakan larutan asam galat dengan konsentrasi yang sudah ditentukan. Kadar fenolik total dinyatakan sebagai setara asam galat (mg GAE/g ekstrak).

B. Golongan Flavonoid

Penentuan kualitatif golongan flavonoid sering menggunakan pereaksi semprot pada KLT seperti $AlCl_3$ dan sitroborat yang menunjukkan adanya fluoresensi bercak kuning dibawah lampu UV366. Sedangkan untuk penetapan kadar flavonoid total dapat menggunakan spektrofotometer dengan metode sebagai berikut :

1. Metode Chang

Kandungan flavonoid total pada metode ini menggunakan kuersetin sebagai standar. Serbuk simplisia diekstraksi dengan pelarut etanol atau methanol kemudian disaring. Selanjutnya, ekstrak etanol/metanol ditambahkan dengan $AlCl_3$, kalium asetat dan air suling. Larutan campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan diukur absorbansinya pada Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang antara 400 – 450nm. Larutan sampel dibuat dalam tiga kali replikasi. Kandungan flavonoid total dinyatakan dengan *quersetin equivalent (%)*.

2. Metode Zhou

Kandungan flavonoid total pada metode ini ditentukan dengan Spektrofotometer UV-Vis dengan rutin sebagai pembanding. Serbuk simplisia diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol/methanol kemudian disaring. Ekstrak etanol/methanol ditambahkan dengan $NaNO_2$ yang kemudian didiamkan selama 6 menit selanjutnya ditambahkan dengan $AlCl_3$ dan didiamkan selama 5 menit. Larutan campuran tersebut ditambahkan NaOH 10% dan air suling hingga tanda batas. Larutan dibiarkan selama 15 menit dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 510nm. Kandungan flavonoid total dinyatakan dengan *rutin equivalent (%)*.

3. Metode lain

Selain dari kedua metode diatas, penentuan flavonoid total dapat dilakukan dengan menggunakan HPLC dan Kromatografi Gas. Pada kromatografi gas, flavonoid dirubah menjadi turunan termetilasi atau tertrimetisilisasi dan pada pembuatan turunan ini memungkinkan juga pengukuran spectrum massa.

C. Golongan Tanin

Senyawa tanin merupakan suatu polifenol yang tersebar luas didunia tumbuhan. Umumnya tanin ditemukan divakuola sel tumbuhan. Tanin secara kimia terbagi menjadi dua yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terhidrolisis banyak terdapat dibuah yang belum matang sedangkan tanin terkondensasi lebih banyak dijumpai dikulit batang. Senyawa tanin dapat diekstraksi dengan menggunakan pelarut air, metanol/etanol atau aseton.

Identifikasi kualitatif senyawa golongan tanin dapat dilakukan dengan penambahan FeCl_3 yang memberikan warna larutan biru kehitaman pada tanin terhidrolisis, sedangkan tanin terkondensasi menghasilkan warna larutan hijau kehitaman. Selain menggunakan besi (III) klorida, uji kualitatif dapat menggunakan larutan gelatin dalam NaCl yang mana larutan tanin akan menimbulkan endapan. Penetapan kadar tannin dapat dilakukan dalam beberapa cara :

1. Titrimetri

Simplisia sebanyak 2 gram dipanaskan dengan 50 ml air mendidih diatas tangas air selama 30 menit, sambal diaduk. Selanjutnya didiamkan selama beberapa menit, disaring kedalam labu takar 250 ml. Ampas disari dengan air mendidih, disaring dan dimasukkan kedalam labu ukur yang sama. Penyarian diulang beberapa kali hingga larutan memberikan hasil negatif tidak adanya tanin ketika direaksikan dengan besi (III) ammonium sulfat. Larutan cairan didinginkan kemudian ditambahkan dengan air hingga tanda batas. Larutan dipipet sebanyak 25 ml dan dimasukkan kedalam labu 1000ml, tambahkan air sebanyak 750 ml dan asam indigosulfonat LP sebanyak 25ml, kemudian dititrasi dengan larutan KMnO_4 1,0 N hingga larutan bewarna kuning emas. Kadar tanin dihitung dari 1 ml KMnO_4 0,1 N setara dengan 0,004157 gram tanin (Depkes RI, 2000).

2. Spektrofotometri

Dalam metode ini, sampel ditambahkan dengan pereaksi vanillin (10% dalam etanol 95%) dan asam klorida pekat yang dilanjutkan dengan pemanasan diatas tangas air. Larutan campuran ditambahkan dengan etanol kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 530nm. Kadar tannin dihitung dalam % b/b dengan pembanding katekin.

D. Golongan Saponin

Senyawa saponin memiliki sifat sebagai sabun dan mampu menyebabkan hemolisa darah, sehingga dengan adanya sifat ini dapat dijadikan dasar dalam identifikasi keberadaan saponin. Penentuan kualitatif pada saponin dideteksi dengan uji busa dalam air panas. Penggojogan antara sampel ekstrak dengan pelarut air akan menimbulkan busa, busa atau buih yang stabil selama 15 menit dan tidak hilang ketika ditambahkan HCl menunjukkan adanya saponin.

Penetapan kadar saponin dapat dilakukan dengan hemolisa. Suspensi darah dibuat dari darah sapi segar yang ditambahkan dengan natrium sitrat, larutan stabil selama 7 hari ketika disimpan dilemari pendingin. Identifikasi dilakukan dengan menambahkan larutan dapar fosfat (pH 7,4) pada larutan campuran. Hemolisis darah ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi jernih/transparan. Hemolisis terjadi ketika didalam

sampel mengandung saponin. Hasil pembacaan dinyatakan dengan indeks saponin yakni perbandingan antara kadar ekstrak terkecil yang memberikan hemolisis dengan saponin standar terendah yang memberikan hemolisis (Depkes RI, 2000).

E. Golongan Minyak atsiri

Minyak atsiri merupakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki sifat mudah menguap dan bau yang khas. Minyak atsiri dalam keadaan murni ketika diteteskan pada kertas perkamen tidak menimbulkan noda. Untuk memperoleh minyak atsiri, terdapat beberapa metode isolasi yang lazim dilakukan, yakni :

1. Metode destilasi

Prinsip dasar metode ini adalah memanfaatkan perbedaan titik didih.

2. Metode penyarian dengan menggunakan pelarut yang sesuai

Prinsip dasar metode ini adalah adanya perbedaan kelarutan. Sifat kelarutan minyak atsiri adalah sangat mudah larut dalam pelarut organik dan sukar larut dalam pelarut air.

3. Metode pengepresan

Metode ini sangat cocok untuk simplisia dengan minyak atsiri yang sifatnya mudah mengalami dekomposisi senyawa akibat pengaruh suhu. Simplisia yang diisolasi dengan metode ini umumnya memiliki kadar minyak atsiri yang tinggi.

4. Metode *enfleurage*

Metode ini merupakan ekstraksi dengan lemak dingin. Pada teknik ini proses enfleurasi memanfaatkan minyak lemak untuk mengadsorpsi aroma dari sampel.

Pada penetapan kadar minyak atsiri dapat ditetapkan dengan destilasi uap dan Stahl (air). Alat destilasi yang digunakan harus diperuntukan untuk penetapan kadar minyak atsiri. Tahapannya sebagai berikut : Sampel ekstrak ditambahkan air suling kemudian labu dipanaskan hingga penyulingan selesai. Suhu alat diatur sehingga destilat yang keluar dapat menetes teratur. Pemanasan yang terlalu tinggi akan menyebabkan destilat menetes terlalu cepat sehingga akan teruap kembali, dan bila terlalu dingin, maka waktu destilasi akan lama dan tidak efisien. Ketika penyulingan selesai, dinginkan selama 15 menit dan catat volume atsiri dalam buret. Kadar atsiri dihitung dalam persen, dimana :

Rumus kadar minyak atsiri total =

$$\frac{\text{VOLUME MINYAK ATSIRI}}{\text{BERAT EKSTRAK}} \times 100 \%$$

Kadar minyak atsiri tidak boleh lebih dari 1% v/b (jika komponen non volatile yang diutamakan dalam ekstrak).

F. Golongan Alkaloid

Senyawa alkaloid memiliki bobot molekul yang kecil dengan ciri khas mengandung unsur nitrogen pada cincin heterosiklis serta bersifat basa. Kebanyakan alkaloid yang terdapat ditanaman dalam bentuk turunan amin primer, sekunder, tersier dan kuarternar. Umumnya alkaloid basa larut dalam pelarut organik sedangkan dalam bentuk garamnya larut dalam air. Identifikasi kualitatif alkaloid dapat dilakukan dalam beberapa cara :

1. Pereaksi pengendap alkaloid

Adapun beberapa pereaksi yang umum digunakan dalam identifikasi ini adalah pereaksi Dragendorff (larutan iodobismutat) yang jika positif menimbulkan endapan jingga, pereaksi Mayer (larutan kalium merkuri-iodida) dengan hasil positif berupa endapan putih kekuningan, pereaksi Wagner hasil positif endapan warna merah bata, dan pereaksi Hager (larutan asam pikrat pekat) dengan hasil positif endapan kuning.

2. Metode KLT

Dalam metode ini fase diam yang digunakan silika gel 60 F₂₅₄, dan system fase gerak yang dapat digunakan sebagai berikut :

Tabel 7.1. Sistem Fase Gerak untuk Identifikasi Alkaloid

Fase Diam	Fase Gerak
Silika Gel	CHCl ₃ : Aseton : Dietilamin (50 : 40 : 10)
	Toluen : Etil asetat : Dietilamin (70 : 20 : 10)
	Etil asetat : MeOH : H ₂ O (100 : 13.5 : 10)
	Aseton : H ₂ O : Amonia pekat (90 : 7 : 3)
	Kloroform : Dietilamin (90 : 10)
	Toluen : MeOH (86 : 14)

Dalam identifikasi kualitatif menggunakan KLT, pengamatan bercak dapat dilakukan dengan atau tanpa pereaksi semprot. Pereaksi Dragendorff dapat digunakan sebagai pereaksi semprot yang diperjelas dengan penambahan penyemprotan larutan natrium nitrit 5% (dalam air atau H₂SO₄ dalam etanol). Selain pereaksi Dragendorff, pereaksi Marquis dan Murexida juga dapat digunakan.

Penetapan kadar alkaloid dapat dilakukan dengan berbagai cara, seperti gravimetric, titrimetric, spektrometri, maupun HPLC. Metode titrimetric terbagi menjadi dua yaitu titrasi asam basa untuk alkaloid yang bersifat basa cukup kuat dan titrasi bebas air (TBA) untuk alkaloid basa lemah.

1. Metode Gravimetri

Larutan ekstrak ditambahkan asam asetat 10%, dikocok dan disaring dengan kertas saring yang sudah ditimbang. Filtrate yang sudah dipekatkan kemudian ditambahkan ammonium hidroksida sehingga terbentuk endapan. Endapan dicuci lagi dengan

ammonium hidroksida dan dikeringkan pada suhu 60 °C selama 30 menit, dinginkan. Endapan ditimbang hingga bobot konstan dan hitung rendemen alkaloid. Pengujian diulang sebanyak 3 kali. Kadar alkaloid total yang dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kadar} = \frac{x_2 - x_1}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

x_1 : bobot kertas saring (g)

x_2 : bobot kertas saring dengan endapan (g)

A : bobot ekstrak

2. Metode Titrimetri

Simplisia ditimbang kemudian dimasukkan kedalam Erlenmeyer bertutup, kemudian tambahkan eter dan NaOH, dikocok secara berulang dan disaring. Filtrat dimasukkan kedalam corong pisah, tambahkan air suling, kocok dan diamkan hingga terbentuk lapisan. Lapisan eter diambil dan tambahkan indicator metil jingga, kemudian dititrasi dengan HCl 0,025 N. Kadar alkaloid total dihitung dari kesetaraan 1 ml HCl 0.025 N setara dengan 3,675 mg alkaloid.

G. Golongan Antrakuinon

Identifikasi kualitatif antrakuinon dilakukan dengan system KLT menggunakan fase diam silika Gel 60 F₂₅₄ dan beberapa system fase gerak seperti Etil asetat – Metanol – air (100 : 13,5 : 10) untuk semua turunan antraken, npropanol - etil asetat – air - asam asetat glasial (40:40:29:1) untuk sampel ekstrak Senna dan petroleum eter – etil asetat – asam format (75 : 25 : 1) untuk aglikon antrakuinon. Keberadaan antrakuinon dapat dideteksi dibawah lampu UV 254 dimana semua turunan antrakena terjadi peredaman, sedangkan dibawa lampu UV 365 semua turunan antrakena berfluoresensi kuning atau merah kecoklatan. Deteksi juga dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi semprot KOH 5% atau 10% dalam etanol (Reaksi borntrager) yang menunjukkan warna merah pada sinar tampak, fluoresensi merah pada lampu UV 365 nm (Bladt dan Wagner, 1996).

Penetapan kadar senyawa ini tergantung dari bentuk antrakuinonnya. Antrakuinon aglikon dapat ditetapkan kadarnya dari ekstrak non polar, dimana simplisia diekstraksi dengan pelarut benzene, ekstrak benzene yang diperoleh diuapkan dan residu ditambahkan KOH menghasilkan larutan berwarna. Warna yang terbentuk diukur serapannya pada panjang gelombang 515nm. Kadar antrakuinon total ditentukan dengan menggunakan pembanding.

Penetapan kadar antrakuinon glikosida dilakukan dengan cara ekstrak dikocok dengan air panas selama 5 menit, saring dalam keadaan panas dan dinginkan. Filtrat diekstraksi dengan benzene, akan terbentuk 2 lapisan. Lapisan air diambil dan ditambahkan FeCl₃ 5% dan HCl, panaskan diatas tangas air selama 10 menit, dinginkan. Larutan campuran diekstraksi dengan pelarut benzene sebanyak 3 kali, lapisan benzene diuapkan, residu ditambahkan dengan KOH 5% dalam methanol. Absorbansi diukur pada panjang

gelombang maksimum (range 506 - 515nm). Kadar antrakuinon total dihitung berdasarkan pembandingan antrakuinon yang digunakan.

H. Golongan Steroid

Identifikasi kualitatif dapat dilakukan dengan cara kromatografi lapis tipis menggunakan pereaksi semprot. Beberapa pereaksi semprot yang dapat digunakan seperti p-anisaldehyd berupa bercak noda berwarna violet, biru, merah, abu-abu atau hijau. Pereaksi antimony (III) chloride atau pereaksi *Carr-Price* menunjukkan bercak noda berwarna biru/hijau – merah. Penetapan kadar total steroid tidak dilakukan tetapi sebaiknya penetapan dilakukan berdasarkan marker sterol tertentu dengan metode KLT-densitometri atau kromatografi gas-cair. Kedua metode ini akan memberikan hasil berupa data kualitatif dan kuantitatif yang baik.

I. Golongan Kumarin

Sampel ekstrak diuji KLT dengan penampak bercak NaOH, kemudian diamati dibawah lampu UV 365nm. Senyawa kumarin akan menunjukkan fluoresensi kuning kebiruan. Sedangkan untuk penetapan kadar kumarin total dengan metode fluorometri yang dimodifikasi dengan spektrofotometri UV. Larutan ekstrak 1% ditambahkan dengan natrium hidroksida, diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 331nm. Pembandingan yang digunakan adalah kumarin 0,1%.

7.1.4. Kelarutan Ekstrak Dalam Air dan Etanol

Penetapan kadar ini bertujuan untuk mengkalkulasi persentase senyawa polar dan semipolar – nonpolar yang terkait dengan aktifitas farmakologi.

a. Metode penetapan kadar sari larut air

Ekstrak dimaserasi dengan pelarut air-kloroform LP selama 24 jam sambil dikocok pada 6 jam pertama, diamkan selama 18 jam, saring. Filtrate air diuapkan dalam cawan yang sudah ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Kadar sari larut air dihitung dalam persen terhadap ekstrak awal.

b. Metode penetapan kadar sari larut etanol

Ekstrak dimaserasi dengan pelarut etanol 96% selama 24 jam sambil 6 jam pertama dikocok, diamkan selama 18 jam, saring cepat. Filtrate diuapkan dalam cawan yang sudah ditara, residu dipanaskan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Kadar sari larut etanol dihitung dalam persen terhadap ekstrak awal (Depkes RI, 2000).

Latihan 7

1. Sebutkan aspek yang harus ditetapkan pada parameter spesifik dalam ketentuan umum mutu ekstrak menurut Depkes-BPOM !
2. Sebutkan faktor-faktor yang menjadi keberhasilan memunculkan profil KLT senyawa target !
3. Sebutkan permasalahan yang dihadapi saat penetapan kadar marker !
4. Sebutkan metode yang dapat digunakan dalam penetapan kadar flavonoid total
5. Apa saja pereaksi pengendap yang digunakan dalam analisis kualitatif alkaloid ?

Jawaban 7

1. Jawaban :
 - Profil KLT
 - Penetapan kadar marker
 - Penetapan kada total golongan metabolit
 - Kelarutan ekstrak dalam air dan etanol
2. Jawaban :
 - Sistem kromatografi (fase diam dan fase gerak)
 - Jenis pelarut (terhadap senyawa target dalam ekstrak)
 - Jumlah penimbangan ekstrak (terlalu kecil sehingga marker tidak terbaca maka jumlah penimbangan harus ditingkatkan)
 - Pemilihan metode visualisasi dengan cara fisika (sinar UV 254 / 366nm) dilanjutkan dengan cara kimia (reagen spesifik / semprot)
3. Jawaban :
 - Senyawa target yang tidak berwarna
 - Senyawa marker tersedia dalam jumlah terbatas
 - Bentuk peak pada pembacaan densitometer maupun HPLC tidak terbatas
 - Linearitas dan reproduibilitas rendah
4. Jawaban :
 - Metode Chang
 - Metode Zhou
 - Metode Lain (HPLC atau Kromatografi Gas)
5. Jawaban :

Pereaksi Dragendorff (larutan iodobismutat) yang jika positif menimbulkan endapan jingga, pereaksi Mayer (larutan kalium merkuri-iodida) dengan hasil positif berupa endapan putih kekuningan, pereaksi Wagner hasil positif endapan warna merah bata, dan pereaksi Hager (larutan asam pikrat pekat) dengan hasil positif endapan kuning.

Rangkuman 7

Penentuan parameter spesifik dilakukan dengan mengukur aspek kandungan kimia (baik kualitatif maupun kuantitatif), dimana kandungan kimia tersebut yang bertanggung jawab terhadap aktifitas farmakologi tertentu. Senyawa marker merupakan senyawa yang secara alami terdapat dalam tumbuhan baik dengan atau tanpa aktifitas farmakologi. Adapun kriteria senyawa marker meliputi senyawa aktif yang merupakan komponen senyawa yang memiliki aktifitas farmakologi secara langsung, senyawa utama dalam tumbuhan jumlahnya melimpah tetapi belum tentu memberikan aktifitas farmakologi secara langsung, senyawa identitas merupakan komponen spesifik, unik, khas, serta eksklusif yang hanya terdapat pada suatu tanaman obat, sedangkan senyawa aktual adalah senyawa apapun asalkan terdapat didalam tanaman yang dianalisis.

Ketentuan umum mutu ekstrak menurut DEPKES-BPOM (2000, 2004) menyebutkan bahwa aspek yg harus ditetapkan pada parameter spesifik adalah profil KLT, penetapan kadar marker, penetapan kadar total golongan metabolit (golongan fenolat, flavonoid, tannin, saponin, minyak atsiri, alkaloid, antrakuinon, steroid, kumarin), dan kelarutan ekstrak dalam air dan etanol.

Tes Formatif 7

1. KLT menunjukkan setidaknya senyawa aktif (*marker*) betul ada di dalam ekstrak atau secara kimiawi otentik yakni berasal dari tanaman yang benar. Memunculkan profil KLT senyawa target dipengaruhi beberapa hal berikut ini, kecuali
 - A. Fase diam
 - B. Senyawa pembanding
 - C. Jumlah ekstrak yang ditimbang
 - D. Jenis pelarut
 - E. Metode visualisasi
2. Dalam menetapkan kadar total golongan metabolit sekunder tertentu, misal: fenolat, flavonoid, alkaloid, antrakinon, kumarin, saponin, akan muncul beberapa permasalahan, seperti
 - A. Golongan senyawa mudah di deteksi
 - B. Beberapa metode standar tidak aplikatif
 - C. Semua instrument bias diterapkan untuk analisis kadar total
 - D. Kadar yang diperoleh sangat spesifik
 - E. Pelarut sulit diperoleh
3. Salah satu manfaat penggunaan KLT adalah untuk melakukan identifikasi suatu senyawa. Pada identifikasi senyawa flavonoid menggunakan KLT, pereaksi semprot/deteksi yang digunakan adalah
 - A. Sitoborat
 - B. Asam sulfat
 - C. Dragendorff
 - D. Ferri klorida

E. Vanilin /Asam sulfat

4. Minyak atsiri merupakan suatu komponen yang terdapat didalam tumbuhan. Minyak atsiri disebut juga sebagai minyak volatile atau mudah menguap. Metode ekstraksi apakah yang paling tepat untuk mendapatkan minyak atsiri ?
 - A. Maserasi
 - B. Infundasi
 - C. Dekokta
 - D. Perkolasi
 - E. Destilasi

5. Suatu ekstrak diuji menggunakan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorf. Terbentuk endapan putih atau keruh dengan pereaksi Mayer, endapan coklat dengan pereaksi Wagner dan endapan orange dengan pereaksi Dragendorf. Dapat disimpulkan ekstrak tersebut mengandung senyawa
 - A. Saponin
 - B. Tanin
 - C. Flavonoid
 - D. Alkaloid
 - E. Antrakuinon

Jawaban Test Formatif 7

1. B
2. B
3. A
4. E
5. D

MATERI 8: MONOGRAFI EKSTRAK TUMBUHAN OBAT 1 DAN 2

Metode Pembelajaran	Estimasi Waktu	CPMK
<ul style="list-style-type: none"> • Kuliah Interaktif • Diskusi • <i>Question Based Learning</i> 	150 menit	CPMK-4: Menunjukkan penguasaan konsep teoritis tentang standarisasi dan penentuan marker Obat Bahan Alam; (CPL-4)

8.1. Pendahuluan

Indonesia memiliki keanekaragaman obat tradisional yang dibuat dari bahan-bahan alami bumi Indonesia, termasuk tanaman obat. Di Indonesia terdapat sekitar 30.000 jenis tanaman dan 7000 diantaranya memiliki khasiat obat serta kurang lebih 300 spesies telah digunakan sebagai bahan baku obat tradisional. Pemanfaatan tanaman obat dapat berupa simplisia sebagai bahan baku awal. Dalam buku *Materia Medika Indonesia*, ditetapkan definisi bahwa simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibedakan menjadi simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan.

Memasuki abad ke- 21 sebagai era globalisasi, perkembangan teknologi dan bentuk pemanfaatan tumbuhan obat di Indonesia dalam pelayanan kesehatan telah mengenal serta menggunakan konsep ekstrak. Simplisia tumbuhan obat merupakan bahan baku proses pembuatan ekstrak, baik sebagai bahan baku atau obat. Sedangkan ekstrak tumbuhan obat sebagai bahan dan produk, dibuat dari bahan baku tumbuhan obat. Dalam bentuk bahan dan produk kefarmasian baru, yaitu ekstrak, maka selain persyaratan monografi bahan baku (simplisia), juga diperlukan persyaratan parameter standar umum dan spesifik. Parameter spesifik ekstrak yang sebagian besar berupa analisis kimia yang memberikan informasi komposisi senyawa kandungan (jenis dan kadar) juga harus memenuhi monografi ekstrak tumbuhan obat.

8.2. Monografi ekstrak tumbuhan obat 1

1) Bawang putih (*Allium sativum* L.)

Nama tumbuhan : *Allium sativum* L.

Famili : Liliaceae

Nama Indonesia : Bawang putih

Pemerian simplisia : Organoleptik:

Warna : Putih

Bau : Khas aromatis

Rasa : Pedas, agak kelat

Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 70%

Randeman tidak kurang dari 56,2%

- Kandungan kimia : Asam amino aliin, senyawa alisin, minyak atsiri dengan komponen ajoen, alil alkohol, dialil disulfida, dialil trisulfida, metil alil disulfida, dimetil trisulfida, alil metil trisulfida, saponin, flavonoid.
- Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental
Warna : Coklat
Bau : Khas aromatis menyengat
Rasa : Pedas, agak kelat
- Parameter ekstrak : Non spesifik
Kadar air : tidak lebih dari 11,7%
Kadar abu total : tidak lebih dari 2,7%
Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 0,7%
- Kandungan kimia dalam ekstrak : Spesifik
Senyawa identitas alisin
Pola kromatogram (KLT)
Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
Fase gerak : Toluena:etil asetat (70:30)
Deteksi : UV₂₅₄ nm
Zat pembanding : Alilsistein
Konsentrat ekstrak 5%, volume penotolan 3 µl, jarak rambat 8 cm.
Kadar golongan kandungan kimia : Penetapan minyak atsiri, kadar tidak kurang dari 13%
Kadar senyawa identitas : Alisin tidak kurang dari 13%
- Kegunaan berdasar penelitian : Aliin yang mudah terkonversi menjadi alisin mempunyai aktifitas sebagai antibakteri kuat, penurun lemak darah, antioksidan, fibrinolitik.
Senyawa dialil sulfida dan trialil sulfida mempunyai aktifitas antibakteri.



Gambar 8.1. Bawang Putih (*Allium sativum* L.)
(Sumber gambar: Google)

2) Brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex F & Terms)

- Nama tumbuhan : *Tinospora crispa* (L.) Miers ex F & Terms
Famili : Menispermaceae
Nama Indonesia : Brotowali
Pemerian simplisia : Organoleptik:
Warna : Coklat kehitaman
Bau : Khas
Rasa : Pahit
- Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 70%
Randeman tidak kurang dari 18,5%
- Kandungan kimia : Senyawa alkaloid palmitin, berberin, jatrorrhizin, tembetarid, tinokrisposid, tinotuberid, borapetol, pikroretin, siringin, pikroretosid.
- Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental
Warna : Coklat tua
Bau : Khas
Rasa : Pahit
- Parameter ekstrak : Non spesifik
Kadar air : tidak lebih dari 15,0 %
Kadar abu total : tidak lebih dari 12,5 %
Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 0,2 %
- Spesifik
Senyawa identitas tinokrisposida (diterpenoid)
- Kandungan kimia : Pola kromatogram (KLT)
dalam ekstrak : Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
Fase gerak : Kloroform:metanol (90:10 v/v)
Deteksi : Pereaksi anisaldehyd-asam sulfat
Zat pembanding : Tinokrisposida
Konsentrat ekstrak 0,1%, volume penotolan 10 µl, jarak rambat 8 cm.
Kadar golongan kandungan kimia :
Penetapan kadar tinokrisposida dengan KCKT
Kadar senyawa identitas :
Tinokrisposida tidak kurang dari 0,3%
- Kegunaan berdasar : Mampu menekan pertumbuhan parasit plasmodium
penelitian falciparum yang resisten terhadap kloroquin. Antifilaria pada cacing *Brugia malayi*. Penelitian klinis pada diabetes tipe 2 tidak menimbulkan efek penurunan gula darah yang nyata.



**Gambar 8.2. Brotowali *Tinospora crispa (L.) Miers ex F & Terms*
(Sumber gambar: Google)**

3) Buah merah (*Pandanus conoideus* (Lamk.))

Nama tumbuhan : *Pandanus conoideus* (Lamk.)

Famili : Pandanaceae

Nama Indonesia : Buah merah

Pemerian simplisia : Organoleptik:

Warna : Merah

Bau : Tidak berbau

Rasa : Seperti minyak lemak

Teknologi ekstraksi : Pemasakan : buah dibersihkan dari empulurnya lalu dimasak dengan air dua kali bobot buah merah selama 30 menit, didinginkan, cairan dipisahkan dan dipadatkan

Randeman tidak kurang dari 3,3%

Kandungan kimia : Senyawa karotenoid, β -karoten, α -tokoferol, asam oleat, linoleat, linolenat, dan dekanolat

Pemerian ekstrak : Bentuk : Cairan kental

Warna : Merah

Bau : Khas

Rasa : Minyak

Parameter ekstrak : Non spesifik

Kadar abu total : tidak lebih dari 3,7 %

Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 0,2 %

Titik beku : 4-8 derajat C

Bobot jenis : 0,9035

Asam lemak bebas : tidak lebih dari 513

Bilangan iodium : 26-29

Bilangan penyabunan : 29-30,1

Indeks bias : 1,4532 (pada 30 derajat C)

Spesifik

Senyawa identitas β -karoten

Kandungan kimia : Pola kromatogram (KLT)

dalam ekstrak	Fase diam	: Silika gel GF ₂₅₄
	Fase gerak	: n-heksan:etil asetatl (3:1)
	Deteksi	: UV ₃₆₆ nm
	Zat pembanding	: β-karoten ²
	Konsentrat ekstrak	5% minyak buah merah tersaponifikasi dengan KOH, volume penotolan 5 µl, jarak rambat 8 cm.
	Kadar senyawa identitas :	
	Ditetapkan kadar karotenoid total	
	Kadar senyawa identitas :	
	Kadar karetenoid sebagai β-karoten	tidak kurang dari 0,8%
Kegunaan berdasar penelitian	:	Belum ada
		Secara tradisional sebagai bahan makanan utnuk membantu gangguan pencernaan membantu memelihara kesehatan.



**Gambar 8.3. Buah Merah (*Pandanus conoideus* (Lamk))
(Sumber gambar: Google)**

- 4) Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Val.))
- | | | |
|---------------------|---|--|
| Nama tumbuhan | : | <i>Phaleria macrocarpa</i> (Val.) |
| Famili | : | Thymelaeceae |
| Nama Indonesia | : | Mahkota dewa |
| Pemerian simplisia | : | Organoleptik: |
| | | Warna : Kuning muda |
| | | Bau : Khas |
| | | Rasa : Pahit |
| Teknologi ekstraksi | : | Maserasi dengan etanol 70% |
| | | Randeman tidak kurang dari 29,3% |
| Kandungan kimia | : | Senyawa golongan flavonoid, lignan, saponin, antrakinon, tanin, fenol, steroid/triterpenoid, 4,5-dihidroksi-4'-metoksibenzofenon-3-O-glukosida (falerin) dan 4',6-dihidroksi-4metoksibenzofenon-2-O-glukosida (falerianin). |
| Pemerian ekstrak | : | Bentuk : Kental |

	Warna : Coklat
	Bau : Khas
	Rasa : Pahit
Parameter ekstrak	: Non spesifik
	Kadar air : tidak lebih dari 11,6 %
	Kadar abu total : tidak lebih dari 6,8 %
	Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 2,9 %
	Spesifik
	Senyawa identitas falerin
Kandungan kimia dalam ekstrak	: Pola kromatogram (KLT)
	Fase diam : Silika gel GF ₂₅₄
	Fase gerak : Kloroform:metanol (7:3)
	Deteksi : UV ₃₆₆ nm
	Zat pembanding : Falerin
	Konsentrat ekstrak 20 %, volume penotolan 1 µl, jarak rambat 8 cm.
	Kadar senyawa identitas :
	Falerin tidak kurang dari 8,6%
Kegunaan berdasar penelitian	: Mempunyai efek fagositosis makrofag in vitro
	Secara tradisional untuk penderita kanker dan kencing manis



**Gambar 8.4. Mahkota Dewa (*Phaleria macrcarpa* (Val))
(Sumber gambar: Google)**

- 5) Temu mangga (*Curcuma mangga* (Val.) Miers ex Hook F.& Terms)
- | | |
|--------------------|--|
| Nama tumbuhan | : <i>Curcuma mangga</i> (Val.) Miers ex Hook F.& Terms |
| Famili | : Zingiberaceae |
| Nama Indonesia | : Temu mangga |
| Pemerian simplisia | : Organoleptik: |
| | Warna : Kekuning-kuningan |
| | Bau : Khas |
| | Rasa : Tidak jelas |

- Teknologi ekstraksi : maserasi dengan etanol 70%
 Randeman tidak kurang dari 9,1%
- Kandungan kimia : Senyawa diterpen glukosida, kurkumangosida, kalkaratin A, zerumin B, skopoletin, kurkumin, desmetoksikurkumin, bisdesmetoksi-kurkumin, asam p-hidroksisinamat, minyak atsiri alfa pinen, linalool, safrol.
- Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental
 Warna : Coklat
 Bau : Khas
 Rasa : Pahit
- Parameter ekstrak : Non spesifik
 Kadar air : tidak lebih dari 9,5 %
 Kadar abu total : tidak lebih dari 8,1 %
 Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 1,7 %
 Spesifik
 Senyawa identitas kurakumangosida
- Kandungan kimia : Pola kromatogram (KLT)
 dalam ekstrak Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
 Fase gerak : kloroform:metanol (19:1)
 Deteksi : UV₃₆₆ nm
 Zat pembanding : kurkumin
 Konsentrat ekstrak 10%, volume penotolan 1 µl, jarak rambat 8 cm.
 Kadar golongan kandungan kimia :
 Penetapan kadar minyak atsiridengan destilasi air:
 Kadar tidak kurang dari 0,2% v/b
- Kegunaan berdasar : memiliki aktifitas antioksidan dan sitotoksisitas terhadap
 penelitian beberapa sel kanker.



**Gambar 8.5. Temu Mangga *Curcuma mangga* (Val.) Miers ex Hook F.& Terms
 (Sumber gambar: Google)**

6) Saga (*Abrus precatorius*)

- Nama tumbuhan : *Abrus precatorius*
Famili : Fabaceae
Nama Indonesia : Saga
Pemerian simplisia : Organoleptik:
Warna : Hijau
Bau : Khas lemah
Rasa : Manis agak pahit
- Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 95%
Randeman tidak kurang dari 10,3%
- Kandungan kimia : Glikosida setrodi abrusida, triterpenoid saponin, abrukinon, alkaloid turunan triptofan, flavonoid berupa 6,4'-dimetoksi-7,3'-dihidroksiflavin dan desmetoksisentaureidin-7-O-rutinosida
- Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental
Warna : Coklat kehijauan
Bau : Agak aromatis
Rasa : Manis
- Parameter ekstrak : Non spesifik
Kadar air : tidak lebih dari 8,4%
Kadar abu total : tidak lebih dari 1,0 %
Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 0,4 %
Spesifik
Senyawa identitas abrusosida
- Kandungan kimia : Pola kromatogram (KLT)
dalam ekstrak Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
Fase gerak : toluen:etil asetatl (7:3)
Deteksi : anisaldehyd asam sulfat
Zat pembanding : asam ursolat
Konsentrat ekstrak 5% dalam metanol, volume penotolan 10 µl, jarak rambat 8 cm.
Kadar golongan kandungan kimia :
Penetapan minyak atsiri, kadar tidak kurang dari 0,1%
Kadar senyawa identitas :
Abrusosida total tidak kurang dari 0,4%
- Kegunaan berdasar : Antiinflamasi dan antialergi disebabkan karena triterpenoid penelitian saponin, abrusosida diteliti sebagai pemanis dan tingkat kemanisannya 30-100 x dibanding gula pasir. Secara tradisonla digunakan sebagai obat panas dalam.



**Gambar 8.6. Saga (*Abrus precatorius*)
(Sumber gambar: Google)**

7) Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)

Nama tumbuhan : *Blumea balsamifera* (L.) DC.

Famili : Asteraceae

Nama Indonesia : Cembung

Pemerian simplisia : Organoleptik:

Warna : Hijau kecoklatan

Bau : Aroma khas

Rasa : Agak pahit

Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 70%

Randeman tidak kurang dari 28,2%

Kandungan kimia : Minyak atsiri dengan komponen utama kamfor, sineol, borneol, limonen, asam miristat, asam palmitat, tanin dan flavonoid dihidrokuersetin-4'-metileter dan dihirokuersetin-7,4'-dimetilater.

Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental

Warna : Coklat gelap

Bau : Khas

Rasa : Agak pahit

Parameter ekstrak : Non spesifik

Kadar air : tidak lebih dari 14,4 %

Kadar abu total : tidak lebih dari 6,7 %

Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 2,5 %

Spesifik

Senyawa identitas kamfora

Kandungan kimia : Pola kromatogram (KLT)

dalam ekstrak Fase diam : Silika gel GF₂₅₄

Fase gerak : kloroform:metanol (2:1)

Deteksi : Pereaksi sitroborat-sinar UV_{366 nm}

Zat pembanding : Kuersetin

Konsentrat ekstrak 10%, volume penotolan 1 µl, jarak rambat 8 cm.

Kadar senyawa identitas : Kamfora

Ditetapkan kadar karotenoid total

Kadar flavonoid total tidak kurang dari 2,4%

Kegunaan berdasar : Mampu mengurangi fertilitas pada binatang percobaan dalam penelitian bentuk infusa, sebagai antimikroba dan antioksidan yang kuat daripada vitamin. Secara tradisonal untuk nafsu makan, cacingan, pegal linu, pusing, susah BAB, untuk kesehatan kulit dan fungsi pencernaan.

Hasil penelitian yang dianalisis dengan ANOVA satu arah menunjukkan pemberian ekstrak etanol daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) pada mencit putih jantan dengan dosis 200 mg/kg BB dapat menurunkan kadar glukosa darah dan memperbaiki gambaran pankreas yang telah rusak (Aried Eriadi, Rahimatul Uthia, 2017).



**Gambar 8.7. Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC)
(Sumber gambar: Google)**

8) Teki (*Cyperus rotundus* L.)

Nama tumbuhan : *Cyperus rotundus* L.

Famili : Cyperaceae

Nama Indonesia : Teki

Pemerian simplisia : Organoleptik:

Warna : Coklat

Bau : Khas aromatis

Rasa : Agak pedas, agak pahit, menimbulkan rasa tebal di lidah

Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 95%

Randeman tidak kurang dari 10,3%

- Kandungan kimia : 7,4'-dimetoksikuersetin, alkaloid, resin berprotein, gula, amyllum, minyak atsiri dengan komponen seskuiterpen antara lain (-)isorotunden, (-)-siperadion, 4,5-sekoeudesman dan siperolon.
- Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental
Warna : Coklat tua
Bau : Khas aromatis
Rasa : Agak pahit
- Parameter ekstrak : Non spesifik
Kadar air : tidak lebih dari 10,1 %
Kadar abu total : tidak lebih dari 0,9 %
Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 0,3 %
Spesifik
Senyawa identitas 7,4'-dimetoksikuersetin
- Kandungan kimia dalam ekstrak : Pola kromatogram (KLT)
Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
Fase gerak : toluen:etil asetatl (7:3)
Deteksi : Pereaksi sitoborat-sinar UV₃₆₆ nm
Zat pembanding : Kuersetin
Konsentrat ekstrak 5%, volume penotolan 20 µl, jarak rambat 8 cm.
Kadar minyak atsiri tidak kurang dari 0,7%
- Kegunaan berdasar penelitian : Ekstrak metanolik dengan dosis 250 mg dan 500 mg/kg BB menunjukkan efek antidiare pada mencit yang diinduksi minyak jarak. Penggunaan secara tradisional untuk memperlancar buang air kecil dan menambah nafsu makan



**Gambar 8.8. Teki (*Cyperus rotundus* L.)
(Sumber gambar: Google)**

A. Monografi ekstrak tumbuhan 2:

1) Belimbing wuluh (*Averrhoa blimbi* L.)

Nama tumbuhan : *Averrhoa blimbi* L.

Famili : Oxalidaceae

Nama Indonesia : Belimbing wuluh

Pemerian simplisia : Organoleptik:

Warna : Hijau kecoklatan

Bau : Tidak berbau

Rasa : Tidak berasa

Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 70%

Randeman tidak kurang dari 31,6%

Kandungan kimia : Kumarin, flavonoid, saponin, tanin dan asam-asam organik.

Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental

Warna : Hitam kehijauan

Bau : Tidak berbau

Rasa : Tidak berasa

Parameter ekstrak : Non spesifik

Kadar air : tidak lebih dari 18,3 %

Kadar abu total : tidak lebih dari 10,4 %

Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 0,07 %

Spesifik

Senyawa identitas flavonoid

Kandungan kimia : Pola kromatogram (KLT)

dalam ekstrak Fase diam : Silika gel GF₂₅₄

Fase gerak : butanol:asam asetat:air (4:1:5 lapisan atas)

Deteksi : Aluminium klorida dan sinar UV₃₆₆ nm

Zat pembanding : Rutin

Konsentrat ekstrak 5%, volume penotolan 5 µl, jarak rambat 8 cm.

Penetapan kadar flavonoid total dengan menggunakan spektrofotometer dengan kadar flavonoid total tidak kurang dari 0,7%.

Kegunaan berdasar penelitian : Ekstrak etanol pada dosis 125 mg/kg BB selama 2 minggu memiliki efek hipoglikemik, hipotrigliserida, antilipid peroksidatif. Secara tradisional untuk nyeri sendi, kencing manis, demam, darah tinggi dan salesma.



**Gambar 8.9. Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)
(Sumber gambar: Google)**

2) Herba ceplukan (*Physalis minima herbae*)

Nama tumbuhan : *Physalis minima* L.

Famili : Solanaaceae

Nama Indonesia : Ceplukan

Pemerian simplisia : Organoleptik:

Warna : Hijau kekuningan

Bau : Khas

Rasa : Pahit

Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 70%

Randeman tidak kurang dari 9,6%

Kandungan kimia : Senyawa steroid fisalin-A, fisalin B, fisalin-D, epoksifisalin-B, wita-fisalin-A, wita-fisalin-B, wita-fisalin-C, flavonoid 5-metoksi-6,7-metilendioksiflavon dan 5,6,7-trimetoksiflavon.

Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental

Warna : Coklat gelap

Bau : Tidak khas

Rasa : Pahit

Parameter ekstrak : Non spesifik

Kadar air : tidak lebih dari 11,7 %

Kadar abu total : tidak lebih dari 12,2 %

Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 0,7 %

Spesifik

Senyawa identitas fisalin A dan B

Kandungan kimia : Pola kromatogram (KLT)

dalam ekstrak Fase diam : Silika gel GF₂₅₄

Fase gerak : n-heksan:etil asetat:metanol (4:14:1)

Deteksi : Sinar UV₃₆₆ nm

Zat pembanding : Apigenin

Konsentrat ekstrak 10%, volume penotolan 1 µl, jarak rambat 8 cm.

Kadar golongan kandungan kimia :

Kadar steroid tidak kurang dari 5,8%

Kegunaan berdasar : Memiliki aktifitas menurunkan kadar gula darah dengan uji penelitian toleransi maupun uji aloksan pada biantang percobaan. Fisalin-X menyebabkan aborsi pada lebih 75% tikus yang diberi fisalin-X 100 mg/kg BB. LD50 intraperitoneal adaah 1 g/kg. Secara tradisional untuk mengurangi BAB, mamadatkan ginjal dan menjaga fungsi hati.



**Gambar 8.10. Ceplukan (*Physalis minima herbae*)
(Sumber gambar: Google)**

3) Kayu manis (*Cinnamomum burmannii*)

Nama tumbuhan : *Cinnamomum burmanni* Blume

Famili : Lauraceae

Nama Indonesia : Kayu manis

Pemerian simplisia : Organoleptik:

Warna : Coklat

Bau : Khas aromatis

Rasa : Pedas dan manis

Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 70%

Randeman tidak kurang dari 27,5%

Kandungan kimia : Minyak atsiri dengan komponen utama sinamaldehyd dan eugenol

Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental

Warna : Coklat kemerahan

Bau : Khas aromatis

Rasa : Pedas dan agak manis

Parameter ekstrak : Non spesifik

Kadar air : tidak lebih dari 16,5 %

Kadar abu total : tidak lebih dari 0,3 %

Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 0,1 %
 Spesifik
 Senyawa identitas sinamaldehyd

Kandungan kimia : Pola kromatogram (KLT)
 dalam ekstrak Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
 Fase gerak : toluen:etil asetatl (9:1)
 Deteksi : Sinar UV₂₅₄ nm
 Zat pembanding : Sinamaldehyd
 Konsentrat ekstrak 1%, volume penotolan 10 µl, jarak rambat 8 cm.
 Kadar golongan kandungan kimia :
 Penetapan minyak atsiri, kadar tidak kurang dari 2,5%
 Kadar senyawa identitas :
 Sinamaldehyd total tidak kurang dari 0,5%

Kegunaan berdasar : Sinamaldehyd memberikan efek spasmolitik.
 penelitian Penurunan motilitas usus pada tikus dan anjing serta dapat menekan efek tukak lambung yang diinduksi oleh serotonin. Secara tradisional untuk penderita gangguan nafsu makan, diare, keputihan, nyeri sendi, sakit gigi.



**Gambar 8.11. Kayu Manis (*Cinnamomum burmannii*)
 (Sumber gambar: Google)**

- 4) Keladi tikus (*Typhonium flagelliformis*)
 Nama tumbuhan : *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Bl.
 Famili : Araceae
 Nama Indonesia : Keladi tikus
 Pemerian simplisia : Organoleptik:
 Warna : Hijau kecoklatan
 Bau : Aroma tidak berbau
 Rasa : Agak pahit
 Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 70%
 Randeman tidak kurang dari 16,8%

- Kandungan kimia : Senyawa fenol koniferin, senyawa steroid β -sitosterol, β -daukosterol, senyawa alkaloid, glikosida, asam-asam lemak metil ester heksadekanoat, asam oktadekanoat, asam 9-oktadekanoat dan asam 9,12-oktadekadienoat, senyawa alifatis.
- Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental
Warna : Coklat kehitaman
Bau : Khas
Rasa : Sepat agak pahit
- Parameter ekstrak : Non spesifik
Kadar air : tidak lebih dari 16,3 %
Kadar abu total : tidak lebih dari 13,2 %
Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 1,5 %
Spesifik
Senyawa identitas koniferin
- Kandungan kimia dalam ekstrak : Pola kromatogram (KLT)
Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
Fase gerak : toluen:etil asetatl (93:7)
Deteksi : Pereaksi asam sulfat 5% dalam metanol
Zat pembanding : Koniferil alkohol
Konsentrat ekstrak 5%, volume penotolan 5 μ l, jarak rambat 8 cm.
Kadar golongan kandungan kimia :
Penetapan kadar koniferil (dihitung sebagai koniferil alkohol) tidak kurang dari 0,3
Kadar senyawa identitas : koniferin
Kadar koniferin tidak kurang dari 0,3%
- Kegunaan berdasar penelitian : Penelitian: belum ada
Secara tradisional digunakan untuk penderita kanker, batuk, demam, radang tenggorok dan membantu memelihara kesehatan kulit.



**Gambar 8.12. Keladi Tikus (*Thyponii flagelliformis*)
(Sumber gambar: Google)**

5) Kemuning (*Murrayae paniculata*)

Nama tumbuhan : *Murraya paniculata* (L.) Jack
 Famili : Rutaceae
 Nama Indonesia : Kemuning
 Pemerian simplisia : Organoleptik:
 Warna : Hijau kecoklatan
 Bau : Khas
 Rasa : Rasa pedas, pahit, kelat
 Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 70%
 Randeman tidak kurang dari 11,1%
 Kandungan kimia : Murangatin, kumarin, skopoletin, flavonoid, saponin, tanin,
 alkaloid.
 Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental
 Warna : Coklat tua
 Bau : Bau khas
 Rasa : Pahit

 Parameter ekstrak : Non spesifik
 Kadar air : tidak lebih dari 19,0 %
 Kadar abu total : tidak lebih dari 3,1 %
 Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 0,9 %
 Spesifik
 Senyawa identitas murangatin
 Kandungan kimia : Pola kromatogram (KLT)
 dalam ekstrak : Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
 Fase gerak : toluen:etil asetat (70:30)
 Deteksi : UV₃₆₆ nm
 Zat pembanding : Murangatin
 Konsentrat ekstrak 10%, volume penotolan 5 µl, jarak rambat
 8 cm.
 Kadar murangatin tidak kurang dari 1,10%
 Kadar kumarin total tidak kurang dari 1,90% dihitung sebagai
 skopoletin.
 Kegunaan berdasar : Ekstrak etanol 70% daun kemuning (*Murraya paniculata* L.
 penelitian Jack) memiliki aktivitas sebagai hepatoprotektor dengan
 pengukuran kadar SGPT dan SGOT dengan dosis 200
 mg/KgBB yang diujikan pada tikus yang dipapar asap rokok
 (p<0,05) (Pahriyani et al., 2019). Pemberian fraksi ekstrak
 etanol daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) dengan
 dosis 100 mg/Kg BB berpengaruh terhadap penurunan kadar
 glukosa darah dan indeks aterogenik pada tikus putih jantan
 (p<0,05) (Kardela et al., 2019).



**Gambar 8.13. Kemuning (*Murrayae paniculata*)
(Sumber gambar: Google)**

- 6) Kunci pepet (*Kaemferiae angustifolia*)
- Nama tumbuhan : *Kaemferiae angustifolia* Roscoe
 Famili : Zingiberaceae
 Nama Indonesia : Kunci pepet
 Pemerian simplisia : Organoleptik:
 Warna : Kuning kecoklatan
 Bau : Bau khas
 Rasa : Mula-mula tidak berasa lama-lama agak pedas
- Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 70%
 Randeman tidak kurang dari 9,9%
- Kandungan kimia : Minyak atsiri, flavonoid, terpenoid.
 Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental
 Warna : Hijau kehitaman
 Bau : Tidak berbau
 Rasa : Rasa pahit
- Parameter ekstrak : Non spesifik
 Kadar air : tidak lebih dari 17,5 %
 Kadar abu total : tidak lebih dari 14,4 %
 Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 1,0 %
 Spesifik
 Senyawa identitas pinostrobin
- Kandungan kimia : Pola kromatogram (KLT)
 dalam ekstrak : Fase diam : Silika gel GF₂₅₄
 Fase gerak : toluen:aseton (93:7)
 Deteksi : UV₂₅₄ nm
 Zat pembanding : Eugenol
 Konsentrat ekstrak 10%, volume penotolan 5 µl, jarak rambat 8 cm.

Kadar minyak atsiri tidak kurang dari 0,99%

Kegunaan berdasar : Ekstrak etanol kunci pepet menunjukkan hambatan positif
penelitian terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan daya hambat 2,08 cm, *Staphylococcus aureus* daya hambat 213 cm dan jamur *Candida albicans* daya hambat 1,82 cm (Lim & Lim, 2016).



Gambar 8.14. Kunci Pepet (*Kaemferiae angustifolia*)
(Sumber gambar: Google)

- 7) Kayu rapat (*Parameriae laevigatae*)
- Nama tumbuhan : *Parameria laevigatae* (Juss.) Moldenke
- Famili : Apocynaceae
- Nama Indonesia : Kayu rapat
- Pemerian simplisia : Organoleptik:
Warna : Coklat
Bau : Bau khas
Rasa : Kelat dan agak pahit
- Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 70%
Randeman tidak kurang dari 11,2%
- Kandungan kimia : Flavonoid
- Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental
Warna : Coklat tua
Bau : Khas
Rasa : Rasa kelat
- Parameter ekstrak : Non spesifik
Kadar air : tidak lebih dari 13,2 %
Kadar abu total : tidak lebih dari 0,9 %
Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 0,4 %
Spesifik
Senyawa identitas asam protokatekuat
- Kandungan kimia : Pola kromatogram (KLT)
dalam ekstrak Fase diam : Selulosa mikrokrystal
Fase gerak : Asam asetat glasial:air (15:85)

Deteksi : Sitoborat *LP*, panaskan lempeng pada suhu 100 derajat C selama 5 menit-sinar UV₃₆₆ nm

Zat pembanding : Rutin

Konsentrat ekstrak 10%, volume penotolan 40 µl, jarak rambat 8 cm.

Kadar flavonoid total tidak kurang dari 2,10% dihitung sebagai rutin.

Kegunaan berdasar : Kulit kayu rapat (*Parameria laevigata* (Juss.) Moldenke) penelitian dengan sediaan infusa dosis 3,9 g/kgBB mencit memiliki efek analgesik dengan potensi yang setara dengan Na-diklofenak (Christiana et al., 2012).



Gambar 8.15. Kayu Rapat (*Parameria laevigata*)
(Sumber gambar: Google)

8) Pare (*Momordica charantia*)

Nama tumbuhan : *Momordica charantia* L.

Famili : Cucurbitaceae

Nama Indonesia : Pare

Pemerian simplisia : Organoleptik:

Warna : Coklat, bagian luar berwarna lebih tua dari bagian dalam

Bau : Bau khas

Rasa : Pahit

Teknologi ekstraksi : Maserasi dengan etanol 70%

Randeman tidak kurang dari 17%

Kandungan kimia : β -sitosterol

Pemerian ekstrak : Bentuk : Kental

Warna : Coklat tua

Bau : Bau khas

Rasa : Pahit

Parameter ekstrak : Non spesifik

	Kadar air	: tidak lebih dari 9,2 %
	Kadar abu total	: tidak lebih dari 9,0 %
	Kadar abu tidak larut asam	: tidak lebih dari 0,7 %
	Spesifik	
	Senyawa identitas momordisin	
Kandungan kimia	: Pola kromatogram (KLT)	
dalam ekstrak	Fase diam	: Silika gel GF ₂₅₄
	Fase gerak	: n-heksan:etil asetatl (8:2)
	Deteksi	: <i>Vanilin-asam sulfat LP</i> , panaskan lempeng pada suhu 110 derajat C selama 5-10 menit.
	Zat pembanding	: β -sitosterol
	Konsentrat ekstrak	4%, volume penotolan 5 μ l, jarak rambat 8 cm.
	Kadar β -sitosterol	tidak kurang dari 0,40%
Kegunaan berdasar penelitian	: Fraksi ekstrak etanol buah pare dengan dosis 100 mg/kg BB mampu menurunkan kadar glukosa darah tikus setelah empat hari pemberian (Suartha et al., 2016).	



**Gambar 8.16. Pare (*Momordicae charantiae*)
(Sumber gambar: Google)**

Latihan 8

1. Sebutkan senyawa apa saja yang terkandung dalam brotowali !
2. Sebutkan pemerian ekstrak dari buah merah !
3. Sebutkan parameter ekstrak non spesifik dari mahkota dewa !
4. Sebutkan beberapa kegunaan belimbing wuluh berdasarkan penelitian !
5. Sebutkan parameter ekstrak non spesifik dan spesifik dari kayu manis !

Jawaban 8

1. Jawaban :
Senyawa alkaloid palmitin, berberin, jatrorrhizin, tembetarid, tinokrisposid, tinotuberid, borapetol, pikroretin, siringin, pikroretosid.
2. Jawaban :
Bentuk : Cairan kental
Warna : Merah
Bau : Khas
Rasa : Minyak
3. Jawaban :
Kadar air : tidak lebih dari 11,6 %
Kadar abu total : tidak lebih dari 6,8 %
Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 2,9 %
4. Jawaban :
Ekstrak etanol pada dosis 125 mg/kg BB selama 2 minggu memiliki efek hipoglikemik, hipotrigliserida, antilipid peroksidatif. Secara tradisional untuk nyeri sendi, kencing manis, demam, darah tinggi dan salesma.
5. Jawaban :
Parameter ekstrak kayu mmanis
Non spesifik:
Kadar air : tidak lebih dari 16,5 %
Kadar abu total : tidak lebih dari 0,3 %
Kadar abu tidak larut asam : tidak lebih dari 0,1 %
Spesifik:
Senyawa identitas sinamaldehyd

Rangkuman 8

Dalam hal pemanfaatan tanaman obat awalnya dapat berupa simplisia atau ekstrak. Simplisia tumbuhan obat merupakan bahan baku proses pembuatan ekstrak, baik sebagai bahan baku atau obat. Sedangkan ekstrak tumbuhan obat sebagai bahan dan produk, dibuat dari bahan baku tumbuhan obat.

Dalam bentuk bahan dan produk kefarmasian baru, yaitu ekstrak, maka selain persyaratan monografi bahan baku (simplisia), juga diperlukan persyaratan parameter standar umum dan spesifik. Parameter spesifik ekstrak yang sebagian besar berupa analisis kimia yang memberikan informasi komposisi senyawa kandungan (jenis dan kadar) juga harus memenuhi monografi ekstrak tumbuhan obat.

Monografi ekstrak tumbuhan obat I meliputi Bawang putih (*Allium sativum* L), Brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex F & Terms), Buah merah (*Pandanus conoideus* (Lamk.)), Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Sheff)], Temu mangga (*Curcuma mangga* (Val.)), Saga (*Abrus precatorius*), Sembung (*Blumeae balsamiferae*), dan Teki (*Cyperus rotundus*). Sedangkan monografi ekstrak tumbuhan obat II meliputi Belimbing wuluh (*Averrhoa blimbii*), Herba ceplukan (*Physalis minima* herbae), Kayu manis (*Cinnamomum burmannii*), Keladi tikus (*Thyponii flagelliformis*), Kemuning (*Murrayae paniculata*), Kunci pepet (*Kaemferiae angustifolia*), Kayu rapet (*Parameriae laevigatae*), dan Pare (*Momordiacae charantiae*).

Tes Formatif 8

1. Tumbuhan famili Liliaceae contohnya *Allium sativum* L. atau bawang putih mengandung senyawa alilin dengan struktur kimia terdapat gugus sulfida. Senyawa dialil sulfida dan trialil sulfida mempunyai aktifitas sebagai
 - A. Antibakteri
 - B. Antidiabetes
 - C. Andiare
 - D. Analgesik
 - E. Antiplatelet
2. Kandungan Sinamildehida yang ada didalamnya bisa berfungsi dalam pengobatan gangguan pencernaan. Tanaman yang dimaksud adalah
 - A. Pare
 - B. Kayu manis
 - C. Kemuning
 - D. Keladi tikus
 - E. Kayu rapet
3. Dilihat dari parameter ekstrak secara spesifik tanaman ini mempunyai senyawa identitas fisalin A dan B dimana berdasarkan penelitian dapat menyebabkan aborsi pada tikus. Tanaman yang dimaksud adalah
 - A. Kunci pepet
 - B. Buah merah
 - C. Brotowali

- D. Herba ceplukan
 - E. Sembung
4. Temu mangga memiliki aktifitas antioksidan dan sitoktosisitas terhadap beberapa sel kanker. Senyawa identitas dari temu mangga adalah
- A. 7,4'-dimetoksikuersetin
 - B. Sinamaldehyd
 - C. Flavonoid
 - D. β -karoten
 - E. Kurakumangosida
5. Teki diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 95%. Rendemen dari ekstrak teki tidak boleh lebih dari
- A. 12,5%
 - B. 11,3%
 - C. 10,3%
 - D. 15,6%
 - E. 16,8%

Jawaban Tes formatif 8

- 1. A
- 2. B
- 3. D
- 4. E
- 5. C

MATERI 9: APLIKASI INSTRUMENTASI DALAM ANALISIS SENYAWA PENANDA OBA

Metode Pembelajaran	Estimasi Waktu	CPMK
<ul style="list-style-type: none"> • Kuliah Interaktif • Diskusi • <i>Question Based Learning</i> 	150 menit	CPMK-4: Menunjukkan penguasaan konsep teoritis tentang standarisasi dan penentuan marker Obat Bahan Alam; (CPL-4)

9.1. Pendahuluan

Pengukuran kualitas bahan baku tanaman merupakan syarat penting yang harus dilakukan oleh industri herbal. Tanaman yang akan digunakan sebagai bahan baku sering memiliki komposisi kimia yang tidak konsisten. Kontrol kualitas obat herbal, dapat dilakukan dengan mengidentifikasi senyawa spesifik yang biasa disebut senyawa penanda (*marker*) yang dapat digunakan untuk membantu pembuatan produk bahan alam yang konsisten. Berbagai instrumen analisis bisa dimanfaatkan untuk mendeteksi senyawa tersebut. Jika senyawa penanda dapat terdeteksi maka kadarnya kemudian dapat ditentukan (Aziz et al., 2011).

9.1.1. Senyawa Penanda

Senyawa penanda merupakan senyawa kimia dalam simplisia maupun ekstrak yang dapat memiliki khasiat terapeutik ataupun tidak (Kementerian Kesehatan RI, 2008). Identifikasi dan kuantifikasi senyawa penanda itu sendiri berkontribusi pada pengawasan mutu bahan obat alam baik bentuk simplisia, ekstrak, maupun sediaan obat bahan alam agar dapat menjamin dan memenuhi persyaratan mutunya (World Health Organization, 2017).

Istilah senyawa ini pada Farmakope Herbal Indonesia Edisi II tahun 2017 terbagi menjadi senyawa identitas dan senyawa pembanding. Senyawa identitas adalah senyawa yang terkandung dalam simplisia yang dapat digunakan untuk identifikasi. Jika senyawa ini tidak tersedia maka proses identifikasi simplisia dan ekstrak tanaman beserta sediaan dapat dilakukan menggunakan senyawa pembanding. Senyawa pembanding adalah senyawa sebagai pembanding yang dalam hal analisisnya baik pengujian dan penetapan kadarnya telah disetujui (Kementerian Kesehatan RI, 2017). **Tabel 9.1.** menunjukkan daftar beberapa senyawa identitas dan pembanding yang tertera pada Farmakope Herbal Indonesia Edisi I dan Edisi II.

Tabel 9.1. Daftar Beberapa Senyawa Identitas dan Pembanding

Senyawa Identitas			
(+) Katekin	1,8-dihidroksi antrakuinon	2,4 dihidroksi-6- metoksi-5-formil-3- metilkalkon	20-hidroksiekdison
Akasetin	Baikalein	Geraniol	Kurzerenon
Alilsistein	Brazilein	Hesperidin	Linalool
Aloin A	Berberin	Isodeoksielefantopin	Lunakrin
Andrografolid	Brusin	Isokuersitrin	Luteolin
Anonasin	β -sitosterol	Kaempferol	Luteolin-7-O- glukuronat

Apigenin	Burakol	Kaempferol-3-O-glikosil-7-O-ramnosida	α -Mangostin
Asam anakardat	β -vetivon	Kapsaisin	Metil eugenol
Asam galat	Etil <i>p</i> -metoksisinamat	Kubebin	Metil Salisilat
Asam korosalat	Eugenol	Kuersetin	Mirisetin
Asam <i>p</i> -kumarat	Falerin	Kuersetin 3-kalium bisulfat	Miristisin
Asam protekatekat	Felandren	Kuersitrin	Murangatin
Asiatikosida	Filantin	Kurminaldehid	N.N ² -bis(γ -glutamil)-3,3 ² -(1,2-propileneditio) dialanin
Asperulosida	Fisalin A	Kurkumangosida	Nobiletin
Azaleatin	Galangin	Kurkumin	Pinostrobin
Piperin	Plumbagin	Punaklin	Rokaglamida
Rutin	Sesamin	Shogaol	Sianidin-3-O-glikosida
Sinamaldehyd	Sinensetin	Sineol	Sitral
Skopoletin	Stigmasterol	Swietenolida	Terpinen-4-ol
Tetrahidroalstonin	Tilirodisa	Tinokrisposida	Trans-anetol
Verbaskosid	Vernodalin	Viteksikarpin	Viteksin
Xantorizol	Zedoraon	Zerumbon	Alisin
Senyawa Pembanding			
Alilsistein	Luteolin	1,8-Dihidroksi antrakuinon	Sianidin-3-O-glikosida
(+) Katekin	Pinostrobin	Apigenin	Plumbagin
Aloin A	Piperin	Asam galat	Rutin
Andrografolid	Sinamaldehyda	Asam <i>p</i> -kumarat	Sineol
Asiatikosida	Sinensetin	Berberin	Sitral
Etil <i>p</i> -metoksisinamat	Skopoletin	Brazilein	Terpinen-4-ol
Eugenol	Stigmasterol	Brusin	Kubebin
Falerin	Tetrahidroalstonin	β -sitosterol	Kuersetin
Isodeoksielefantopon	Tilirosida	Burakol	Xantorizol
Isokuersitrin	<i>trans</i> -anetol	Demetoksiskurkumin	Kaempferol-3-O-glikosil-7-O-ramnosida
Katekin	Viteksikarpin	Hesperidin	Mirisetin
Linalool	α -Mangostin	Kapsaisin	Murangatin
Lunakrin	Metil eugenol	Kurkumin	

Sumber: (Kementerian Kesehatan RI, 2008, 2017)

- i. Persyaratan umum untuk senyawa penanda

Senyawa penanda perlu memenuhi persyaratan umum untuk dapat dianalisis, yaitu (World Health Organization, 2017):

1. Identitas, kekhususan dan selektivitas untuk metode analisis yang ditentukan
2. Harus ada dalam jumlah yang dapat dilacak untuk identifikasi atau jumlah yang cukup untuk pengujian
3. Harus mudah diperoleh
4. Stabil pada kondisi penyimpanan yang ditentukan
5. Harus mudah dideteksi dan diukur secara analitik

ii. Pertimbangan umum metode analisis senyawa penanda

Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam menentukan metode pengujian yang akan digunakan untuk analisis senyawa penanda, antara lain (World Health Organization, 2017):

1. Reaksi kimia
2. Prosedur pemisahan (kromatografi), termasuk sidik jari
3. Metode spektrometri
4. Kombinasi kromatografi dan spektrometri

Kriteria instrument untuk menetapkan kadar senyawa penanda, yaitu (Aziz et al., 2011) :

1. Metode analisis harus terjangkau stakeholder (produsen, ekportir, importir, agen, supplier).
2. Metode analisis harus mudah digunakan.
3. Metode analisis harus spesifik dan selektif terhadap senyawa penanda yang dipilih untuk identifikasi dan kuantifikasi dalam obat bahan alam.
4. Metode analisis harus divalidasi aspek spesifisitas dan sensitivitasnya. Validasi dapat diulang terutama untuk bahan uji berupa sediaan herbal yang didalamnya juga mengandung bahan tambahan yang mungkin dapat mempengaruhi prosedur analitik (World Health Organization, 2017).
5. Metode minimal yang dapat digunakan adalah Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi (KLT-KT) atau KLT-densitometri.

9.1.2. Metode dalam analisis senyawa penanda OBA

A. Metode Kromatografi

Kromatografi merupakan metode pemisahan yang sistemnya terdiri atas fase diam (*stationary phase*) dan fase gerak (*mobile phase*). Metode ini telah berkembang luas untuk pemisahan senyawa bahan alam baik identifikasi (kualitatif) maupun penentuan kadar (kuantitatif). Pemisahan dengan kromatografi ada yang sistemnya normal (fase diam polar, fase geraknya nonpolar) dan ada yang sistem terbaik (fase diamnya nonpolar dan fase geraknya polar) (Hanani, 2015).

1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT merupakan salah satu jenis metode kromatografi planar (fase diamnya berupa lapisan tipis yang seragam pada permukaan bidang datar), selain Kromatografi kertas (KKt). Teknik ini cukup sederhana, mudah digunakan, relatif murah, cepat, penggunaan fase diam dan fase gerak yang ekonomis (terutama jika

telah diketahui sistemnya yang tepat) jika dibandingkan dengan teknik kromatografi kolom. Fase diam yang umum digunakan pada KLT adalah silika gel F245 (bersifat polar), selain itu ada pula silika yang dimodifikasi, selulosa, alumina, dan sebagainya. Fase geraknya dapat berupa pelarut dengan kemurnian yang tinggi dalam komponen tunggal maupun campuran (dua atau lebih pelarut) yang sesuai (Gandjar & Rohman, 2008). Beberapa hal yang penting dalam metode analisis dengan KLT (Aziz et al., 2011) :

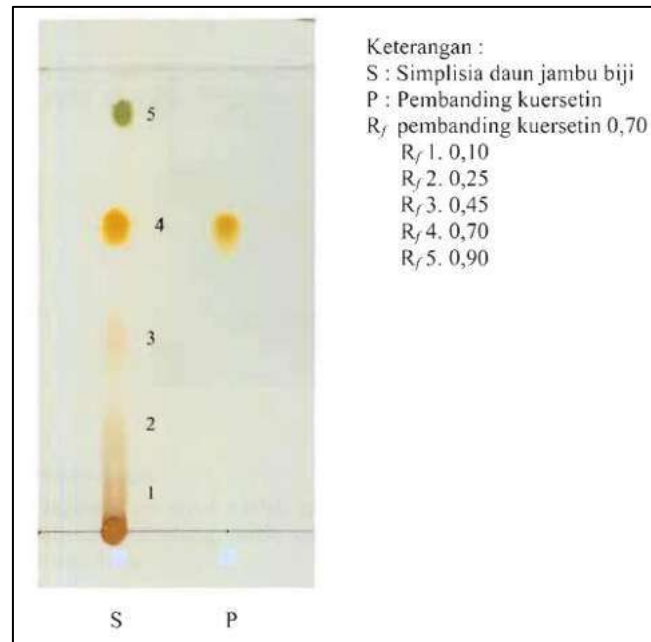
- a. Sistem kromatografi pada KLT umumnya sistem normal
- b. Fase diam umumnya silika gel F254 dapat diaktifkan dalam oven pada suhu 100-105 °C selama 30-60 menit.
- c. Fase gerak yang dipilih penting untuk dijenuhkan di dalam *chamber* sebelum digunakan untuk pengembangan (*elusi*)
- d. Sistem deteksi bercak dapat berupa cara fisika (dengan sinar UV 254 maupun 366 nm) dan cara kimia (dengan penyemprotan menggunakan reagen/pereaksi semprot yang spesifik, seperti deteksi alkaloid dengan pereaksi Draagendorff, deteksi fenolik dengan peraksi FeCl₃, dan sebagainya).
- e. Metode KLT cocok untuk mendeteksi senyawa dengan ikatan rangkap terkonjugasi (fenolik, fenil propanoid, sebagian alkaloid, dan lain sebagainya karena dapat dideteksi di UV 254 dan 366 nm. Senyawa dengan gugus kromofor akan meredam/padam/berwarna gelap pada UV 254 nm (kecuali kumarin, justru berpendar). Senyawa akan berpendar di awabah UV 366 nm dengan berbagai warna dengan latar belakang yang gelap.
- f. Jika senyawa tidak muncul di kedua jenis sinar, bukan berarti tidak ada (reaksi negatif palsu), maka perlu dilakukan derivatisasi (deteksi dengan menyemprotkan pereaksi vanilin atau anisaldehyda dgn asam sulfat dan pemanasan 106 °C sebentar). Biasanya yg tidak tampak pada kedua jenis sinar adalah senyawa turunan terpen (minyak atsiri, saponin, steroid) atau senyawa dengan ikatan rangkap yang sedikit.

Pemisahan KLT umumnya dihentikan sebelum semua fase gerak melalui seluruh permukaan fase diamnya. Bercak yang muncul kemudian dihitung nilai *retardation factor* (Rf) (lihat persamaan 9.1). Keberadaan senyawa penanda atau pun pembanding di dalam sampel bahan alam ditandai dengan nilai Rf yang sejajar dengan senyawa yang terdeteksi pada sampel tersebut.

$$R_f = \frac{\text{Jarak rambat senyawa}}{\text{Jarak rambat fase geraknya}}$$

Aplikasi KLT pada analisis senyawa penanda dari sampel bahan alam terbatas identifikasi kualitatif (menentukan keberadaan senyawa penanda). Jika akan digunakan untuk analisis kuantitatif maka dapat dilakukan dengan cara: (1) bercak pada plat diukur luasnya dengan bantuan densitometer (dibahas pada poin selanjutnya), (2) bercak dikerok dan selanjutnya dianalisis menggunakan

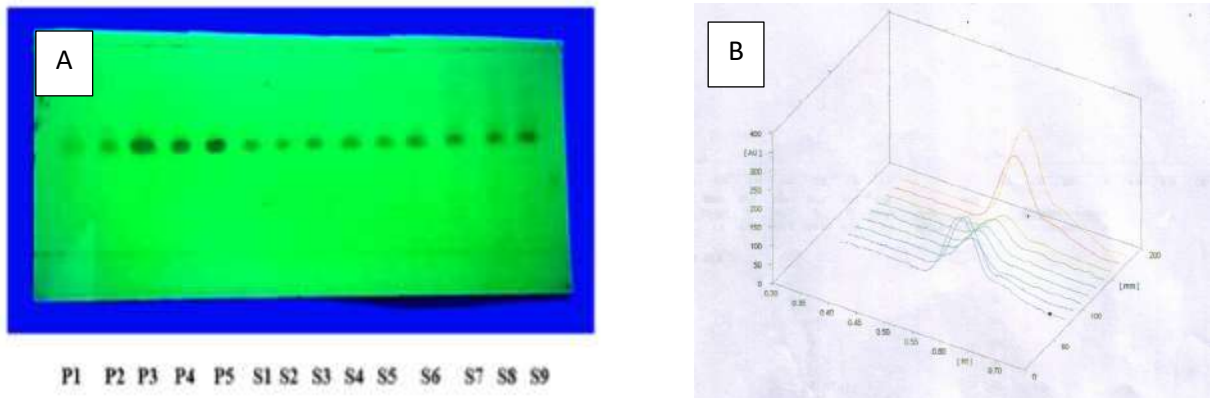
spektrofotometer. **Gambar 9.1.** memberikan contoh aplikasi KLT dalam menentukan pola kromatografi pada simplisia daun jambu biji (Depkes RI, 2008). Tampak bahwa simplisia daun jambu biji memiliki bercak (bercak 4) yang sejajar dengan bercak kuersetin sebagai pembanding pada nilai R_f 0,70 (Kementerian Kesehatan RI, 2008).



Gambar 9.1. Kromatogram Daun Jambu Biji yang Dibandingkan dengan Kuersetin (Kementerian Kesehatan RI, 2008)

2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-densitometri

Metode KLT ini merupakan pengembangan dari metode KLT dengan menggabungkannya dengan alat densitometer. Dengan demikian, metode ini dapat digunakan untuk tujuan analisis baik kualitatif maupun kuantitatif yang dilakukan pada plat yang sama (baik sampel dan pembanding ditotol pada plat yang sama). **Gambar 9.2.** menunjukkan contoh hasil kromatogram KLT-densitometri pada penentuan kadar piperin sebagai senyawa penanda pada ekstrak buah lada (Hikmawanti et al., 2016).



Gambar 9.2. Kromatogram KLT. Fraksi Alkaloid dari Lada Putih dan Piperin(A); Kromatogram 2 Dimensi Fraksi Alkaloid dan Piperin (B) (Hikmawanti et al., 2016)

Keterangan:

P1-P5 = Standar piperin 200-1000 µg/mL

S1-S3 = Pengulangan 1-3 fraksi alkaloid dari ekstrak etanol 60% buah lada putih

S4-S6 = Pengulangan 1-3 fraksi alkaloid dari ekstrak etanol 70% buah lada putih

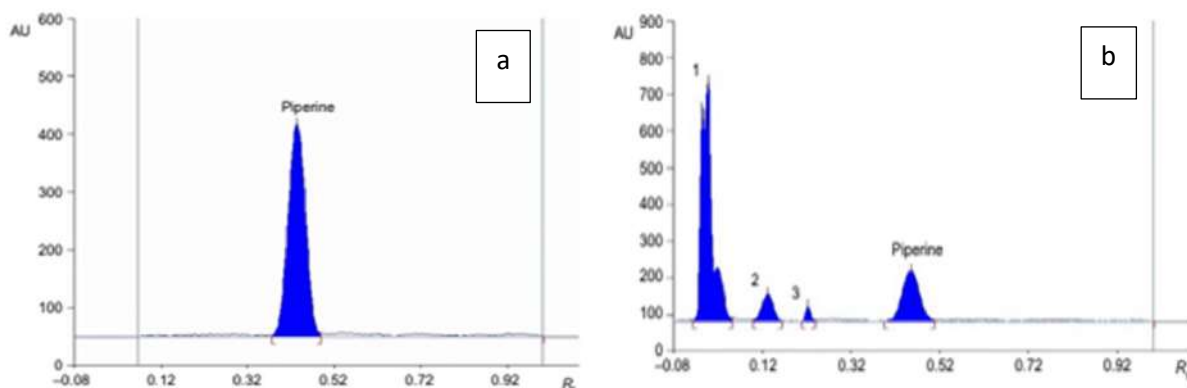
3. Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi (KLT-KT)

KLT-KT dikenal juga dengan istilah *High Performance Thin Layer Chromatography* (HPTLC). KLT-KT digunakan untuk pemisahan senyawa yang hasilnya lebih baik dibandingkan dengan KLT. Fase diam pada KLT-KT memiliki ukuran partikel yang lebih halus dengan pori yang seragam, sedangkan lapisannya lebih tipis (hanya 0,1 mm) dibanding dengan KLT. Volume penotolan sampel dan penggunaan volume fase gerak lebih hemat. Dengan demikian, pemisahan menjadi lebih efisien. Fase diam yang digunakan pada KLT-KT adalah silika gel. Penyiapan fase gerak tidak ada perbedaan dengan KLT biasa. Keunggulan lain dari KLT-KT adalah dengan jarak elusi yang sempit (hanya 3-6 cm) sudah dapat menghasilkan pemisahan dengan resolusi yang baik (Gandjar & Rohman, 2008). **Tabel 9.2.** menunjukkan perbedaan mendasar antara KLT biasa dan KLT-KT.

Penentuan kuantitas senyawa penanda menggunakan KLT-densitometri diukur berdasarkan kemiripan nilai R_f bercak pada sampel (baik simplisia, ekstrak maupun fraksi) dengan nilai R_f standar. Bercak pada densitometri dalam bentuk puncak tunggal dapat diukur luas areanya. Luas area ini yang kemudian menggambarkan kadar dari senyawa penanda/pembanding yang terdapat dalam sampel. **Gambar 9.3.** menunjukkan penentuan kadar kuantitatif piperin dalam ekstrak metanol buah cabe jawa.

Tabel 9.2. Perbedaan Metode KLT dengan KLT-KT (Mukherjee, 2019)

Parameter	KLT	KLT-KT
Teknik	Manual	Instrumental
Efisiensi	Rendah	Tinggi
Lapisan fase diam	<i>Precoated</i> ataupun dibuat di lab	<i>Precoated</i>
Ukuran partikel	10-12 μm	5-6 μm
Ketebalan lapisan	250 μm	100 μm
Jenis fase diam	Silika gel, alumina, Kiesulguhr	Silika gel (fase normal), C8 dan C18 (fase terbalik)
Penotolan	Manual (dengan pipet kapiler)	Otomatis (<i>syringe</i>)
Volume penotolan	1-5 μl	0,1-0,2 μl
Bentuk penotolan	Bulat (2-4 mm)	Persegi Panjang (6 mm x 1 mm)
Panjang plat untuk pemisahan	10-15 cm	Cukup 3-5 cm
Waktu pemisahan	20-200 menit, lama	3-20 menit, cepat
Jumlah sampel tiap plat	≤ 10	≤ 36
Batas deteksi (absorpsi)	1-5 pg	100-500 pg
Batas deteksi (fluoresensi)	50-100 pg	5-10 pg
Validasi, analisis kuantitatif	tidak	ya
Panjang gelombang	254 atau 365 nm, visible/tampak	190-800 nm, monokromatik
Teknik <i>scanning</i>	Tidak memungkinkan	Menggunakan UV/Visible/flouresensi



Keterangan:

Fase diam: plat KLT silika gel 60F254 (jarak rambat 8 cm)

Penotolan: volume 10 μ l, besar titik penotolan 2 mm

Fase gerak: toluene:kloroform:etil asetat (4:3:3), 20 ml

Waktu penjujukan fase gerak: 30 menit

Deteksi: UV 254 nm

Gambar 9.1. Kromatogram Standar Piperin (1mg/ml dalam etanol) (a); Ekstrak Cabe Jawa dengan KLT-KT (b) (Mukherjee, 2019)

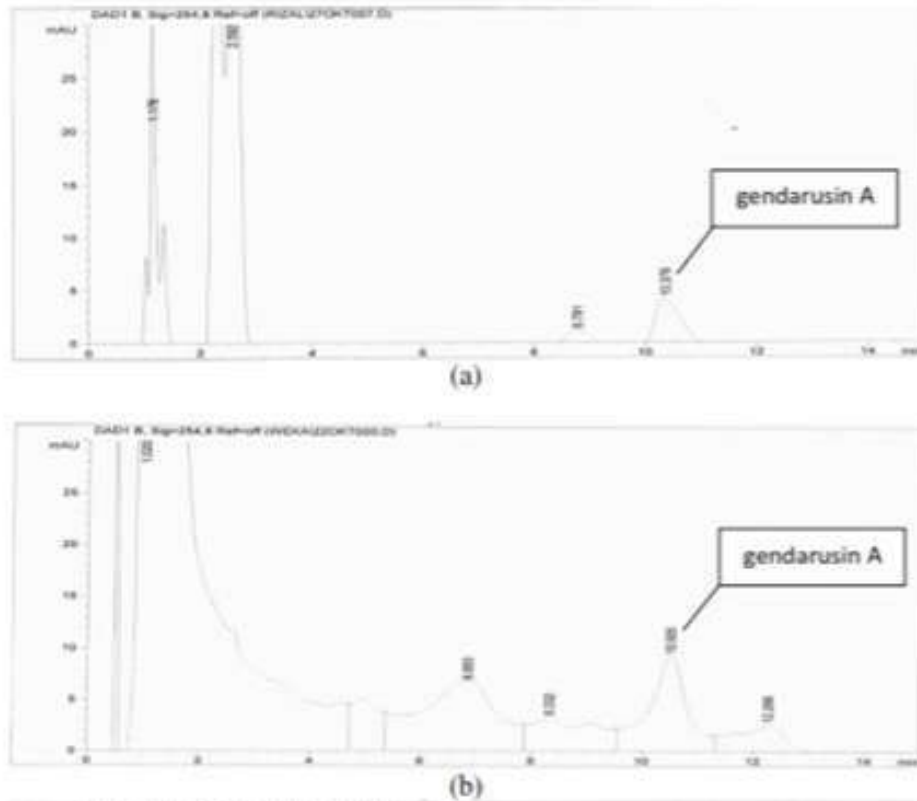
4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

KCKT dikenal juga dengan istilah *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Metode ini merupakan metode pemisahan menggunakan kolom tertutup yang digunakan untuk memisahkan komponen kimia yang umumnya tidak mudah menguap (tidak volatil). Metode ini seringkali digunakan jika pemisahan senyawa dengan KLT tidak memberikan hasil yang memuaskan. Penentuan kuantitatif memerlukan senyawa standar yang murni. Adapun jika melakukan identifikasi dengan KCKT maka perlu dihubungkan dengan spectrometer massa (SM). Keterbatasan KCKT adalah jika sampelnya mengandung komponen kimia yang teramat kompleks maka hasil pemisahan yang baik sulit diperoleh (resolusi kurang baik) (Gandjar & Rohman, 2008).

Umumnya, fase diam pada KCKT berupa silika gel yang telah dimodifikasi seperti oktadesil silika (ODS atau C18) yang bersifat nonpolar. Fase gerak pada KCKT biasanya terdiri atas campuran pelarut yang saling bercampur. KCKT mengandalkan pompa untuk membantu fase gerak melalui kolom yang berisi fase diam selama proses pemisahan komponen senyawa. Sistem deteksi pada KCKT umumnya menggunakan detektor UV-Vis, *photodiode-array* (PDA), dan sebagainya (Gandjar & Rohman, 2008).

Pemisahan komponen senyawa pada sampel bahan alam menghasilkan puncak-puncak pada waktu retensi tertentu. Puncak yang berbeda menunjukkan senyawa yang berbeda pula. Penentuan kuantitatif dari senyawa diukur berdasarkan luas area puncak tersebut. Waktu retensi (*retention time*) yang mirip pada puncak yang terdapat pada sampel dan puncak standar menunjukkan keberadaan senyawa penanda yang

diidentifikasi. **Gambar 9.3.** merupakan kromatogram KCKT hasil pemisahan senyawa gendarusin A (suatu glikosida flavonoid yang terdapat dalam daun *Justicia gendarussa*. Pemisahan senyawa tersebut menggunakan sistem kromatografi terbaik yaitu fase diam kolom silika C-18 dengan fase gerak isokratik metanol:air (30:70). Proses deteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 254 nm (Hikmawanti et al., 2020).



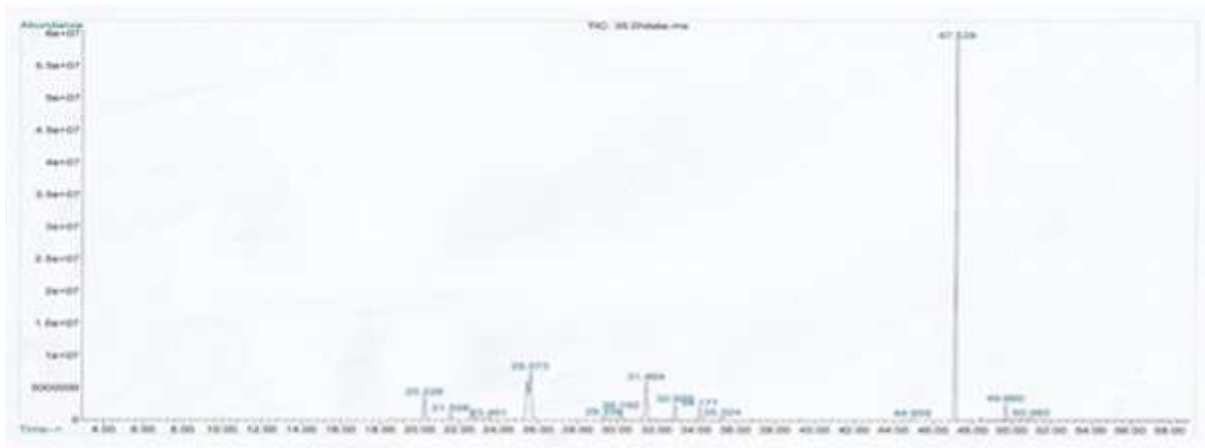
Gambar 9.4. Kromatogram KCKT. Standar Gendarusin A 12,8 ppm dalam Etanol (a); Ekstrak Etanol Daun *J.gendarussa* terfraksinasi 5000 ppm dalam Metanol (Hikmawanti et al., 2020)

5. Kromatografi Gas (KG)

Berbeda halnya dengan KCKT, KG merupakan metode pemisahan yang digunakan pada sampel dengan komponen kimia yang bersifat mudah menguap (volatil). Fase gerak yang digunakan pada KG adalah gas (helium, nitrogen, hidrogen, dan sebagainya) yang akan mengelusi komponen kimia dari ujung kolom dan menghantarkannya menuju detektor. Peningkatan suhu di dalam oven (tempat berlangsungnya pemisahan komponen senyawa) berkisar 50-350 °C akan menjamin komponen senyawa tersebut akan menguap dan cepat terelusi. Ada dua jenis KG yaitu (1) KG-cair, di mana fase diamnya berupa cairan yang diikat pada suatu pendukung dengan demikian komponen senyawa yang akan dipisahkan terlarut dalam fase diam (mekanisme partisi) dan (2) KG-padat, di mana fase diamnya berupa padatan (mekanisme adsorpsi). Deteksi pada KG seringkali kali

menggunakan detektor seperti detektor ionisasi nyala (*Flame Ionization Detector*, FID), spektrometer massa (SM), dan lain sebagainya (Gandjar & Rohman, 2008).

Aplikasi penggunaan KG pada identifikasi komponen volatil pada minyak atsiri batang *Ocimum basilicum* dapat dilihat pada **Gambar 9.5**. Pemisahan antar komponen dapat ditinjau dari tiap puncak yang memiliki waktu retensi yang berbeda. Tingginya kelimpahan (*abundance*) menunjukkan kuantitas relatif dari komponen tersebut. Semakin kompleks komponen kimia yang terkandung dalam minyak atsiri maka semakin banyak puncak yang muncul pada kromatogram KG (Hikmawanti et al., 2019).



Gambar 9.5. Kromatogram KG Minyak Atsiri Batang *O. basilicum* (Hikmawanti et al., 2019)

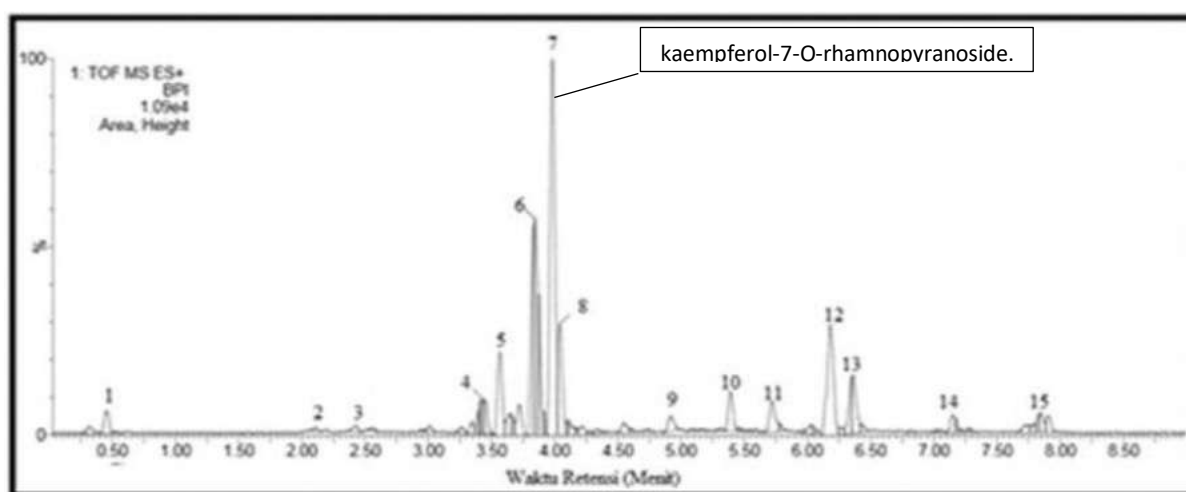
6. Kromatografi Cair

Selain KCKT, adapula kromatografi cair yang umum digunakan pada prosedur standardisasi untuk menentukan senyawa penanda pada sampel bahan alam. Umumnya, kromatografi cair ini ditandem dengan spektroskopi massa. Contoh hasil pemisahan ekstrak dengan teknik tersebut tampak pada **Gambar 9.6**. Analisis sampel ekstrak 70% daun *Ageratum conyzoides* dilakukan menggunakan kromatografi cair yang ditandem dengan spektroskopi massa pada kolom C18 dan menggunakan fase gerak gradien air:asam format 0,1% sebagai pelarut A dan asetonitril-asam format 0,1% sebagai pelarut B. Selama proses pemisahan rasio pelarut A dan B dibuat sedemikian rupa selama 9 menit. Penentuan kualitatif keberadaan senyawa penanda dapat diamati dari banyaknya puncak yang muncul. Gabungan teknik kromatografi cair dengan spektroskopi massa memungkinkan diprediksinya molekul senyawa pada tiap puncak. Berdasarkan gambar tersebut, terdapat 15 senyawa dalam ekstrak etanol 70% daun *A. conyzoides*, namun hanya 11 senyawa yang teridentifikasi, di mana senyawa kaempferol-7-O-rhamnopyranoside merupakan senyawa dominan (kadarnya relative tinggi dibanding senyawa lain yang teridentifikasi). Dengan demikian, senyawa ini dapat digunakan sebagai penanda seperti halnya kuersetin (Tambunan et al., 2014).

B. Metode Spektrofotometri

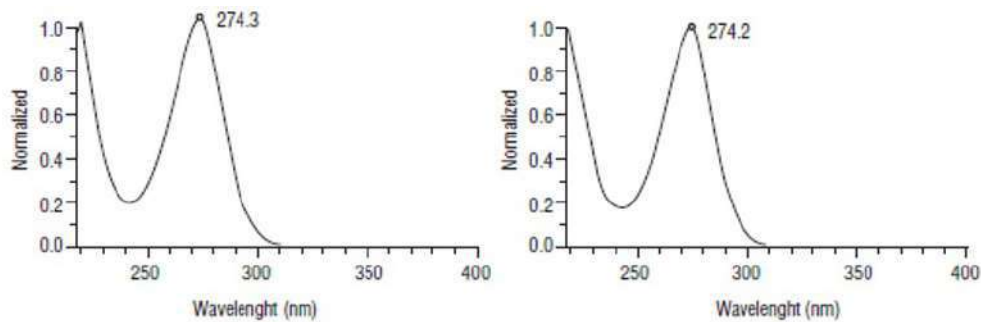
1. Spektrofotometri UV-Vis

Suatu senyawa mampu menyerap sinar UV-Vis ketika senyawa tersebut memiliki gugus fungsi (kromofor) yang menyerap sinar UV-Vis. Beberapa gugus fungsional yang termasuk kromofor adalah alkena, alkin, karbonil, karboksil, amido, azo, nitro, nitroso, dan nitrat. Pada gugus kromofor yang diikat dengan auksokrom (gugus fungsi dengan elektron bebas, seperti -OH, -O, -NH₂, dan -OCH₃) mengakibatkan terjadinya pergeseran pita absorpsi menuju ke panjang gelombang yang lebih besar (pergeseran merah = batokromik). Senyawa dengan ikatan terkonjugasi (rangkap selang-seling), terutama pada sistem benzena, menguntungkan untuk syarat dapat dianalisis dengan spektroskopi UV-Vis (Gandjar & Rohman, 2018).



Gambar 9.6. Kromatogram LC-MS Ekstrak Etanol 70% Daun *A.conyzoide* (Tambunan et al., 2014)

Dalam hal penentuan kualitatif, data yang dihasilkan pada analisis dengan spektroskopi UV-Vis adalah panjang gelombang maksimal dan serapan (absorbansi). Data spektra UV-Vis tidak dapat digunakan sendiri untuk tujuan identifikasi senyawa dan harus digabung bersama dengan data spektroskopi lain seperti spektroskopi infra merah, massa, maupun resonansi magnetik inti. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel dapat mempengaruhi spektrum serapan UV-Vis senyawa obat. Dengan demikian sebaiknya pelarut yang digunakan adalah yang mampu melarutkan analit semaksimal mungkin dan tidak memiliki serapan di panjang gelombang yang akan digunakan untuk menganalisis senyawa obat. Aplikasi penentuan kuantitatif pada metode ini memiliki beberapa keunggulan seperti penggunaannya yang luas baik untuk senyawa organik maupun anorganik, sensitivitas dan selektivitas yang cukup tinggi, akurasi yang baik dan mudah, nyaman serta relatif murah (Gandjar & Rohman, 2018). **Gambar 9.7.** menunjukkan spektra UV asam fenolik dari standar dan isolat yang dihasilkan dari buah aubergine.



Gambar 9.2. Spectra UV. Standar Asam galat (kiri); dan Isolate Asam Fenolik dari Buah Aubergine (*Solanum melongena*) (kanan) (Kowalski & Kowalska, 2005)

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam menentukan kuantitas senyawa penanda dalam sampel bahan alam, antara lain (Gandjar & Rohman, 2018):

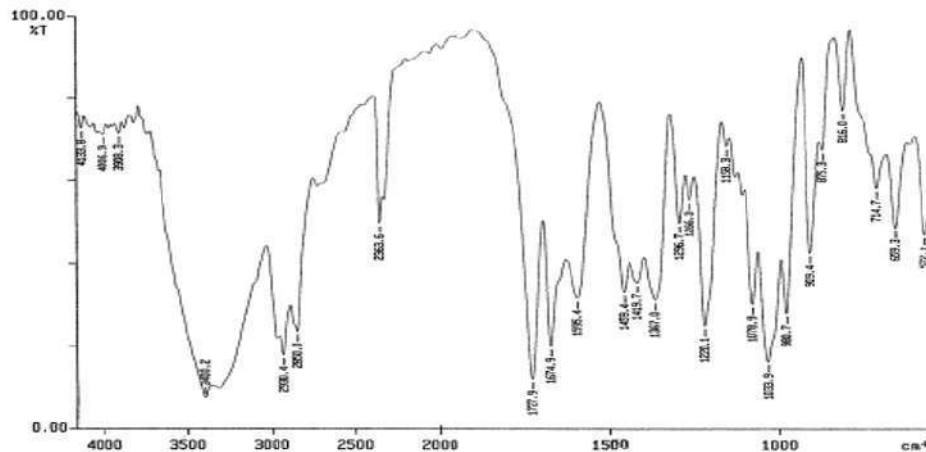
- memastikan senyawa yang dianalisis menyerap pada daerah UV-Vis. Jika tidak, maka perlu direaksikan dengan pereaksi tertentu agar menjadi senyawa kompleks yang stabil.
- menentukan waktu operasional (*operating time*) untuk mengukur hasil reaksi atau pembentukan warna sehingga diketahui waktu yang stabil untuk pengukuran.
- menentukan panjang gelombang maksimal yang menghasilkan serapan maksimal.
- membuat kurva baku dari seri konsentrasi larutan baku (senyawa penanda/pembanding sebagai standar) yang kemudian diplot terhadap masing-masing serapannya hingga diperoleh persamaan garis lurus yang menandakan terpenuhinya hukum Lambert-beer.
- melakukan pembacaan serapan pada sampel.

2. Spektrometri inframerah (IR)

Hampir semua senyawa dengan ikatan kovalen, termasuk senyawa bahan alam, dapat menyerap berbagai frekuensi radiasi elektromagnetik IR. Pada analisis kimia, daerah IR berfokus pada bagian vibrasi yang disebut dengan bilangan gelombang (dinyatakan sebagai cm^{-1}). Vibrasi IR terdapat dalam kisaran 4000 cm^{-1} sampai dengan 400 cm^{-1} . Setiap ikatan pada molekul punya frekuensi rentang (*stretching*) dan bengkok (*bending*) yang khas dan mampu menyerap sinar pada frekuensi tertentu. Energi rentangan lebih besar daripada energi untuk membengkok. Serapan rentang suatu ikatan muncul pada frekuensi yang lebih tinggi pada spektrum IR dibanding serapan bengkok pada ikatan yang sama. Dengan demikian, secara kualitatif spektrometri IR menentukan gugus fungsi (bagian dari molekul).

Tipe ikatan yang berbeda memiliki sifat frekuensi vibrasi yang berbeda pula. Dua molekul yang berbeda strukturnya akan memiliki serapan IR yang tidak tepat sama. Dengan demikian, jika akan melacak apakah suatu senyawa identik atau tidak dengan senyawa lainnya melalui perbandingan spektrum IR maka prosedur ini dikenal dengan istilah "*fingerprint*" atau "sidik jari". Jika ternyata spektrumnya memberikan gambaran puncak yang sama maka senyawa tersebut adalah identik. Contoh spektrum IR pada senyawa andrografolid (suatu diterpen lakton) dapat dilihat pada **Gambar 9.8**. Pada

gambar tersebut terlihat puncak pada 3100–3500, 2800–3000, 1727, 1458, and 1220 cm^{-1} menunjukkan keberadaan gugus O-H, C-H, C=O, C=C stretching, dan C-O-C dari cincin lakton yang menggambarkan susunan gugus fungsi penyusun struktur molekul andrographolide.

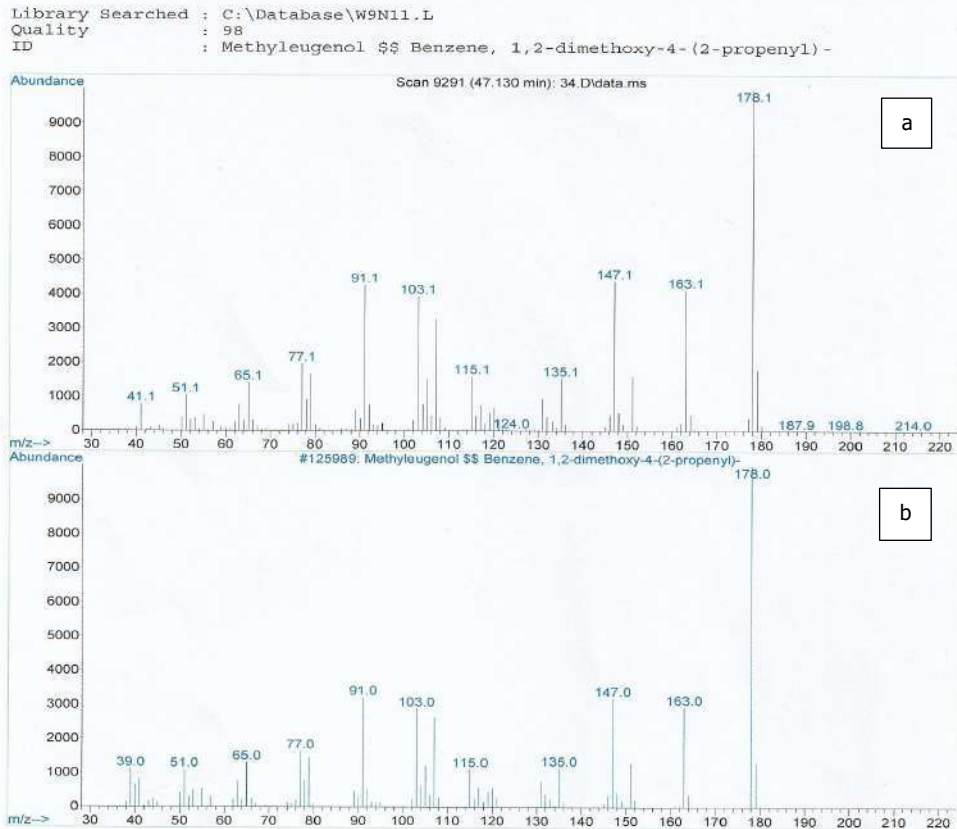


Gambar 9.3. Spektra FT-IR dari Andrographolid ($4000\text{-}550\text{ cm}^{-1}$) (Singh et al., 2006)

3. Spektrometri Massa

Dalam spektrometri massa, molekul-molekul organik (yang pada dasarnya terbentuk dari pasangan elektron) ditembak dengan berkas elektron (*electron impact*, EI) berkekuatan besar sehingga menjadi ion-ion bermuatan positif (ion molekul). Lepasnya satu elektron dari molekul tersebut menghasilkan radikal kation ($M \rightarrow M^+$). Ion molekul M^+ dapat pecah lagi menjadi berupa radikal dan ion atau molekul netral yang kecil dan radikal kation. Jika sejumlah ion molekul (induk) tetap utuh dalam waktu yang cukup lama untuk mencapai detektor, maka timbul puncak ion molekul. Puncak ini memberikan gambaran tentang bobot molekul senyawa yang dianalisis. Ion-ion pecahan tadi dipisahkan oleh pembelokan dalam medan magnet yang tercatat oleh detektor sesuai dengan massa dan muatan (m/z).

Salah satu gambaran spektrum massa komponen kimia yang dihasilkan dari salah satu puncak senyawa (waktu retensi 47,128 menit) milik minyak atsiri batang *Ocimum bacilicum* memiliki berat molekul 178,1 (M^+) dapat dilihat pada **Gambar 9.9**. Pada gambar tersebut, jika dibandingkan antara pola fragmentasi molekul pada senyawa yang dianalisis dengan fragmentasi pada spektra pustaka dapat diprediksi bahwa senyawa tersebut adalah suatu metil eugenol (bobot molekul = 178).



Gambar 9.4. Spektra SM senyawa dari sampel Batang *O.basilicum* (a); dan Spektra SM Pustaka yang menunjukan suatu Metil Eugenol (b) (Hikmawanti et al., 2019)

9.1.3. Resonansi Magnetik Nuklir (RMI)

Spektroskopi RMI atau yang juga dikenal *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) memberikan gambaran mengenai jenis atom, jumlah, maupun sifat lingkungan atom hidrogen (^1H RMI) maupun karbon (^{13}C RMI). Data yang diperoleh pada RMI antara lain: data proton (^1H RMI), data karbon (^{13}C RMI), data COSY/NOSY, data interaksi antara hydrogen dengan atom karbon miliknya (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*, HSQC), dan data interaksi antara hydrogen dengan atom karbon (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*, HMBC) (Sastrohamidjojo, 2018).

9.1.4. Aplikasi metabolomik dan metabonomik

Ekstrak kasar terdiri atas komponen kompleks dari metabolit tanaman (*multi compound*). Dengan demikian, hal ini memungkinkan untuk mendapatkan aktivitas farmakologi dengan multi target (efeknya sinergisme/saling mendukung atau bahkan antagonis/saling berlawanan). Umumnya, penentuan kualitas dari ekstrak kasar yang terkait dengan aktivitas farmakologi dilakukan melalui penentuan kadar senyawa penanda/pembanding ataupun kadar total golongan metabolit tertentu yang justru mengabaikan paradigma tersebut. Teknik *bioassay guided fractionation* (fraksinasi yang dipandu dengan pengujian biologi) ataupun *bioassay guided isolation* (isolasi yang dipandu dengan pengujian biologi) dapat dilakukan untuk

penyederhanaan/pengelompokan senyawa agar memperoleh senyawa murni. Sayangnya, proses ini rumit, biaya mahal, membutuhkan waktu yang lama dan seringkali khasiatnya lebih lemah atau bahkan tidak berkhasiat dibanding ekstrak kasar/perasan/rebusannya (Aziz et al., 2011).

Adanya teknik metabolomik dan metabonomik dapat menjadi solusi dari permasalahan tersebut. Metabolomik (atau *metabolite profiling*) adalah analisis total metabolit sekunder (berat molekul 50-5000) secara kualitatif dlm suatu sampel obat herbal dengan karakter tertentu terkait aktivitas. Metabonomik adalah suatu metabolomik yang dikembangkan ke arah analisis kuantitatif metabolit sekunder total yang berperan dalam aktivitas biologis-farmakologis tertentu dalam sampel obat herbal. Keunggulan dari kedua teknik ini adalah preparasinya yang mudah, sampel sangat sedikit (< 0,1 g bahkan cukup dengan 1 mg saja), hasilnya objektif dan proses analisisnya cepat. Instrumen yang sering digunakan meliputi KG-SM, KC-SM, KCKT-MS ataupun RMI 1-2 dimensi, dan lain sebagainya. Tantangan dari teknik ini adalah ketersediaan instrument yang terbatas, terkait biaya alat, prosedur dan perawatan yang mahal, instrumentasi sederhana (seperti KLT-KT atau HPLC) sudah mampu melakukan standardisasi, ataupun produk herbal tanpa standardisasi masih laku di pasaran (Aziz et al., 2011).

Latihan 9

1. Apa yang dimaksud dengan senyawa penanda?
2. Apa tujuan dilakukan analisis senyawa penanda pada tumbuhan obat?
3. Sebutkan beberapa hal yang harus dipenuhi oleh metode analisis untuk tujuan identifikasi dan kuantifikasi senyawa marker?
4. Apa keunggulan KLT-KT dibandingkan KCKT dalam analisis senyawa penanda?
5. Apa keunggulan metode tandem KG-SM dibandingkan KG pada analisis senyawa penanda?

Jawaban 9

1. Jawaban :
Senyawa penanda adalah senyawa kimia dalam simplisia maupun ekstrak yang dapat memiliki khasiat terapeutik ataupun tidak.
2. Jawaban :
Tujuan melakukan analisis senyawa penanda pada tumbuhan obat adalah berkontribusi pada pengawasan mutu bahan obat alam baik bentuk simplisia, ekstrak, maupun sediaan obat bahan alam agar dapat menjamin dan memenuhi persyaratan mutunya.
3. Jawaban :
Beberapa hal yang harus dipenuhi oleh metode analisis untuk tujuan identifikasi dan kuantifikasi senyawa marker adalah metode analisis harus spesifik dan selektif terhadap senyawa penanda yang dipilih untuk identifikasi dan kuantifikasi dalam obat bahan alam. Metode analisis harus divalidasi.
4. Jawaban :
Keunggulan KLT-KT adalah tekniknya sederhana (mirip KLT biasa), efisien dan cepat, cukup sensitif, selektif dan akurat untuk digunakan pada identifikasi (kualitatif) dan kuantitatif senyawa penanda dari bahan alam.
5. Jawaban :
Keunggulan metode tandem KG-SM pada analisis senyawa penanda adalah jika dibandingkan dengan teknik KG saja (hanya memisahkan), KG-SM tidak hanya memisahkan namun dapat memberikan kemudahan dalam memprediksi senyawa yang dianalisis serta mampu memberikan gambaran kadar relatif dari tiap komponen senyawa yang teridentifikasi.

Rangkuman 9

Metode analisis untuk tujuan kontrol kualitas obat bahan alam dapat menggunakan kromatografi dan spektroskopi. Metode yang paling cocok adalah metode yang disesuaikan dengan jenis sampel (apakah simplisia, ekstrak, fraksi, ataupun isolat) dan tujuan analisis

(apakah kualitatif atau kuantitatif). Penting sekali memahami prinsip, keunggulan dan keterbatasan setiap metode serta mengetahui profil fisika kimia dari senyawa penanda yang digunakan sebagai acuan kontrol kualitas dari sampel bahan alam. Pengetahuan ini akan memudahkan peneliti dalam menentukan metode analisis mana yang akan digunakan.

Tes Formatif 9

1. Parameter berikut yang diamati untuk mengetahui keberadaan senyawa penanda secara kualitatif pada sampel ekstrak dengan menggunakan metode KLT-KT adalah
 - A. waktu retensi
 - B. luas area
 - C. intensitas puncak
 - D. nilai R_f
 - E. bobot molekul
2. KC-KT merupakan kromatografi yang umumnya digunakan untuk pemisahan senyawa yang tidak volatil. Pemisahan pada metode ini terjadi pada
 - A. planar
 - B. bidang datar
 - C. kertas
 - D. kolom terbuka
 - E. kolom tertutup
3. Prosedur identifikasi kemiripan dari susunan gugus fungsi pada spektra IR dari suatu isolat bahan alam yang diperoleh peneliti di laboratoriumnya terhadap spektra IR senyawa penanda yang dituju disebut
 - A. fragmentasi ion
 - B. sidik jari
 - C. pemprofilan metabolit
 - D. penentuan kuantitatif
 - E. metabolomik
4. Yang bukan merupakan hal penting untuk menentukan kuantitas senyawa penanda pada metode spektroskopi UV-Vis adalah
 - A. memastikan reaksi kimia terjadi dengan sempurna dan stabil (terutama untuk senyawa tidak berwarna)
 - B. memastikan senyawa target yang dianalisis larut baik dalam pelarut yang sesuai
 - C. memastikan bahwa terbentuknya persamaan garis linear pada kurva baku agar hukum Lambert-beer terpenuhi
 - D. memastikan pembacaan hasil reaksi dilakukan pada panjang gelombang maksimal agar meminimalkan bias
 - E. memastikan molekul senyawa mengalami vibrasi akibat sinar elektromagnetik

5. Pada analisis kualitatif marker menggunakan spektroskopi massa maka data yang diperoleh adalah
- A. kelimpahan dan fragmentasi ion dalam m/z
 - B. kelimpahan dan serapan pada bilangan gelombang
 - C. serapan pada panjang gelombang tertentu dalam nm
 - D. intensitas dan waktu retensi
 - E. intensitas dan nilai R_f

Jawaban Tes Formatif 9

- 1. D
- 2. E
- 3. B
- 4. E
- 5. A

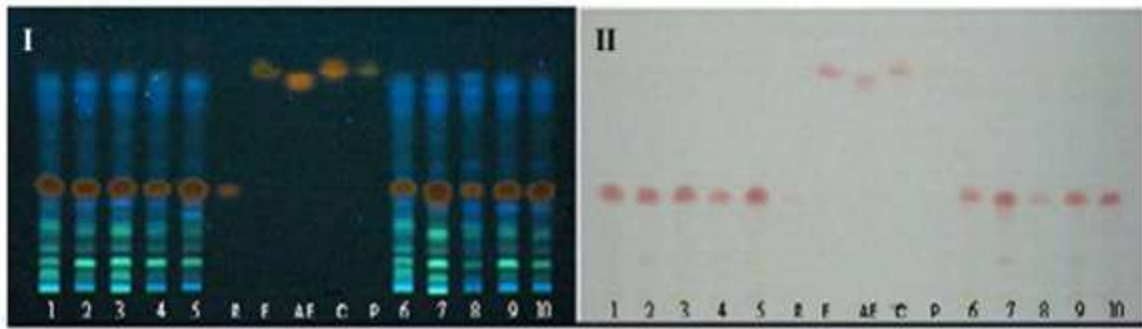
MATERI 10: Aplikasi Pengujian Parameter Spesifik

Metode Pembelajaran	Estimasi Waktu	CPMK
<ul style="list-style-type: none"> • Kuliah Interaktif • Diskusi • <i>Question Based Learning</i> 	150 menit	CPMK-4: Menunjukkan penguasaan konsep teoritis tentang standarisasi dan penentuan marker Obat Bahan Alam; (CPL-4)

10.1. Penentuan pola sidik jari dengan KLT

Penentuan standar mutu dari tumbuhan obat dapat dilakukan menggunakan KLT sebagai suatu teknik analisis kandungan kimia penting salah satunya penentuan sidik jari. Penentuan sidik jari dapat memberikan gambaran aspek spesifik (yang merupakan ciri khas) pada tanaman melalui potret informasi keberagaman kandungan kimia sebagai bentuk evaluasi dari bahan baku herbal baik simplisia maupun ekstrak. Dengan demikian, penentuan pola sidik jari dapat juga digunakan untuk tujuan identifikasi stabilitas kualitas dari sumber lokasi tumbuh yang berbeda (lihat **Gambar 10.1**), deteksi pemalsuan bahan baku (baik simplisia maupun ekstrak), dan sebagainya. Analisis sidik jari juga dapat dilakukan untuk tujuan identifikasi komponen kimia dari tanaman dengan morfologi yang mirip (lihat **Gambar 10.2**) (Rafi dkk., 2017).

Penapisan menyeluruh komponen kimia dengan sidik jari dapat diperoleh dalam bentuk spektrum (baik IR, NMR, dan sebagainya) maupun dengan kromatogram (KLT, KG, dan sebagainya). Penentuan sidik jari dengan KLT dapat dilakukan dengan mengoptimalkan identifikasi yang mengarah pada senyawa target tertentu yang menjadi ciri khas (identitas) suatu tumbuhan obat. Banyak kelebihan yang diperoleh dengan analisis sidik jari menggunakan KLT yaitu sederhana, mudah, biaya yang dikeluarkan relatif murah, terjangkau secara personalia, relatif cepat, mudah didokumentasikan, konsumsi pelarut fase gerak yang minimal, dan sebagainya. Preparasi serta prosedur pekerjaan analisis sidik jari seperti halnya analisis KLT biasa. Pada beberapa identifikasi perlu dilakukan derivatisasi untuk dapat mengamati potret kandungan kimia yang dievaluasi (lihat **Gambar 10.3**). Tanpa derivatisasi maka pita intensitas akan terlihat lemah. Setelah deteksi menggunakan pereaksi anisaldehida, pita 6-gingerol yang berwarna ungu akan tampak pada nilai R_f sekitar 0,26. Dengan begitu, keberadaan 6-gingerol tampak jelas pada sampel jahe, sedangkan pada lengkuas merah maupun putih tidak terdeteksi adanya senyawa ini (Rafi dkk., 2017).



Keterangan:

I = dideteksi pada sinar UV365 nm, II = disemprot dengan KOH 10%, 1 = sampel asal Sukhothai, 2 = sampel asal Nan, 3 = sampel asal Udon Thani, 4 = sampel asal Roi Et, 5 = sampel asal Kalasin, 6 = sampel asal Phuket, 7 = sampel asal Nakhon si Thammarat, 8 = sampel asal Bangkok, 9 = sampel asal Sanaburi, 10 = sampel asal Ratchathani, R = Rhein, E = Emodin, AE = Aloe-emodin, C = Chrysophanol, P= Physcione

Sampel: *Cassia fistula*

Fase diam: *precoated* aluminium plate silika gel 60F254 (10 × 20 cm)

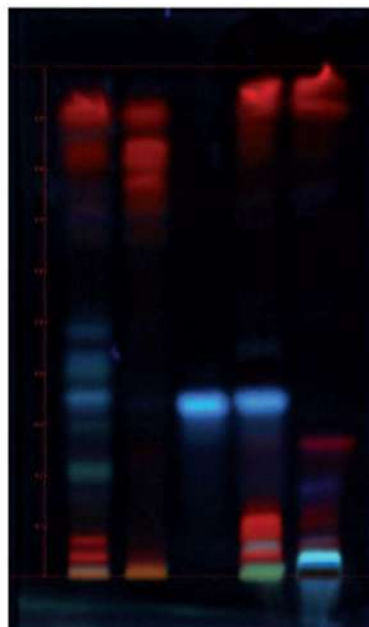
Fase gerak: etil asetat: metanol: air (100: 17: 13)

Reagen: semprot dgn larutan 10% alcoholic potassium hydroxide

Deteksi: Anthraquinones ditunjukkan dgn bercak pink.

Standar: Rhein (glikosida antrakuinon)

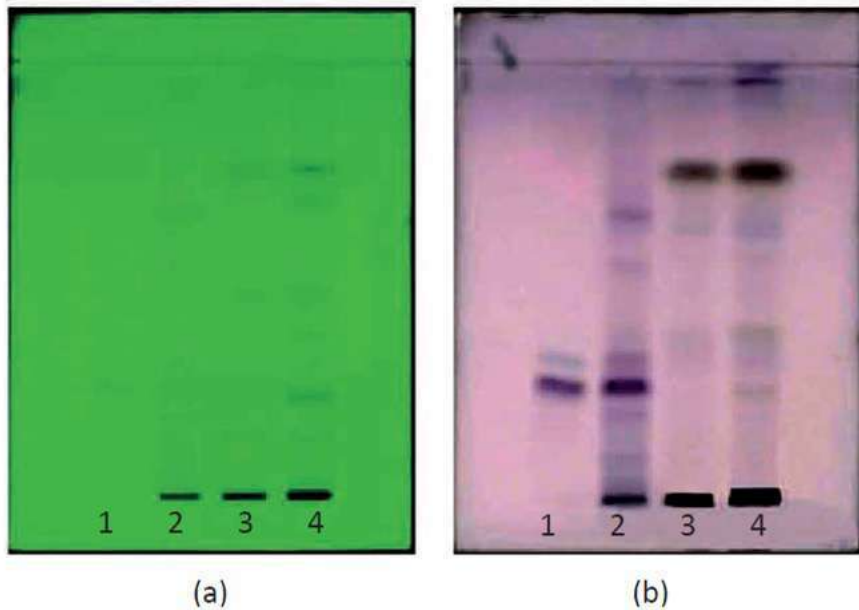
Gambar 10.1. Sidik Jari KLT ekstrak dekok daun *Cassia fistula* dari 10 lokasi yang berbeda (Sakulpanich & Gritsanapan, 2009)



Keterangan:

- 1 = bandotan
- 2 = dandang gendis
- 3 = sinensetin (pembanding)
- 4 = kumis kucing
- 5 = teh-tehan

Gambar 10.2. Sidik Jari KLT dari beberapa variasi tanaman dengan kemiripan secara morfologi (Rafi dkk., 2017)



Keterangan

Lajur	Sampel
1	6-gingerol
2	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.
3	<i>Alpinia galanga</i>
4	<i>Alpinia purpurata</i> K. Schum

Gambar 10.3. Sidik Jari KLT Jahe Merah tanpa menggunakan pereaksi Anisaldehida dilihat di bawah (a) UV254 dan menggunakan pereaksi Anisaldehid untuk mendeteksi pita yang dilihat di bawah sinar tampak (b) (Rafi dkk., 2017)

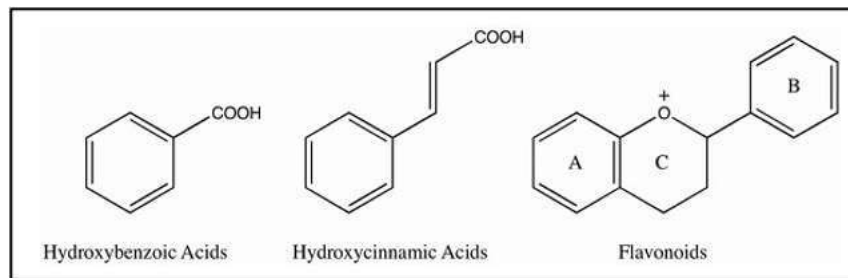
10.2. Penentuan kadar total golongan senyawa

Salah satu penentuan kualitas dari tumbuhan obat dapat dilakukan dengan penentuan kadar total golongan senyawa. Salah satu senyawa penting pada tumbuhan adalah fenolik. Senyawa fenol disintesis dalam tumbuhan sebagian sebagai respon tekanan ekologi dan fisiologis seperti serangan patogen dan serangga, radiasi UV dan luka (Diaz *et al.*, 2010). Struktur dasar ciri senyawa fenolik adalah cincin aromatik yang mengandung satu atau lebih gugus hidroksil (Chirinos *et al.*, 2009). Senyawa fenolik tumbuhan diklasifikasikan sebagai fenol atau polifenol sederhana berdasarkan jumlahnya unit fenol dalam molekul. Fenolat pada tumbuhan terdiri dari fenol sederhana, kumarin, lignin, lignan, tanin terkondensasi dan terhidrolisis, asam fenolik dan flavonoid (Soto Vaca *et al.*, 2012).

Asam fenolat adalah salah satu kelas fenolik utama lain yang ada pada tumbuhan dan ada dalam bentuk ester, glikosida atau amida, tetapi jarang dalam bentuk bebas. Variasi asam fenolat ada pada jumlah dan lokasi gugus hidroksil pada cincin aromatik (Pereira *et al.*, 2009). Asam fenolat memiliki dua struktur:

- a. asam hidroksisinamat
- b. asam hidroksibenzoat.

Turunan asam hidroksinamat termasuk asam ferulat, kafeat, p-kumarin, sedangkan turunan asam hidroksibenzoat terdiri dari galat, asam vanilat, asam prokatekuat. Kelas utama senyawa fenolik lainnya adalah fenolat penyusun dinding sel. Mereka tidak larut dan ditemukan dalam bentuk kompleks. Dua kelompok utama fenolat penyusun dinding sel adalah lignin dan asam hidroksisinat (Vanholme *et al.*, 2010). Senyawa ini berperan penting dalam penyusunan dinding sel selama pertumbuhan tanaman dengan melindungi dari tekanan seperti infeksi, luka dan radiasi UV (Nacz dan Shahidi, 2004). Tanin dapat dibagi menjadi dua kelompok, tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin memiliki potensi membentuk ikatan oksidatif dengan molekul tumbuhan lain.



Gambar 10.4. Struktur Asam Fenolat & Flavonoid

Kuantifikasi fenolat meskipun sudah banyak publikasi terkait metode penetapan kadar fenolat, tetapi tetap sulit dilakukan terutama penentuan pada kelompok fenolik yang berbeda (Ignat *et al.*, 2011). Penetapan kadar fenolat dapat dilakukan dengan :

- 1) Kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC)
- 2) Kromatografi gas (GC)
- 3) Kombinasi spektrometri dengan HPLC/GC, yang paling sering digunakan.

10.3. Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah salah satu teknik yang relatif sederhana untuk menetapkan kadar fenolat pada tanaman. Metode Folin-Denis dan Folin-Ciocalteu adalah dua uji spektrofotometri yang banyak digunakan mengukur total fenolat dalam bahan tanaman sejak lama (Lapornik, *et al.*, 2005). Kedua metode tersebut didasarkan pada reduksi kimiawi yang melibatkan reagen yang mengandung tungsten dan molibdenum (Stalikas., 2007). Produk hasil reduksi ini memiliki warna biru dengan daya serap spektrum cahaya sekitar 760 nm. Reagen untuk kedua metode tidak bereaksi secara spesifik hanya dengan fenol tetapi juga dengan zat lain seperti asam askorbat, amina aromatik dan gula (Box, 1983). Kuantifikasi fenolik total, flavonoid total, proanthocyanidin (tanin terkondensasi) dan tanin terhidrolisis juga dapat ditetapkan dengan metode kolorimetri. Ekstrak metanol atau etanol dari fenol tanaman yang dicampur dengan $AlCl_3$ akan memungkinkan penetapan kadar flavonoid total pada 410–423 nm (Fernandes *et al.*, 2012).

10.4. Kromatografi Gas (KG)

Kromatografi gas (KG) adalah teknik lain yang diterapkan untuk pemisahan, identifikasi dan penghitungan senyawa fenolik seperti asam fenolik, tanin terkondensasi

dan flavonoid (Proestos et al., 2006). Perhatian utama jika menggunakan GC yang tidak berlaku untuk teknik HPLC, adalah derivatisasi dan volatilitas dari senyawa fenolik. Dengan GC, kuantifikasi fenolat mungkin membutuhkan penghilangan lipid dari ekstrak, pelepasan fenolat dari ikatan glikosida dan ikatan ester dan langkah-langkah modifikasi kimiawi, seperti transformasi ke turunan yang lebih mudah menguap (Ali et al., 2013).

Ada beberapa jenis reagen yang digunakan untuk memodifikasi dan membuat turunan yang mudah menguap. Senyawa Etil dan metil kloroformat, diazometana dan dimetil sulfoksida dalam kombinasi dengan metil iodat bisa digunakan untuk membuat metil atau etil ester dari fenolat. Namun, hal ini mungkin menjadi sulit jika ternyata ada metil ester dalam bentuk alami pada ekstrak tersebut. Reagen lain, yang memiliki keunggulan dalam membuat senyawa volatil adalah kelompok senyawa trimetilsilil, seperti *trifluoroacetylmide*, *N-(tert-butyl)dimethylsilyl)-N methyltrifluoroacetamide* dan turunan trimetilsilil. Reaksi ini bebas dari produk samping yang tidak diinginkan dan menghasilkan produk yang sangat mudah menguap tanpa gangguan pada saat analisis. Silyl derivatisasi merupakan pilihan yang sangat baik untuk mengidentifikasi senyawa fenolik (Ali et al., 2013).

10.5. *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

HPLC atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah teknik yang disukai untuk pemisahan dan kuantifikasi senyawa fenolik. Berbagai faktor mempengaruhi analisis HPLC pada senyawa fenolat, diantaranya: pemurnian sampel, fase gerak, jenis kolom dan detektor. Secara umum, fenolat murni yang ditetapkan dengan HPLC menggunakan kolom C18 fase terbalik (RP-C18), detektor susunan dioda foto (PDA) dan pelarut organik polar. Sensitivitas dan deteksi HPLC didasarkan pada pemurnian fenolat dan pra-konsentrasi dari ekstrak kasar tumbuhan.

Tahap pemurnian termasuk menghilangkan senyawa yang mengganggu dari ekstrak kasar dengan pelarut yang dapat dipartisi dan menggunakan kromatografi kolom terbuka atau proses adsorpsi-desorpsi. Bahan yang digunakan untuk memurnikan fenolat dari ekstrak kasar: sephadex LH-20, poliamida, amberlite, *Solid Phase Extraction (SPE)*, dan stirena-divinylbenzene (XAD 4, XAD16, EXA-90, EXA 118, SP70), resin akrilik (XAD-7, EXA-31) . Namun dalam banyak penelitian, SPE digunakan untuk pemurnian sebelum pemisahan menggunakan HPLC.

Pada penetapan kadar fenolat pada HPLC, fase gerak yang sering digunakan adalah: asetonitril dan metanol, atau bentuk encernya. Dalam beberapa kasus bisa menggunakan etanol, tetrahidrofuran (THF) dan 2-propanol. pH fase gerak dijaga dalam kisaran pH 2-4 untuk menghindari ionisasi fenolat selama identifikasi. Karena itu fase gerak umumnya diasamkan. Sebagian besar mengandung asam asetat, tetapi ada juga yang menggunakan asam format, asam fosfat, buffer fosfat, sitrat dan amonium asetat. Gradien sistem elusi lebih sering digunakan daripada sistem elusi isokratik (Ali et al., 2013).

10.6. Contoh Penetapan Kandungan Fenol Total dengan Kolorimetri

Kandungan fenol total dalam ekstrak ditentukan menggunakan metode kolorimetri. Dua puluh (20) µl ekstrak ditambahkan dengan 100 µL Reagen Folin-C (1:10), dikocok selama 60 detik dan didiamkan selama 4 menit. Ditambahkan larutan Natrium karbonat (Na₂CO₃) 7,5% 80 µl dalam air, dikocok selama 60 detik. Campuran diinkubasi pada suhu kamar di tempat gelap selama 2 jam. Selanjutnya, dibaca pada 600 nm. Konsentrasi ekstrak dalam sampel dibuat sebesar 100 µg/ml. Konsentrasi larutan stok adalah 1000 µg/ml. Blangko adalah sampel diganti dengan metanol. Perlakuannya sama dengan Sampel. Dalam penentuan fenol total menggunakan galat asam sebagai standar akan diperoleh kurva standar yang kemudian menghasilkan persamaan garis sebagai gambaran linearitas antara konsentrasi baku dengan absorbansinya (lihat **Tabel 10.1**). Total fenol kemudian dihitung sebagai kesetaraan terhadap asam galat (mg GAE/gram) (lihat **Tabel 10.2**) (Rini *et al.*, 2020). Rumus perhitungan kadar fenol total adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar fenol total (mgGAE/g sampel)} = \frac{\text{fenol total } (\mu\text{g/ml}) \times \text{faktor pengenceran} \times \text{volume (ml)}}{\text{Berat sampel (gram)}}$$

Tabel 10.1. Kurva Standar Asam Galat pada Fenol Total

Konsentrasi (µg/ml)	Serapan rata-rata	SD	KV	R ²
3,125	0,340	0,020	5,757	
6,25	0,501	0,020	3,905	y = 0,026x + 0,3373
25	1,161	0,129	11,088	R ² = 0,9893
50	1,703	0,038	2,254	
100	2,910	0,042	1,443	

Tabel 10.2. Perhitungan Kadar Fenol Total pada tanaman *Sterculia macrophylla*

Abs. sampel	Abs. blangko	Abs. bersih	Konsentrasi fenol total*	Kadar ($\mu\text{gGAE/gr}$) sampel**	Kadar (mgGAE/gr) sampel
Daun <i>S. macrophylla</i>					
1,287	0,037	1,250	35,1214	351214	351,21
1,200	0,037	1,163	31,7714	317714	317,71
1,102	0,037	1,065	27,9945	279945	279,94
0,992	0,037	0,956	23,7829	237829	237,83
				Rata-rata	296,68
				SD	48,85
				KV	16,47

Penggunaan asam galat sebagai larutan standar karena merupakan salah satu fenol alami, stabil, serta relatif. Asam galat termasuk dalam senyawa fenolik turunan asam hidroksibenzoat yang tergolong asam fenol sederhana. Asam galat menjadi pilihan sebagai standar karena ketersediaan substansi yang stabil dan murni. Asam galat direaksikan dengan reagen Folin-Ciocalteu menghasilkan warna kuning yang menandakan bahwa mengandung fenol, setelah itu ditambahkan dengan larutan Na_2CO_3 menghasilkan warna biru. Senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu hanya dalam suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat, sehingga ditambahkan larutan Na_2CO_3 (Aktsar *et al.*, 2015)

Latihan 10

1. Sebutkan pentingnya melakukan analisis sidik jari pada prosedur standarisasi tanaman obat!
2. Sebutkan kelebihan KLT dalam hal menganalisis sidik jari pada tanaman obat!
3. Metode apa saja yang bisa digunakan untuk menetapkan kadar fenolat?
4. Pada penetapan kadar fenol dengan menggunakan folin-ciocalteu mengapa memerlukan suasana basa?
5. Apa alasan asam galat sering digunakan sebagai standar dalam penetapan kadar fenol total?

Jawaban 10

1. Jawaban :
Memberikan gambaran ciri khas kimia pada tanaman sehingga dapat digunakan untuk evaluasi bahan baku herbal baik simplisia maupun ekstrak, untuk identifikasi stabilitas kualitas dari sumber lokasi tumbuh yang berbeda, untuk deteksi pemalsuan bahan baku (baik simplisia maupun ekstrak), untuk tujuan identifikasi komponen kimia dari tanaman dengan morfologi yang mirip.
2. Jawaban :
Sederhana, mudah, biaya yang dikeluarkan relatif murah, terjangkau secara personalia, relatif cepat, mudah didokumentasikan, konsumsi pelarut fase gerak yang minimal.
3. Jawaban :
Spektrometri, GC, HPLC, atau kombinasi antara spektrometri dengan HPLC/GC.
4. Jawaban :
Agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat, sehingga ditambahkan larutan Na_2CO_3
5. Jawaban :
Karena asam galat lebih stabil dan murni serta harganya lebih murah dibandingkan dengan senyawa fenolat yang lainnya.

Rangkuman 10

Penentuan sidik jari merupakan bagian penting dalam kendali mutu simplisia dan ekstrak sebagai bahan baku obat tradisional. Penggunaan metode KLT cukup memberikan hasil memuaskan dengan metode analisis yang sederhana. Selain itu teknik pemisahan dan penetapan kadar golongan senyawa (salah satunya fenolat) menjadi sangat diperlukan dalam penentuan kualitas tumbuhan. Pemilihan metode penetapan kadar fenolat yang spesifik, sederhana, cepat dan ramah lingkungan dari beberapa metode yang ada sangat penting.

Tes Formatif 10

1. Pada penetapan kadar senyawa fenolat secara spektrometri, diperiksa pada panjang gelombang
 - A. 415
 - B. 416
 - C. 433

- D. 530
E. 760
2. Warna yang terbentuk pada penetapan kadar fenol total dengan menggunakan reagen Folin-ciocalteu adalah....
A. Merah
B. Hijau
C. Kuning
D. Ungu
E. Orange
3. Metode penetapan kadar fenolat yang terkadang diperlukan proses derivatisasi menjadi bentuk yang lebih volatil, dilakukan pada metode....
A. Spektrometri
B. GC
C. HPLC
D. Kolorimetri
E. Kombinasi HPLC dan spektrometri
4. Berikut yang merupakan bagian penting dalam analisis sidik jari suatu tanaman menggunakan KLT adalah
A. perlu menggunakan standar baku sebagai pembanding
B. perlu peralatan kolom yang canggih untuk pemisahan
C. dapat dilakukan tanpa menggunakan penyemprotan dengan reagen spesifik
D. dapat dilakukan tanpa melakukan penjenuhan fase gerak
E. perlu detektor yang tepat untuk memperoleh spektrum yang jelas
5. Berikut yang bukan merupakan keunggulan KLT dalam proses analisis sidik jari senyawa pada tanaman obat adalah....
A. analisis kuantitatif
B. perlu derivatisasi
C. sederhana dan ekonomis
D. perlu perawatan kolom
E. analisis kadar

Jawaban Tes Formatif 10

1. E
2. D
3. B
4. A
5. C

MATERI 11:
APLIKASI INSTRUMENTASI DALAM ANALISIS SENYAWA
PENANDA OBAT/ MARKER

Metode Pembelajaran	Estimasi Waktu	CPMK
<ul style="list-style-type: none"> • Kuliah Interaktif • Diskusi • <i>Question Based Learning</i> 	150 menit	CPMK-4: Menunjukkan penguasaan konsep teoritis tentang standarisasi dan penentuan marker Obat Bahan Alam; (CPL-4)

11.1. Sambiloto

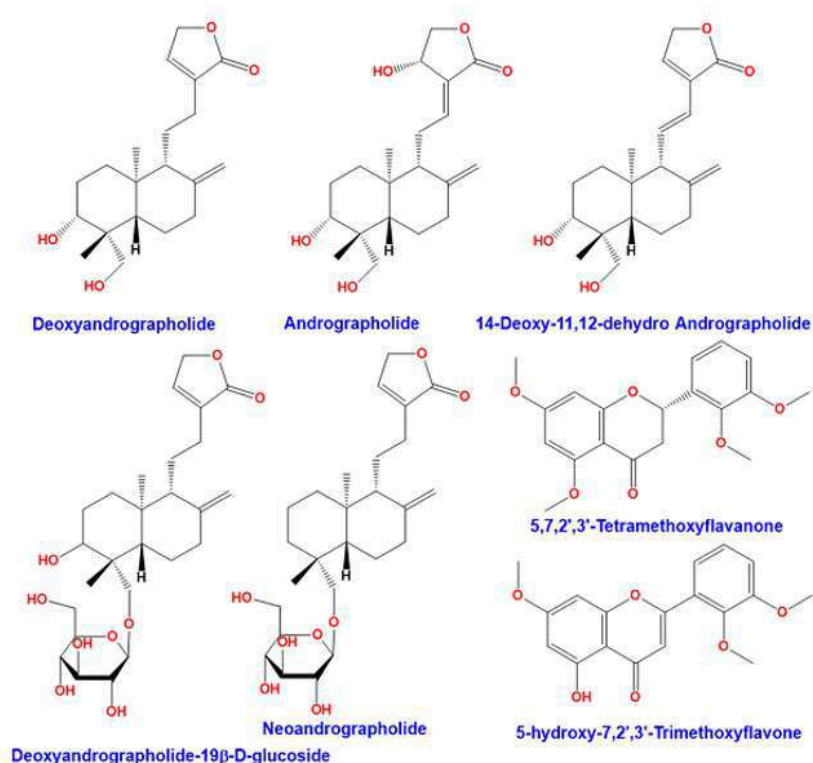
Andrographis paniculata (Burm. F.) Wall ex Nees. (*Acanthaceae*) atau di Indonesia yang lebih dikenal sebagai sambiloto adalah salah satu tanaman obat penting yang telah banyak digunakan dalam pengobatan Cina, Ayurveda dan jamu di Indonesia. Manfaat tanaman ini diantaranya untuk pengobatan gangguan lambung, masuk angin, influenza, dan penyakit menular lainnya.

Herba sambiloto atau *Andrographis paniculata* mengandung banyak senyawa bioaktif termasuk diterpen lakton (*deoxyandrographolide*, *andrographolide*, *neoandrographolide*, dan *14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide*), diterpen glukosida (deoksiandrografolid-19 β -d-glukosida), dan flavonoid (5,7,20,30-tetrametoksiflavanon dan 5-hidroksi-7,20,30-trimetoksiflavanon) (Mussard *et al.*, 2019). Komponen aktif pada *A. paniculata* adalah senyawa diterpen lakton yang sangat pahit dan dikenal sebagai *andrographolides* (AP), yang merupakan komponen utama. AP merupakan senyawa pahit tidak berwarna dan berbentuk kristal. Diterpen pahit utama lainnya yang juga merupakan lakton adalah 14-deoksi-11,12-didehidroandrografolida (DIAP) yang merupakan kristal jarum tak berwarna (Akowuah *et al.*, 2006).

Senyawa Andrographolide memiliki aktivitas farmakologis diantaranya sebagai hepatoprotektif (Chua *et al.*, 2014, Singha *et al.*, 2007), anti kanker (Khan *et al.*, 2018, Liao *et al.*, 2019), anti thrombotic (Lu *et al.*, 2012, Mussbacher *et al.*, 2019) antivirus (Manjula *et al.*, 2018, Wintachai *et al.*, 2015), antiinflamasi (Tan *et al.*, 2017, Xu *et al.*, 2019) dan lain-lain. Identifikasi dan kuantifikasi senyawa andrographolide telah banyak dilakukan diantaranya dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) (Saxena *et al.*, 2000), dan kromatografi cair kinerja tinggi dengan deteksi ultraviolet (HPLC-UV) (Jain *et al.*, 2000, Seema *et al.*, 2018).



**Gambar 11.1. Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. F) Wall ex Nees)
(sumber : Mussard *et al.*, 2019)**



**Gambar 11.2. Senyawa yang terdapat pada Sambiloto
(sumber : Mussard *et al.*, 2019)**

11.2. Isolasi dan karakterisasi Andrographolide (AP) dan 12-didehydroandrographolide (DIAP)

Bubuk daun kering sambiloto (1,0 kg) diekstraksi dengan metanol menggunakan soxhlet. Ekstrak metanol (280 g) difraksinasi dengan n-heksana, etil asetat dan air. Fraksi etil asetat dipekatkan di vakum dan dipisahkan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel dengan fase gerak kloroform:metanol yang polaritasnya meningkat dan didapatkan fraksi A-1 dan A-2. Fraksi A-1 dipisahkan dengan kromatografi kolom vakum dengan menggunakan fase gerak heksana:metanol yang polaritasnya semakin meningkat, dan didapatkan senyawa andrographolide (AP)

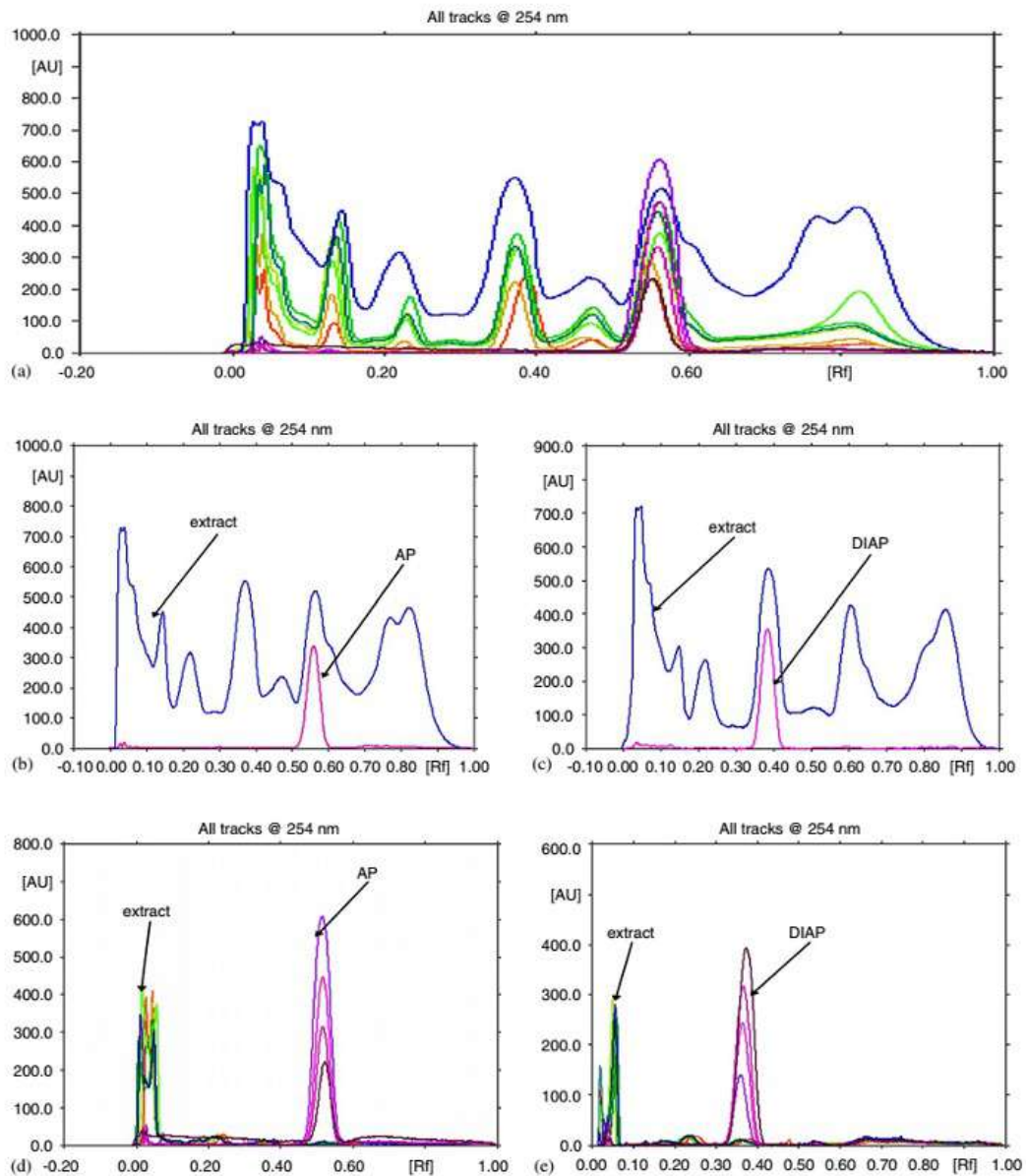
sebanyak 156 mg. Fraksi A-2 dipisahkan beberapa kali dengan kromatografi kolom, dengan fase diam silika gel dan fase gerak heksana:etil asetat dengan polaritas yang meningkat dan dihasilkan DIAP (49 mg). Senyawa yang diisolasi diidentifikasi dengan NMR, dan spektrum dibandingkan dengan data literatur (Matsuda *et al.*, 1994).

A. Persiapan Sampel

Tanaman dari tempat berbeda dikumpulkan pada sore hari pada usia tanaman 30-45 hari dipilih tanaman dengan ukuran dan luas daun yang serupa. Setiap spesimen diberikan label, dinomori. Spesimen voucher dari bahan tanaman dari lokasi yang berbeda disimpan. Masing-masing satu gram sampel serbuk daun yang berbeda lokasi diekstraksi dengan 100 mL metanol dan 100 mL air masing-masing selama 4 jam dengan kontinyu diaduk dengan pengaduk magnet pada suhu 40 °C. Ekstraknya adalah disaring dengan kertas Whatman No. 1 dengan vacum Buchner. Ekstrak metanol dilarutkan kembali dalam metanol dan volume dicukupkan hingga 10 mL untuk digunakan pada analisis HPTLC dan HPLC. Ekstrak air dilarutkan dalam akuades sampai volume total 10 mL dan juga digunakan untuk analisis HPTLC dan HPLC.

B. Analisis HPTLC

Plat Kromatograf yang berupa silika gel GF₂₅₄ sebelumnya dilakukan pra-aktivasi (100 °C). Plat silika untuk HPTLC (10 x 10 cm; Ketebalan lapisan 0,25 mm; diperoleh dari Merck). Densitometri CAMAG (TLC scanner merk Camag Model-3 dilengkapi dengan Camag CATS 4 software), rentang pemantauan 190-700 nm. Celah diatur menjadi 8 x 0,4 mm dan akuisisi data serta pemrosesan dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak winCATS. Sampel sebanyak 20 mL ditotolkan pada plat dengan lebar pita 8 mm, ditotolkan 10 mm dari bawah plat silika, dengan menggunakan Camag (Muttien, Swizterland) Linomat Aplikator KLT otomatis dengan aliran nitrogen dengan kecepatan 10 mL/s. Pengembangan plat KLT dilakukan menggunakan chamber kembar Camag, yang telah jenuh dengan fase gerak selama 2 jam. Fase gerak merupakan campuran dari kloroform:metanol (8:2). Fase gerak dibiarkan naik ke setinggi 8 cm. KLT dilakukan pada suhu kamar. Setelah pengembangan, Plat dikeringkan dan komponennya diamati dibawah sinar UV 254 nm. Penentuan kuantitatif dilakukan oleh program perangkat lunak winCATS menggunakan metode kalibrasi eksternal. Larutan stok AP dan DIAP dilarutkan dalam metanol pada konsentrasi 2,0 mg/mL. Larutan standar yang akan digunakan sebagai kurva standar disiapkan dengan mengencerkan larutan stok (AP dan DIAP) dengan metanol sehingga kandungan AP dan DIAP pada larutan tersebut pada konsentrasi masing-masing 10-2000 mg/mL. Hasil profil HPTLC dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 11.3. Profil HPTLC : (a) ekstrak methanol; (b) ekstrak metanol dan AP; (c) ekstrak metanol dan DIAP; (d) ekstrak air dan AP; dan (e) ekstrak air dan DIAP. Eluen: kloroform: metanol (8:2 v/v); Deteksi: 254nm.

Campuran kloroform:metanol (8:2) digunakan sebagai fase gerak memberikan resolusi yang baik untuk AP dan DIAP, dan didapatkan harga Rf 0,55 dan 0,43. Gambar 3A – C menunjukkan profil HPTLC dari standar yang diisolasi, air dan ekstrak metanol sambiloto. Kurva kalibrasi untuk marker/standar linier, dengan nilai di atas kisaran 10–2000 mg/mL. Tabel 1 menunjukkan batas deteksi/ *limit of detection* (LOD) nilai AP dan DIAP oleh HPTLC. LOD ditentukan dengan *scanning* berulang sebanyak enam kali, dan mengkonversi area ke konsentrasi.

Tabel 11.1. Linearitas dan Nilai LOD dari AP & DIAP oleh HPTLC dan HPLC

Marker	HPTLC assay				
	Linear range (µg/mL)	Linear equations	R	R _f	LOD (µg/mL)
AP	10–2000	$y = -258.92 + 47.68x$	0.9966	0.55	3.0
DIAP	10–2000	$y = -353.07 + 43.38x$	0.9972	0.43	3.6
Marker	HPLC assay				
	Linear range (µg/mL)	Linear equations	r	R _t (min)	LOD (µg/mL)
AP	1–2000	$y = 26.022x - 54.584$	0.9998	5.84	0.03
DIAP	1–2000	$y = 28.675x - 93.14$	0.9999	10.81	0.04

(sumber: Akowuah *et al.* 2006)

Ketepatan HPTLC diperiksa dengan scanning berulang kali pada tempat yang sama masing-masing enam kali pada hari yang sama (presisi intra hari) dan 5 hari berturut-turut (presisi antar hari) dan nilai standar deviasi dihitung. Hasilnya menunjukkan presisi yang dapat diterima, berdasarkan data yang ditunjukkan pada tabel 2 di bawah ini.

Tabel 11.2. Presisi Analitik antar dan Intra-Hari senyawa AP dan DIAP Herba Sambiloto dengan HPTLC & HPLC

Inter- and intra-day analytical precisions of makers (AP and DIAP) of *A. paniculata* by HPTLC and HPLC

Markers	Precision of HPTLC assay (n = 6)		
	Amount added (µg/mL)	Intra-day RSD (%)	Inter-day RSD (%)
AP	10	0.94	0.97
	100	0.91	0.94
	1000	0.89	0.86
DIAP	10	0.96	0.98
	100	0.99	0.98
	1000	0.94	0.93
Markers	Precision of HPLC assay (n = 6)		
	Amount added (µg/mL)	Intra-day RSD (%)	Inter-day RSD (%)
AP	10	0.92	0.98
	100	0.88	0.92
	1000	0.86	0.87
DIAP	10	1.02	1.12
	100	0.96	1.02
	1000	1.01	1.08

(sumber Akowuah *et al.* 2006)

Penyerapan spektrum UV-Vis diperiksa dengan CAMAG TLC. Prosedur HPTLC digunakan sebagai metode skrining cepat, sampel yang dikumpulkan diperoleh dari lokasi berbeda. Secara kualitatif, pola sidik jari HPTLC serupa untuk semua ekstrak dari lokasi berbeda, ini memberikan indikasi bahwa mereka mempunyai identitas yang sama (gambar

3A). AP dan DIAP dipisahkan dengan baik pada ekstrak dengan metode HPTLC dan terdeteksi di semua sampel pada Rf 0,55 dan 0,43, dan terlihat pada gambar 3B. Tabel 3 menunjukkan jumlah penanda pada ekstrak dinyatakan sebagai mg/g kering bobot. HPTLC dan spektra UV-Vis dapat digunakan untuk menentukan jumlah AP dan DIAP dalam ekstrak. Hasil bervariasi yaitu 25,9-31,8 mg/g berat kering dan 21,7-6,9 mg/g berat kering. Standar tidak terdeteksi dalam ekstrak air pada Uji HPTLC (Gambar 3C), hal ini disebabkan karena konsentrasinya di bawah nilai LOD.

Tabel 11.3. Kadar AP & DIAP dalam Ekstrak Air dan Ekstrak Metanol Herba Sambiloto dengan HPLC dan HPTLC (mg/g berat kering)

Samples	Name of locality	HPTLC				HPLC			
		Water extract		MeOH extract		Water extract		MeOH extract	
		AP	DIAP	AP	DIAP	AP	DIAP	AP	DIAP
I	Pulau Pinang	Nd	Nd	25.9 b	22.7 ab	0.8 a	0.7 a	21.5 b	13.3 b
II	Pulau Langkawi	Nd	Nd	28.6 b	24.0 a	0.7 a	0.5 a	21.7 b	15.0 ab
III	Kepala Batas	Nd	Nd	29.3 b	24.5 a	1.4 a	0.7 a	22.7 b	16.2 ab
IV	Bangi	Nd	Nd	39.1 a	26.9 a	1.3 a	0.8 a	29.5 a	19.6 a
V	Melaka	Nd	Nd	31.8 ab	26.8 a	1.2 a	0.5 a	25.5 ab	17.5 a
VI	Rawang	Nd	Nd	29.7 b	26.3 a	1.3 a	0.7 a	22.6 b	17.5 a
VII	Gurun	Nd	Nd	26.5 b	21.7 b	0.8 a	0.4 a	21.8 b	12.7 b

^aDifferent letters in rows indicate significantly different values ($P < 0.05$).

Nd: not detected.

C. Analisis HPLC

Analisis dilakukan dengan menggunakan *Agilent Technologies Series 1100* yang dilengkapi dengan injektor otomatis, kolom, dan detektor UV. Kolom menggunakan LiChrosorb RP-18 (250x4,6 mm, ukuran partikel 10 mm) (Merck Darmstadt, Jerman). Suhu dipertahankan pada 25 °C, dengan volume injeksi 20 mL dan laju aliran 1 mL/menit. AP dan DIAP dipisahkan menggunakan fase terbalik, kolom LiChrosorb C-18 dengan fase gerak metanol:air (pH 2,8 dengan asam fosfat, 6:4 v/v) dan dideteksi pada 210 nm. Larutan stok AP dan DIAP dibuat dengan melarutkannya dalam metanol masing-masing pada konsentrasi 2,0 mg/mL. Larutan standar disiapkan dengan pengenceran larutan stok dengan metanol sehingga didapatkan larutan yang mengandung AP dan DIAP pada konsentrasi 1–2000 mg/mL.

Gambar 3A dan B menunjukkan kromatogram yang diperoleh dari analisis HPLC pada ekstrak metanol dan ekstrak air sambiloto/*A. paniculata*. Standar/marker AP dan DIAP ditentukan menggunakan kondisi isokratik metanol:air (pH 2,8 dengan asam fosfat, 60:40 v/v) dan dielusi dalam waktu 12 menit. Puncak AP dan DIAP diidentifikasi dengan membandingkan dengan waktu retensi standar AP dan DIAP yang diisolasi pada kondisi yang sama (gambar 3). AP dan DIAP menunjukkan linieritas yang baik pada konsentrasi 1-2000 mg/mL dalam kurva kalibrasi kurva dengan HPLC. Tabel 1 menunjukkan nilai LOD dari AP dan DIAP dengan uji HPLC. Limit deteksi ditentukan dengan menginjeksikan standar terendah yang dapat dideteksi sebanyak enam kali, dan mengkonversi area ke konsentrasi. Untuk menilai ketepatan metode, larutan standar AP

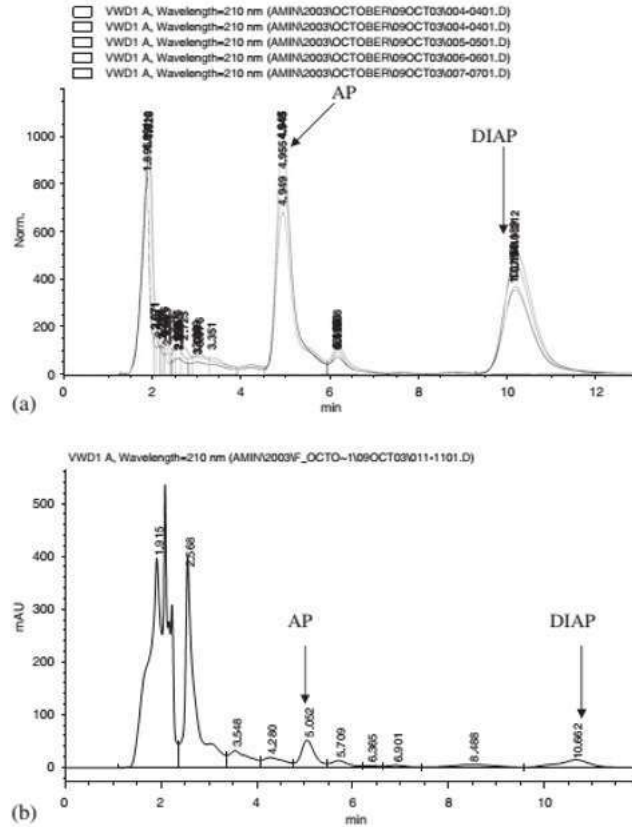
dan DIAP ditetapkan sebanyak enam kali pada hari yang sama dan selama lima hari berturut-turut. Hasil HPLC menunjukkan presisi yang dapat diterima berdasarkan data deviasi standar yang ditunjukkan pada tabel 2.

Studi variasi intra dan antar hari, mengindikasikan bahwa standar deviasi relatif kurang dari 1,08% dan 1,12%. Keakuratan metode dievaluasi melalui pengulangan metode. Pengulangan percobaan dilakukan pada tiga konsentrasi. Hasil AP dan DIAP pada ekstrak ditunjukkan pada Tabel 4. Perolehan kembali rata-rata untuk AP dan DIAP dari ekstrak dengan HPLC adalah 99,1% dan 98,1% (Tabel 4), yang menunjukkan akurasi yang baik. Prosedur HPLC diterapkan untuk menetapkan kadar AP dan DIAP dalam ekstrak dari lokasi berbeda (Gambar 4). Analisa kuantitatif dilakukan di bawah kondisi isokratik menggunakan standar eksternal.

Pengujian dengan HPLC memberikan pemisahan yang cukup baik untuk mengidentifikasi puncak AP dan DIAP. Tabel 3 menunjukkan jumlah marker di sampel dari tempat yang berbeda. Besaran AP bervariasi dari 21,5-29,5 mg/g berat kering dan jumlah DIAP bervariasi dari 21,7-26,9 mg/g berat kering pada ekstrak metanol. Ekstrak air mengandung AP bervariasi dari 0,7-1,4 mg/g berat kering dan DIAP dari 0,4-0,8 mg/g berat kering. Berdasarkan kadar senyawa marker pada ekstrak air metode HPLC lebih sensitif daripada HPTLC. Senyawa marker pada ekstrak metanol menghasilkan regresi linier yang baik antara hubungan metode HPTLC dan HPLC, untuk marker AP ($r_{xy} : 972$) dan DIAP ($r_{xy} : 966$). Ini menunjukkan bahwa metode HPTLC dapat diandalkan untuk menghitung marker secara baik, sehingga metode ini dapat digunakan untuk skrining awal atau analisis semi kuantitatif.

Tabel 11.4. Data Recovery Standar AP & DIAP pada Ekstrak *A. paniculata* dengan HPTLC & HPLC

Markers	Recovery by HPTLC assay ($n = 3$)			
	Amount added ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	Mean \pm SD (%)	RSD (%)
AP	10	96.5	97.7 ± 1.32	1.35
	100	97.4		
	1000	99.1		
DIAP	10	96.2	97.8 ± 1.44	1.47
	100	98.2		
	1000	99		
Markers	Recovery by HPLC assay ($n = 3$)			
	Amount added ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	Mean \pm SD (%)	RSD (%)
AP	10	98.1	99.1 ± 0.87	0.88
	100	99.3		
	1000	99.8		
DIAP	10	97.2	98.1 ± 1.02	1.04
	100	97.9		
	1000	99.2		



Gambar 11.4. Profil HPLC: (a) Profil Kromatogram Ekstrak Metanol; (b) Kromatogram Ekstrak Air. Kolom: Lichrosorb RP-18 (250 x 4,6 mm, ukuran partikel 10 mm); eluen: metanol – air (pH 2.8 dengan asam fosfat, 6:4, v/v); deteksi: 210 nm; laju aliran: 1 mL/min.

D. Hasil analisa senyawa AP dan DIAP

Struktur AP dan DIAP diidentifikasi oleh membandingkan data spektral UV, FTIR, NMR dan MS dengan data literatur (Matsuda et al., 1994). AP diperoleh sebagai lempeng tidak berwarna, titik lelehnya adalah 237–240 °C. Senyawa tersebut memberikan absorbansi yang kuat di UV pada 228 nm dan spektrum inframerah (IR) pada 3421 cm^{-1} (gugus hidroksil), 1727 dan 1673 cm^{-1} (α, β -unsaturated- γ -lactone), dan 905 cm^{-1} (exo-metilen). Data MS didapatkan BM dengan nilai 351 dengan rumus molekul, $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_5$. Data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa AP sesuai dengan literatur. DIAP diperoleh sebagai kristal jarum tidak berwarna, titik leleh adalah 202-204 °C. Senyawa di UV menunjukkan penyerapan yang kuat pada 250 nm. Senyawa tersebut menunjukkan spektrum IR di 3422 cm^{-1} (gugus hidroksil), 1741 dan 1640,03 cm^{-1} (α, β -unsaturated- γ -lactone), dan 883 cm^{-1} (exo-methylene). BM diperoleh dengan nilai 333 dan dengan rumus molekul $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_4$.

Rangkuman 11

Sampel *A. paniculata* dari lokasi yang berbeda memiliki kandungan senyawa aktif AP dan DIAP. Secara kualitatif, sidik jari HPTLC dan HPLC memiliki hasil yang serupa/sama dan terdapat pada semua ekstrak, dan ini memberikan indikasi bahwa semua ekstrak mempunyai senyawa identitas yang sama. Metode HPTLC untuk penentuan kadar memberikan hasil yang akurat jika dibandingkan metode HPLC. Metodenya sederhana, sensitif dan tepat, dan mungkin berguna dalam standarisasi sediaan yang mengandung senyawa AP dan DIAP.

Tes Formatif 11

1. Senyawa penanda/ marker dari tanaman sambiloto adalah golongan senyawa
 - A. Alkaloid
 - B. Terpen
 - C. Flavonoid
 - D. Fenol
 - E. Saponin
2. Pada hasil identifikasi kandungan senyawa pada tanaman sambiloto dari beberapa daerah ternyata memberikan hasil mempunyai kesamaan pada profil sidik jari. Sehingga bisa digunakan sebagai penanda/marker untuk tanaman ini. Penanda yang utama adalah
 - A. Andrographolid
 - B. Neoandrographolide
 - C. Deoxyandrographolide
 - D. 5,7,20,30-tetrametoksiflavanon
 - E. 5-hidroksi-7,20,30-trimetoksiflavanon
3. Pada identifikasi senyawa andrographolide dengan metode HPTLC, senyawa ini terdeteksi pada Rf
 - A. 0,23
 - B. 0,43
 - C. 0,53
 - D. 0,63
 - E. 0,73
4. Presisi metode pada HPTLC dilakukan dengan cara....
 - A. Melakukan scanning sebanyak 3 kali untuk tiap sampel.
 - B. Membandingkan nilai Rf antara sampel dengan standar.
 - C. Mengulang sebanyak 6 kali pada 1 hari dan dilakukan selama 5 hari.
 - D. Menggunakan standar andrographolide dan didehydroandrographolide.
 - E. Mengkonversi luas area menjadi konsentrasi.
5. Untuk mengidentifikasi senyawa standar yang berhasil di isolasi, alat yang digunakan untuk identifikasi senyawa diantaranya adalah sebagai berikut, **kecuali....**
 - A. NMR
 - B. MS

- C. IR
- D. UV
- E. HPTLC

Jawaban Tes Formatif 11

- 1. B
- 2. A
- 3. B
- 4. C
- 5. E

MATERI 12: STANDARDISASI SEDIAAN OBAT BAHAN ALAM

Metode Pembelajaran	Estimasi Waktu	CPMK
<ul style="list-style-type: none"> • Kuliah Interaktif • Diskusi • <i>Question Based Learning</i> 	150 menit	<ul style="list-style-type: none"> • Perkenalan • Penjelasan • Perkuliahan & Kontrak Perkuliahan

12.1. Pendahuluan

Standardisasi adalah serangkaian parameter, prosedur dan cara pengukuran yang hasilnya merupakan unsur-unsur terkait paradigma mutu kefarmasian, mutu artian memenuhi syarat standar (kimia, biologi, dan farmasi), termasuk jaminan (batas-batas) stabilitas sebagai produk kefarmasian umumnya.

Persyaratan mutu ekstrak terdiri dari berbagai parameter standard umum dan parameter standard spesifik. Pengertian standardisasi juga berarti proses menjamin bahwa produk akhir obat (obat, ekstrak atau produk ekstrak) mempunyai nilai parameter tertentu yang konstan dan ditetapkan (dirancang dalam formula) terlebih dahulu.

Parameter non spesifik berfokus pada aspek kimia, mikrobiologi, dan fisik yang akan mempengaruhi keamanan konsumen dan stabilitas, meliputi: kadar air, cemaran logam berat, aflatoksin, dll. Parameter spesifik berfokus pada senyawa atau golongan senyawa yang bertanggungjawab terhadap aktivitas farmakologis. Analisis kimia yang melibatkan ditujukan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif terhadap senyawa aktif.

12.2. Parameter Non Spesifik Ekstrak antara lain:

A. Bobot jenis

Parameter bobot jenis yaitu masa persatuan volume pada suhu kamar tertentu (25 °C) yang ditentukan dengan alat khusus piknometer atau alat lainnya. Tujuannya yaitu memberikan batasan tentang besarnya massa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang.

B. Susut pengeringan

Susut pengeringan merupakan pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105 °C selama 30 menit atau sampai konstan, yang dinyatakan dalam persen. Dalam hal khusus (jika bahan tidak mengandung minyak menguap/atsiri dan sisa pelarut organik) identik dengan kadar air, yaitu kandungan air karena berada di atmosfer/lingkungan udara terbuka. Tujuannya yaitu memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan.

C. Kadar air

Parameter kadar air yaitu pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan, dilakukan dengan cara yang tepat diantara cara titrasi, destilasi, atau gravimetri. Tujuannya yaitu memberikan batasan maksimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan.

Salah satu metode penetapan kadar air adalah metode destilasi toluene dengan cara sebagai berikut :

1. Jenuhkan toluen dengan air, kocok, diamkan dan buang lapisan airnya
2. Sebanyak 10 g ekstrak masukkan ke dalam labu alas bulat dan tambahkan toluen yg telah jenuh air
3. Labu dipanaskan selama 100 menit, setelah toluen mendidih, penyulingan diatur 2 tetes/detik, lalu 4 tetes/detik. Setelah semua toluen mendidih, dilanjutkan pemanasan selama 5 menit. Kemudian, dinginkan tabung sampai temperatur kamar.
4. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dan dihitung kadar air dalam persen terhadap berat ekstrak awal. Replikasi 3 kali.

D. Kadar abu

Memanaskan ekstrak pada temperatur tertentu dimana senyawa organik dan turunannya menguap, sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik. Tujuan : memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak untuk mengetahui kemurnian ekstrak dan kontaminasi.

E. Sisa pelarut

Adalah penentuan kandungan sisa pelarut tertentu yang mungkin terdapat dalam ekstrak. Tujuan : memberikan jaminan bahwa selama proses tidak meninggalkan sisa pelarut yang seharusnya tidak boleh ada. Berguna dalam penyiapan ekstrak dan kelayakan ekstrak untuk formulasi. Batas : < 1% untuk etanol.

F. Cemar Mikroba dan Aflatoksin

Adalah penentuan adanya mikroba patogen secara analisis mikrobiologi. Tujuan : memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak boleh mengandung mikroba patogen dan tidak mengandung mikroba nonpatogen melebihi batas yang ditetapkan.

G. Cemar Logam berat

Adalah penentuan kandungan logam berat dalam suatu ekstrak, sehingga dapat memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung logam berat tertentu (Hg, Pb, Cd, dll) melebihi batas yang telah ditetapkan.

12.3. Parameter Spesifik Ekstrak

Beberapa contoh uji spesifik ekstrak:

A. Identitas

Meliputi: deskripsi tata nama, nama ekstrak, bagian tanaman yg digunakan, dan nama Indonesia tanaman .

B. Organoleptis

Penggunaan panca indera dalam mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa guna pengenalan awal yang sederhana.

C. Senyawa terlarut dalam pelarut tertentu

Melarutkan ekstrak dengan pelarut (alkohol/air) untuk ditentukan. Jumlah larutan yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetri. Dalam hal tertentu dapat diukur senyawa terlarut dalam pelarut lain misal pelarut lain yg digunakan: heksan, diklormetan, methanol. Tujuannya: memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan.

D. Uji Kandungan Kimia Ekstrak

Pola kromatogram bertujuan memberikan gambaran awal komposisi kandungan kimia berdasarkan pola kromatogram yang khas (analisis finger print). Metode yang biasa digunakan : KLT atau HPLC suatu kandungan kimia baik berupa senyawa identitas (marker senyawa kimia utama, maupun kandungan kimia lainnya, ditetapkan kadar kandungan kimianya secara instrumental dengan metode kromatografi. Metode yg digunakan : densitometri, HPLC, atau GC.

Latihan 12

1. Kapan susut pengeringan ekstrak dikatakan sama dengan kadar air ?
2. Jelaskan cara mengukur kadar air dengan metode destilasi!
3. Jelaskan cara penetapan bobot jenis suatu ekstrak!
4. Sebutkan 3 parameter uji spesifik dan non spesifik!
5. Jelaskan tujuan dilakukannya standarisasi suatu obat bahan alam!

Jawaban Latihan 12

1. Jawaban :
Susut pengeringan ekstrak dikatakan sama dengan kadar air jika dalam ekstrak tersebut tidak mengandung minyak menguap.
2. Jawaban :
Penetapan Kadar Air dengan Destilasi toluene
 1. Jenuhkan toluen dengan air, kocok, diamkan dan buang lapisan airnya sebanyak 10 g ekstrak masukkan ke dalam labu alas bulat dan tambahkan toluen yg telah jenuh air
 2. Labu dipanaskan selama 100 menit, setelah toluen mendidih, penyulingan diatur 2 tetes/detik, lalu 4 tetes/detik. Setelah semua toluen mendidih, dilanjutkan pemanasan selama 5 menit. Kemudian, dinginkan tabung sampai temperatur kamar.
 3. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dan dihitung kadar air dalam persen thd berat ekstrak awal. Replikasi 3 kali.
3. Jawaban :
Penetapan bobot jenis ekstrak
 - Piknometer bersih dan kering ditimbang (W_0). Kemudian kalibrasi dg menetapkan bobot piknometer dan bobot air yg baru dididihkan pada suhu $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ kemudian ditimbang (W_1).
 - Ekstrak cair diatur suhunya $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lalu masukkan ke dalam piknometer kosong, buang kelebihan ekstrak, atur suhu piknometer yg berisi ekstrak pada $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ kemudian timbang (W_2).
 - Bobot jenis = $d = (W_2 - W_0) / (W_1 - W_0)$
4. Jawaban :
Parameter non spesifik ekstrak : Bobot jenis, kadar air, kadar abu
Parameter spesifik : organoleptis, senyawa terlarut dalam pelarut tertentu, pola kromatogram

5. Jawaban :

Bertujuan menjamin bahan baku tetap memenuhi mutu, khasiat, keamanan sehingga sediaan memiliki nilai tetap dan reproduisibel.

Rangkuman 12

Persyaratan mutu ekstrak terdiri dari berbagai parameter standard umum dan parameter standard spesifik. Pengertian standardisasi juga berarti proses menjamin bahwa produk akhir obat (obat, ekstrak atau produk ekstrak) mempunyai nilai parameter tertentu yang konstan dan ditetapkan (dirancang dalam formula) terlebih dahulu.

Parameter non spesifik berfokus pada aspek kimia, mikrobiologi, dan fisis yang akan mempengaruhi keamanan konsumen dan stabilitas, meliputi : kadar air, cemaran logam berat, aflatoxin, dll. Parameter spesifik berfokus pada senyawa atau golongan senyawa yang bertanggungjawab terhadap aktivitas farmakologis. Analisis kimia yang dilibatkan ditujukan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif terhadap senyawa aktif.

Tes Formatif 12

1. Suatu industri farmasi melakukan uji keseragaman bobot terhadap sediaan tablet yang diproduksinya. Uji tersebut dilakukan dalam rangka pemenuhan
 - A. Standarisasi simplisia
 - B. Standarisasi ekstrak
 - C. Standarisasi sediaan
 - D. Standarisasi bahan baku
 - E. Standarisasi zat aktif
2. Kadar air yang terkandung dalam simplisia bisa diukur dengan beberapa metode pengukuran. Berikut yang bukan merupakan metode pengukuran kadar air simplisia....
 - A. Gravimetri
 - B. Destilasi toluene
 - C. Destilasi xilene
 - D. Titrasi Karl Fischer
 - E. Spektrofotometri serapan atom
3. Kandungan logam berat pada ekstrak maupun sediaan obat tradisional perlu ditetapkan karena berbahaya, salah satu diantaranya adalah logam berat ada yang dapat menyebabkan kerusakan pada otak janin sehingga mengakibatkan kecacatan pada bayi. Logam berat tersebut adalah....
 - A. Arsen
 - B. Timbal
 - C. Timah
 - D. Cadmium
 - E. Merkuri

4. Obat tradisional yang bermutu hanya dapat diperoleh bila bahan bakunya juga bermutu. Untuk menetapkan mutu perlu standarisasi. Tujuan standarisasi ini adalah
 - A. Mempertahankan konsistensi kandungan senyawa aktif
 - B. Mengukur parameter spesifik
 - C. Mengukur parameter non spesifik
 - D. Mengetahui susut pengeringan
 - E. Mengetahui kadar air

5. Tingginya angka cemaran mikroba berupa ALT dan AKK menunjukkan proses pembuatan obat tradisional tidak menerapkan prinsip
 - A. CPOB
 - B. CUKB
 - C. GCP
 - D. GLP
 - E. CPOTB

DAFTAR PUSTAKA

1. Agoes, G. (2007). *Teknologi Bahan Alam*. Bandung : Penerbit ITB.
2. Ali Khoddami, Meredith A. Wilkes, Thomas H. Roberts, (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds, *Molecules*, 2013, 18, 2328-2375
3. Aktsar Roskiana Ahmad1, Juwita, Siti Afrianty Daniya Ratulangi, Abdul Malik. (2015) Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Metanol Buah dan Daun Patikala (*Etlintera elatior* (Jack) R.M.SM), *PSR*, 2015, 2:10.
4. Akowuah G. A. (2006). HPLC and HPTLC densitometric determination of andrographolides and antioxidant potential of *Andrographis paniculata*, *Journal of Food Composition And Analysis*, 118-126.
5. Anonim, (2013), *Guidelines On Good Agricultural And Collection Practices (GACP) For Medicinal Plants*, Jenewa WHO.
6. Aried Eriadi, Rahimatul Uthia, R. N. (2017). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) Terhadap Kadar Glukosa Darah dan Histopatologi Pankreas Mencit Putih Jantan yang Diinduksi Aloksan. *Jurnal Farmasi Higea*, 9(2), 127–139.
7. AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. *Aoac*, February, 3172. https://www.techstreet.com/standards/official-methods-of-analysis-of-aoc-international-20th-edition-2016?product_id=1937367
8. Aziz, S., Rahayu, V., & Teruna, H. Y. (2011). *Standardisasi Bahan Obat Alam* (1st ed.). Yogyakarta: Graha Ilmu.
9. Blatt, S., dan Wagner, H. (1996). *Plant Drug Analysis _ A Thin Layer Chromatography Atlas, 2nd Ed.* Munich: Springer. ISBN: 978-3-642-00573-2.
10. Box, J.D. (1983). Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.* 17, 511–525.
11. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. (2004). *Monografi Ekstrak Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
12. BPOM. (2005). *Standardisasi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia, Salah Satu Tahapan Penting Dalam Pengembangan Obat Asli Indonesia* (Vo. 6). Jakarta : Badan POM RI.
13. BPOM. (2019). *Peraturan BPOM Nomor 32 Tahun 2019 Tentang Persyaratan Keamanan dan Mutu Obat Tradisional*. Jakarta : Badan POM RI.
14. Chirinos, R.; Betalleluz-Pallardel, I.; Huamán, A.; Arbizu, C.; Pedreschi, R.; Campos, D. (2009). HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chem.* 113, 1243–1251.
15. Christiana, I., Evacuasiyany, E., & Hidayat, M. (2012). The Analgetic Effect of Kayu Rapat Bark Infusion (*Parameria Laevigata* (Juss.) Moldenke) on Male Mice Treated with Thermal Induction. *Jurnal Medika Planta*, 2(1), 246981.
16. Chu, C., Xia, L., Bai, L.-P., Li, Q., Li, P., Chen, H.-B., & Zhao, Z.-Z. (2009). Authentication of the 31 species of toxic and potent Chinese Materia Medica by light microscopy, part 3: Two species of T/PCMM from flowers and their common adulterants. *Microscopy Research and Technique*, 72(6), 454–463. <https://doi.org/10.1002/jemt.20693>
17. Chua, L.S. (2014). Review on Liver Inflammation and Antiinflammatory Activity of *Andrographis paniculata* for Hepatoprotection. *Phytother. Res.* 28, 1589–1598.

18. Depkes. (1995). *Materia Medika Indonesia Ed. VI*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
19. Depkes RI. (2008). *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*. Departemen Kesehatan R.I., Jakarta
20. Deyl, Z. (1984). *New Comprehensive Biochemistry Volume 8 Separation methods*. New York, USA: Elsevier Science Publishing Co.Inc.
21. Diaz Napal, G.N.; Defago, M.; Valladares, G.; Palacios, S. (2010). Response of *Epilachna paenulata* to two flavonoids, Pinocembrin and quercetin, in a comparative study. *J. Chem. Ecol.* 36, 898–904.
22. Ditjen POM RI. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
23. Ernst, E. (2000). Adverse effects of herbal drugs in dermatology. In *British Journal of Dermatology* (Vol. 143, Issue 5). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03822.x>
24. European Medicines Agency. (2011). *Guideline on quality of herbal medicinal products 1 / traditional herbal medicinal products*. 44(March), 14–16. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/09/WC500113209.pdf
25. Fadillah Maryam, Burhanuddin Taebe, Deby Putrianti Toding. (2020). Pengukuran Parameter Spesifik Dan Non Spesifik Ekstrak Etanol Daun Matoa (*Pometia pinnata* J.R & G.Forst). *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia* 6(1): 1-12
26. Fatimawati, Billy J, Kepel, Widdhi Bhudi. (2020). Standarisasi parameter spesifik dan non spesifik ekstrak rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) sebagai obat anti bakteri. 8(1): 63-67. eBiomedik.
27. Fernandes, A.J.D.; Ferreira, M.R.A.; Randau, K.P.; De Souza, T.P.; Soares, L.A.L. (2012). Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). *Sci. World J.*, 2012, 1–7.
28. Gunawan, D. dan M. S. (2010). *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi) Jilid I*. Jakarta : Penebar Swadaya.
29. Gandjar, I. ., & Rohman, A. (2008). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
30. Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2018). *Spektroskopi Molekuler untuk Analisis Farmasi*. Yogyakarta: UGM Press.
31. Hanani, E. (2016). *Analisis Fitokimia*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
32. Hikmawanti, N. P. E., Aulia, C., dan Viransa, V. P. (2016). Kandungan Piperin Dalam Ekstrak Buah Lada Hitam dan Buah Lada Putih (*Piper nigrum* L.) yang Diekstraksi Dengan Variasi Konsentrasi Etanol Menggunakan Metode KLT-Densitometri. *Media Farmasi: Jurnal Ilmu Farmasi*, 13(2), 173–185. <https://doi.org/10.12928/mf.v13i2.7769>
33. Hikmawanti, N. P. E., Hariyanti, Nurkamalia, & Nurhidayah, S. (2019). Chemical Components of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. Stem Essential Oils and Evaluation of Their Antioxidant Activities Using DPPH Method. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(3), 149–154. <https://doi.org/10.7454/psr.v6i3.4576>
34. Hikmawanti, N. P. E., Hanani, E., Sapitri, Y., dan Ningrum, W. (2020). Total phenolic content and antioxidant activity of different extracts of *Cordia sebestena* L. leaves. *Pharmacognosy Journal*, 12(6), 1311–1316. <https://doi.org/10.5530/PJ.2020.12.180>
35. Hikmawanti, N. P. E., Widiyanti, P., & Prajogo, B. (2020). In vitro anti-HIV activity of ethanol extract from gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm. f) leaves. *Infectious Disease Report*, 12(S1),

51–55.

36. Indariani, Susi, (2013), *Quality Of Herbal Medicinal Plants And Tradisional Medicine Bogor*, Institut Pertanian Bogor.
37. Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.*, 126, 1821–1835.
38. Julianto, TS. (2019). *Fitokimia : Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia*. Yogyakarta : Universitas Islam Indonesia.
39. Jain, D.C.; Gupta, M.M.; Saxena, S.; Kumar, S. J. (2000). *Pharm. Biomed. Anal.* 22, 705–709.
40. Kardela, W., Fauziah, F., & Nadia, S. (2019). Uji aktivitas fraksi ekstrak etanol daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) terhadap kadar glukosa darah dan indeks aterogenik tikus putih jantan. *Jurnal Farmasi Higea*, 11(1).
41. Kemenkes RI, (2008), *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*, Kementerian Kesehatan.
42. Kemenkes RI. (2014). *Farmakope Indonesia Edisi V Jilid I dan II*. Jakarta : Kementerian Kesehatan RI, Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan.
43. Kemenkes RI. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. Jakarta : Kementerian Kesehatan RI, Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan.
44. Kemenkes RI, (2020), *Farmakope Indonesia Edisi VI*, Kementerian Kesehatan RI.
45. Kowalski, R., & Kowalska, G. (2005). Phenolic acid contents in fruits of aubergine (*Solanum melongena* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14/55(1), 37–42.
46. Khan, I.; Khan, F.; Farooqui, A.; Ansari, I.A. (2018). Andrographolide Exhibits Anticancer Potential Against Human Colon Cancer Cells by Inducing Cell Cycle Arrest and Programmed Cell Death via Augmentation of Intracellular Reactive Oxygen Species Level. *Nutr. Cancer*. 70, 787–803.
47. Lapornik, B.; Prosek, M.; Golc, W.A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.*, 71, 214–222.
48. Li, J., Yi, T., Lai, H. S., Xue, D., Jiang, H., Peng, H. C., & Zhang, H. (2008). Application of microscopy in authentication of traditional Tibetan medicinal plant *Halenia elliptica*. *Microscopy Research and Technique*, 71(1), 11–19. <https://doi.org/10.1002/jemt.20518>
49. Liang, Z.-T., Jiang, Z.-H., Leung, K.-S.-Y., Peng, Y., & Zhao, Z.-Z. (2006). Distinguishing the medicinal herb *Oldenlandia diffusa* from similar species of the same genus using fluorescence microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 69(4), 277–282. <https://doi.org/10.1002/jemt.20312>
50. Liao, H.-C.; Chou, Y.-J.; Lin, C.-C.; Liu, S.-H.; Oswita, A.; Huang, Y.-L.; Wang, Y.-L.; Syu, J.-L.; Sun, C.-M.; Leu, C.-M.; (2019). Andrographolide and its potent derivative exhibit anticancer effects against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells by downregulating the Bcr-Abloncoprotein. *Biochem. Pharmacol.* 163,308–320.
51. Li Wenkui et al., (2014). Determination of Andrographolide in Commercial *Andrographis* (*Andrographis paniculata*) Product Using HPLC With Evaporative Light Scattering Detection, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1335-1343.
52. Lim, T. K., & Lim, T. K. (2016). *Kaempferia rotunda*. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*, 8(2), 436–442. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26065-5_19
53. Lu, W.J.; Lin, K.H.; Hsu, M.J.; Chou, D.S.; Hsiao, G.; Sheu, J.R. (2012). Suppression of NF- κ B signaling by andrographolide with a novel mechanism in human platelets: Regulatory roles of the p38 MAPK-hydroxyl radical-ERK2 cascade. *Biochem. Pharmacol.* 84, 914–924.

54. Mukherjee, P. K. (2019). Quality control and evaluation of herbal drugs: Evaluating natural products and traditional medicine. In *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs: Evaluating Natural Products and Traditional Medicine*. Elsevier.
55. Manjula, S.; Kalaiarasi, C.; Pavan, M.S.; Hathwar, V.R.; Kumaradhas, P. (2018). Charge density and electrostatic potential of hepatitis C anti-viral agent andrographolide: An experimental and theoretical study. *Acta Cryst. B*, 74, 693–704.
56. Matsuda, T., Kuroyanaga, M., Sugiyama, S., Umegara, K., Ueno, A., Nishi, K., (1994). Cell differentiation-inducing diterpenes from *Andrographis paniculata*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 42 (6), 1216–1225.
57. Mussbacher, M.; Salzmann, M.; Brostjan, C.; Hoesel, B.; Schoergenhofer, C.; Datler, H.; Hohensinner, P.; Basílio, J.; Petzelbauer, P.; Assinger, A.; (2019). Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis. *Front. Immunol.* 10, 85.
58. Mussardf Eugene. (2019). Andrographolide, A Natural Antioxidant: An Update, *MDPI*, 1-20.
59. Naczka, M. Shahidi, F. (2004). Review: Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogram*, 1054, 95–111.
60. Nugroho, A. (2017). *Buku Ajar Teknologi Bahan Alam*. Banjarmasin : Lambung Mangkurat University Press
61. Pahriyani, A., Sunaryo, H., & Kurnia, D. (2019). Aktivitas Ekstrak Daun Kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) sebagai Hepatoprotektor pada Tikus yang Terpapar Asap Rokok. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 15(1), 18–25. <https://doi.org/10.31001/jfi.v15i1.351>
62. Pandey, R.K., Skula, S.S., Vyas, A., Jain V., Jain P., and Saraf S. (2018). *Fingerprinting Analysis and Quality Control Methods of Herbal Medicines*. CRC Press.
63. Parwata, I.M. O. A, (2017), *Obat Tradisional*.
64. Purwanggono, B, Abduh, S., Nurjanah, dkk, (2009), *Pemantar Standarisasi*, (Edisi Pert), Badan Standarisasi Nasional.
65. Pereira, D.M.; Valentão, P.; Pereira, J.A.; Andrade, P.B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 2202–2211.
66. Proestos, C.; Boziaris, I.S.; Nychas, G.-J.E.; Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investing ation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem.*, 95, 664–671.
67. Rafi, M., Heryanto, R., dan Septiningsih, D.A. (2017). *Atlas Kromatografi Lapis Tipis Tumbuhan Obat Indonesia*. Penerbit IPB Press: Kota Bogor.
68. Rakholiya, H., Pandya, K., Parikh, V., Patel, P., Patel, G., & Dave, P. (2013). a Comprehensive Standardization Study of a Poly Herbal Formulation: Ural Tablet. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(6), 145–149. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04632>
69. *Remington 21st Edition The Science and Practice Of Pharmacy*. (2005).
70. Rini Prastiwi, Berna Elya, Muhammad Hanafi, Yesi Desmiaty, Rani Sauriasari, (2020). The Antioxidant Activity of *Sterculia stipulata* Korth Woods and Leaves by FRAP Method, *Pharmacognosy journal*, 12(2): 236-239
71. Ruzin, B. S. E. (2000). Books Microtechnique Plant microtechnique and microscopy Toxic plants Toxic plants : dangerous to humans and. *New Phytology*, 148, 57–58.
72. Saifuddin, A., Rahayu, V., dan Teruna, H., Y, (2011). *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Graha Ilmu : Yogyakarta

73. Saxena, S.; Jain, D.C.; Gupta, M.M.; Bhakuni, R.S.; Mishra, H.O.; Sharma, R.P. (2000). *Phytochem Anal.*, 11, 34–36.
74. Seema Sharma and Yash Pal Sharma. (2018). Comparison of different extraction methods and HPLC method development for the quantification of andrographolide from *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. ex Nees, *Ann. Phytomed*, 20-129.
75. Singha, P.K.; Roy, S.; Dey, S. (2007). Protective activity of andrographolide and arabinogalactan proteins from *Andrographis paniculata* Nees. against ethanol-induced toxicity in mice. *J. Ethnopharmacol*, 111, 13–21.
76. Suartha, I. N., Swantara, I. M. D., & Rita, W. S. (2016). Ekstrak Etanol dan Fraksi Heksan Buah Pare (*Momordica charantia*) Sebagai Penurun Kadar Glukosa Darah Tikus Diabetes (Ethanol Extract And Hexane Fraction Of *Momordica Charantia* Decrease Blood Glucose Level Of Diabetic Rat). *Jurnal Veteriner*, 17(1), 30–36. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.1.30>
77. Tan, W.S.D.; Liao, W.; Zhou, S.; Wong, W.S.F.(2017). Is there a future for andrographolide to be an anti-inflammatory drug? Deciphering its major mechanisms of action. *Biochem. Pharmacol.*, 139, 71–81.
78. *Tiga Standarisasi Obat Herbal*. (2021). Retrieved February 17, 2021, from https://www.jamudigital.com/berita?id=Tiga_Standarisasi_Obat_Herbal
79. WHO. (2017). WHO guidelines for selecting marker substances of herbal. *WHO Technical Report Series, No. 1003*, 71–86. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/Js23240en/>
80. World Health Organization. (2011). WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. *World Health Organization Technical Report Series*, 961.
81. Yuri Pratiwi Utami, Burhanuddin Taebe, Fatmawati. (2016). Standardisasi Parameter Spesifik Dan Non Spesifik Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus alba* L.) Asal Kabupaten Soppeng Provinsi Sulawesi Selatan. *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*, 1(2): pp 48-52
82. Yuslianti, E. R., Bachtiar, B. M., Suniarti, D. F., & Sudjiatmo, A. B. (2016). Standardisasi Farmasitikal Bahan Alam Menuju Fitofarmaka untuk Pengembangan Obat Tradisional Indonesia. *Dentika Dental Journal*, 19(2), 179–185
83. Wintachai, P.; Kaur, P.; Lee, R.C.H.; Ramphan, S.; Kuadkitkan, A.; Wikan, N.; Ubol, S.; Roytrakul, S.; Chu, J.J.H.; Smith, D.R. (2015). Activity of andrographolide against chikungunya virus infection. *Sci. Rep*, 5, 14179.
84. Xu, Y.; Tang, D.; Wang, J.; Wei, H.; Gao, J. (2019). Neuroprotection of Andrographolide Against Microglia-Mediated Inflammatory Injury and Oxidative Damage in PC12 Neurons. *Neurochem. Res*.