

LAPORAN PENELITIAN TAHUN KE-1

Judul Penelitian yang Diusulkan

PENGEMBANGAN FITOFARMAKA UNTUK ANTIKANKER KOLON DENGAN BASIS FORMULA CAMPURAN EKSTRAK TERPURIFIKASI DARI RIMPANG KENCUR (*KAEMPFERIA GALANGA* LINN) DAN HERBA SAMBILOTO (*ANDROGRAPHIS PANICULATA* NESS)

PROGRAM INSENTIF RISET TERAPAN

No. Pendaftaran On-Line : RT-2011-0164

Fokus Bidang Prioritas

2. *Teknologi Kesehatan dan Obat*

Kode Produk Target

2.04. *Obat herbal dari tanaman Temulawak, Jahe, Kencur, Pegagan dan Sambiloto untuk pengobatan sindrom metabolit dan penyakit lainnya*

Kode Kegiatan

2.04.17. *Uji Klinis terbatas sediaan obat herbal terstandar baik tunggal maupun campuran tanaman obat : Temulawak, Jahe, Kencur, Pegagan dan Sambiloto , di rumah sakit atau puskesmas . Indikasi sindrome metabolik dan penyakit lainnya*

Peneliti Utama

Prof.Dr.Sukardiman, Apt.,MS.

Anggota:

Dra.Retno Sari,Apt.,MSc

Dr.Hanni Plumeriastuti,drh.,MKes

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Universitas Airlangga

Kampus C Mulyorejo Surabaya ,

Telp 5995246, Fax 5962066

Agustus , 2010

LAPORAN PENELITIAN TAHUN KE-1

Judul Penelitian yang Diusulkan

PENGEMBANGAN FITOFARMAKA UNTUK ANTIKANKER KOLON DENGAN BASIS FORMULA CAMPURAN EKSTRAK TERPURIKASI DARI RIMPANG KENCUR (*KAEMPFERIA GALANGA* LINN) DAN HERBA SAMBILOTO (*ANDROGRAPHIS PANICULATA* NESS)

PROGRAM INSENTIF RISET TERAPAN

No. Pendaftaran On-Line : RT-2011-0164

Fokus Bidang Prioritas

2. *Teknologi Kesehatan dan Obat*

Kode Produk Target

2.04. Obat herbal dari tanaman Temulawak, Jahe, Kencur, Pegagan dan Sambiloto untuk pengobatan sindrom metabolit dan penyakit lainnya

Kode Kegiatan

2.04.17. Uji Klinis terbatas sediaan obat herbal terstandar baik tunggal maupun campuran tanaman obat : Temulawak, Jahe, Kencur, Pegagan dan Sambiloto , di rumah sakit atau puskesmas . Indikasi sindrome metabolik dan penyakit lainnya

Peneliti Utama

Prof.Dr.Sukardiman, Apt.,MS.

Anggota:

Dra.Retno Sari,Apt.,MSc

Dr.Hanni Plumeriastuti,drh.,MKes

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Universitas Airlangga

Kampus C Mulyorejo Surabaya ,

Telp 5995246, Fax 5962066

Agustus , 2010

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Lembar Pengesahan

Judul Penelitian :

PENGEMBANGAN FITOFARMAKA UNTUK ANTIKANKER KOLON DENGAN BASIS FORMULA CAMPURAN EKSTRAK TERPURIFIKASI DARI RIMPANG KENCUR (*KAEMPFERIA GALANGA LINN*) DAN HERBA SAMBILOTO (*ANDROGRAPHIS PANICULATA NESS*)

Fokus Bidang Prioritas : Teknologi kesehatan dan obat
 Kode Produk Target : Obat herbal dari tanaman Temulawak, Jahe, Kencur, Pegagan dan Sambiloto untuk pengobatan sindrom metabolit dan penyakit lainnya
 Kode Kegiatan : Uji Klinis terbatas sediaan obat herbal terstandar baik tunggal maupun campuran tanaman obat : Temulawak, Jahe, Kencur, Pegagan dan Sambiloto , di rumah sakit atau puskesmas . Indikasi sindrome metabolik dan penyakit lainnya
 Lokasi Penelitian : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya
 Penelitian Tahun Ke : 1

Keterangan Lembaga Pelaksana / Pengelola Penelitian	
A. Lembaga Pelaksana Penelitian	
Nama Peneliti Utama	Prof.Dr.Sukardiman,Apt.,MS.
Nama Lembaga / Institusi	Departemen Farmakognosi - Fitokimia Fakultas Farmasi
Unit Organisasi	Universitas Airlangga
Alamat	Jl.Darmawangsa Dalam Surabaya
Telepone / Faksimile / e-mail	5033710 / 5020514 / mahan_ht@yahoo.com
B. Lembaga lain yang terlibat	
Nama Pimpinan	dr.Arijanto Jonosewojo, SpD
Nama Lembaga / Institusi	Poli Obat Tradisional
Unit Organisasi	RSUD Dr.Soetomo
Alamat	Jl. Prof.Dr.Mostopo, Surabaya
Telepone / Faksimile / e-mail	031-5020251 / 031 - 5022472 fk_unair@geocities.com

Jangka Waktu Kegiatan : 3 tahun
 Biaya Tahun-1 : Rp 250.000.000,-
 Biaya Tahun-2 : Rp 241.075.000,-
 Total Biaya : Rp 500.000.000,-

Rekapitulasi Biaya Tahun yang Diusulkan :

No	Uraian	Jumlah (Rp)
1	Gaji dan Upah	Rp. 78.500.000,-
2	Bahan Habis Pakai	Rp.161.500.000,-
3	Perjalanan	-
4	Lain-lain	Rp. 10.000.000,-
Jumlah biaya tahun yang diusulkan		Rp. 250.000.000,-



Ketua
LPPM
Universitas Airlangga Surabaya

Dr. Djoko Agus Purwanto,Apt.,MSi
NIP : 19590805 198701 1 001

Peneliti Utama

Prof.Dr.Sukardiman,Apt.,MS.
NIP : 19630109 198810 1 001

KATA PENGANTAR

Pertama-tama kami panjatkan puji dan puja syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, yang telah memberikan taufik dan hidayahNya sehingga kami tim peneliti dapat menyelesaikan penelitian tahun pertama dengan judul :

Pengembangan Fitofarmaka untuk Antikanker Kolon dengan Basis Campuran Ekstrak Terpurifikasi dari Rimpan Kencur (*Kaempferia galanga*) Dan Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

Pada kesempatan ini kami sampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Kementrian Negara Riset dan Teknologi RI dan Lembaga Penelitian Indonesia yang telah memberikan dana penelitian .
2. Rektor Universitas Airlangga Surabaya.
3. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya.
4. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.
5. Kepala Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu UGM Yogyakarta.
6. Semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

Kami menyadari bahwa hasil laporan penelitian ini tentunya masih belum sempurna , namun demikian kami berharap dapat bermanfaat bagi para pembaca. Hal ini sebagai upaya pendayagunaan biodiversitas alam hayati Indonesia khususnya untuk pencarian bahan bioaktif tanaman yang berkhasiat antikanker.

Surabaya, November 2010

Tim Peneliti
Prof. Dr Sukardiman,Apt,MS
Retno Sari, Dra.,Apt.,MSc
Dr. Hanni Plumeriastuti,drh,MKes
Sujarwo, Teknisi
Lismo, Teknisi
Mafud Afandi, Teknisi

Pengembangan Fitofarmaka untuk Antikanker Kolon dengan Basis Campuran Ekstrak Terpurifikasi dari Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga*) Dan Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

Sukardiman*, Retno Sari*, Hanni Plumeriastuti**

*Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

**Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Tujuan penelitian ini adalah pengembangan produk fitofarmaka campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) sebagai obat fitofarmaka antikanker kolon.

Metodologi dari penelitian ini adalah pengumpulan bahan uji, standarisasi simplisia, pembuatan ekstrak terpurifikasi kencur dengan senyawa marker etil-parametoksinamat (EPMS) dan ekstrak terpurifikasi sambiloto dengan senyawa markernya andrografolid, standarisasi ekstrak terpurifikasi, uji antikanker secara in vitro dengan sel kanker kolon WiDr, desain formulasi, studi bioavailabilitas dari kapsul, uji toksisitas kapsul campuran ekstrak terpurifikasi kencur dan sambiloto, yang meliputi toksisitas akut, sub akut, teratogenik serta uji aktivitas antikanker secara in vivo pada kanker kolon mencit hasil induksi DMBA dan uji klinik terbatas pada pasien kanker kolon di RSUD Dr Sutomo Surabaya.

Hasil penelitian tahun pertama menunjukkan bahwa sampel simplisia herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan rimpang kencur (*Kaempferia pandurata* Roxb) berdasarkan penentuan parameter spesifik dan non spesifik maka kedua sampel simplisia memenuhi syarat Materia Medika Indonesia. Fraksinasi diterpen lakton dan fraksi EPMS telah ditemukan metode terpilih, dengan kadar andrografolid 89% dari fraksi diterpen lakton dan kadar EPMS 24% dari fraksi EPMS. Campuran 1:1 antara fraksi diterpen lakton dan fraksi EPMS memiliki aktivitas antikanker secara in vitro terhadap sel kolon Widr yang diinkubasi 48 jam.

Keywords : Antikanker, Ekstrak terpurifikasi, sambiloto, kencur

DAFTAR ISI



HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
ABSTRAK.....	vi
DAFTAR ISI	vii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
BAB III BAHAN DAN METODE PENELITIAN	42
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	45
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	115
DAFTAR PUSTAKA	116

**BAB I
PENDAHULUAN**

M I L I K
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1.1. Latar Belakang

Menurut data dari *American Cancer Society* (ACS), kanker adalah penyebab kematian kedua di Amerika Serikat dengan insiden rata-rata sebesar 2.000 orang per 100.000 penduduk. Serta diperkirakan insiden kanker di Amerika Serikat pada tahun 2007 adalah sebesar 1.440.920 dengan tingkat kematian sebesar 559.650 (Jemal *et al.*, 2007). Lebih dari 70% kematian yang dikarenakan kanker terdapat di negara dengan pendapatan rendah dan menengah, dan bahkan pada negara berkembang masih tinggi. Terjadi peningkatan angka kematian akibat kanker sebesar 30% di negara berkembang (Mathers *et al.*, 2001).

Kanker merupakan suatu penyakit sel yang ditandai dengan pergeseran pada mekanisme kontrol yang mengatur pertahanan, proliferasi dan diferensiasi sel. Sel - sel yang mengalami perubahan tadi berkembang dengan cepat dan membentuk tumor lokal yang dapat menekan atau menyerang struktur jaringan normal di sekitarnya (Chu & Sartorelli, 2007). Istilah kanker sebenarnya digunakan untuk menyebut neoplasma ganas. Neoplasma merupakan kumpulan dari sel kanker yang mengalami perubahan genetik sehingga mengalami dediferensiasi dan invasif terhadap jaringan sekitar (Frizzel, 2001). Kasus kanker yang paling sering ditemui antara lain adalah kanker paru, prostat, payudara dan kolorektal (Balmer *et al.*, 2006).

Kanker kolorektal adalah kanker yang primer berasal dari kolon dan atau rektum. Secara global kanker kolorektal merupakan penyakit keganasan terbanyak urutan ketiga pada wanita dan keempat pada pria, tiap tahunnya dapat diperkirakan terdapat 800.000 kasus baru. Insiden pada pria sedikit lebih banyak dibanding pada wanita. Kanker ini banyak dijumpai di negara industri, sedangkan di negara berkembang insidennya cenderung meningkat (Adi, 2007). Di Indonesia kanker kolorektal termasuk penyakit keganasan saluran cerna yang paling banyak dijumpai. Kanker kolorektal termasuk juga dalam 10 jenis kanker terbanyak dan menempati urutan ke 6 dari penyakit keganasan yang ada (Sutadi, 2003).

Munculnya kanker kolorektal diperkirakan akibat mutasi genetik, perubahan epigenetik, dan instabilitas genomik yang memungkinkan tumbuhnya sel kanker, fungsi inhibisi tidak bekerja, apoptosis menurun dan replikasi, angiogenesis, serta proliferasi menjadi tidak terkendali. Patogenesis kanker kolorektal melibatkan pula faktor lingkungan, di antaranya ialah pola makan yang berinteraksi dengan perubahan genetik tersebut (Adi, 2007).

Terdapat beberapa faktor risiko timbulnya kanker kolorektal, yakni umur, polip adenoma, riwayat keluarga kanker kolon, IBD (*inflammatory bowel disease*) (Adi, 2007; Bresalier, 2002) riwayat kanker indung telur, rahim atau payudara, riwayat *Chron's colitis*, obesitas, merokok, gaya hidup yang tidak sehat (Young, 2003; Medina & Davis, 2006) serta konsumsi lemak dan daging yang berlebihan (Boyle & Langman, 2001; Chao *et al.*, 2005).

Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain pembedahan, radiasi, kemoterapi, endokrinopati, imunoterapi, dan terapi hormon (Diyah & Hardjono, 2000; Frizzel, 2001). Obat anti kanker atau kemoterapi yang ideal adalah obat yang mampu membunuh sel kanker tanpa membahayakan sel normal. Sampai sekarang belum dapat ditemukan obat antikanker yang dapat memenuhi kriteria tersebut diatas disamping itu dilaporkan adanya beberapa jenis kanker yang resisten terhadap obat antikanker. Sehingga dewasa ini telah dilakukan usaha-usaha penelitian terhadap pencarian bahan obat antikanker yang lebih selektif yaitu melalui penapisan ataupun isolasi bahan obat dari tanaman, desain rasional senyawa obat baru ataupun penggunaan terapi gen (Chu & Sartorelli, 2007). Oleh karena itu penelitian dan pencarian obat baru khususnya yang berasal dari bahan alam atau tanaman obat terus dikembangkan, baik dalam bentuk obat herbal terstandar (OHT) atau obat fitofarmaka. Kombinasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) banyak digunakan secara tradisional sebagai obat antikanker.

Seiring dengan itu ternyata data ilmiah tentang penelitian antikanker dari kedua tanaman tersebut baik secara *in vitro* maupun *in vivo* sudah cukup lengkap, di mana telah diketahui kandungan etil-parametoksinamat (EPMS) dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan kandungan andrografolida dari sambiloto sebagai senyawa bioaktifnya. Senyawa andrografolida dari sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) menunjukkan aktivitas antikanker secara *in vitro* terhadap sel kanker kolon HT-29 serta menghambat kanker kolon mencit hasil induksi DMBA secara *in vivo* (Matsuda, 1994; Ganguly *et al.*, 2000; Sukardiman, 2003; Kumar, 2004; Satyanarayana *et al.*, 2005). Andrografolida juga memiliki aktivitas antikanker secara *in vivo* pada kanker fibrosarcoma mencit hasil induksi dengan benzopirena dimana dosis 20 mg/kg BB memiliki aktivitas persen hambatan 71,04 %, dosis 40 mg/kg BB aktivitas hambatan sebesar 45 % sedangkan pada dosis 40 mg/kgBB memiliki aktivitas hambatan sebesar 78,15% (Sukardiman, 2005). Hasil penelitian Sukardiman (1999-2000) tersebut juga telah diketahui bahwa senyawa andrografolida (*Andrographis paniculata* Nees) dapat menghambat enzim DNA Topoisomerase sel kanker payudara manusia, dimana enzim DNA Topoisomerase mempunyai fungsi yang penting dalam proses intraseluler, yaitu berperan dalam proses replikasi, transkripsi, rekombinasi DNA dan proses proliferasi dari sel kanker. Dengan dihambatnya aktivitas enzim DNA Topoisomerase oleh senyawa inhibitor, maka proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Sehingga akan terbentuk *Protein Linked DNA Breaks* (PLDB), akibatnya terjadi fragmentasi/kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh terhadap proses didalam sel khususnya proses replikasi sel yang diakhiri dengan kematian sel kanker secara apoptosis. Demikian juga kurkumin mampu menginduksi kematian apoptosis dari sel kanker payudara, dengan melalui jalur penurunan level protein Bcl-2 dan kenaikan p53 serta Bax, hal ini ada kemungkinan berhubungan dengan penghambatan terhadap COX (Khar, *et al.*, 1999). Keuntungan penggunaan senyawa antikanker yang memiliki mekanisme kematian secara apoptosis, maka dalam pemakaian klinik nanti diharapkan akan tidak menimbulkan efek samping yang besar dan selain memiliki aktivitas antikanker juga memiliki aktivitas kemopreventif.

Senyawa etil-parametoksinamat (EPMS) menunjukkan aktivitas antioksidan, antikanker (Xue *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 1993) dan antiinflamasi dengan (Haniastuti dkk, 2003) dengan menghambat enzim siklooksigenase-2 (COX-2). Dimana pada kanker kolon terjadi peningkatan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) yang berperan pada proses proliferasi sel, sehingga campuran ekstrak terpurifikasi dari kencur dan sambiloto sangat potensial untuk dikembangkan

menjadi sediaan fitofarmaka untuk antikanker kolon , dengan menghambat proliferasi sel kanker melalui mekanisme hambatan siklooksigenase-2 (COX-2).

Ekstrak terpurifikasi adalah hasil proses fraksinasi dari crude ekstrak dengan metode partisi dengan pelarut yang sesuai sehingga akan diperoleh fraksi aktif dengan konsentrasi senyawa bioaktif yang lebih tinggi dan diharapkan memiliki aktivitas yang lebih poten. Ekstrak terpurifikasi dari sambiloto adalah fraksi diterpen lakton dengan kandungan utama andrografolida, sedangkan ekstrak terpurifikasi dari kencur adalah fraksi etil-parametoksinamat (EPMS). Obat fitofarmaka adalah sediaan obat bahan alam yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinik dan uji klinik, di mana bahan baku dan produk jadinya telah terstandarisasi. Sebagai upaya meningkatkan status obat tradisional dari campuran kencur dan sambiloto menjadi sediaan fitofarmaka maka sediaan tersebut harus dibuat dalam bentuk ekstrak terpurifikasi yang tersandar , serta memenuhi beberapa persyaratan antara lain : (1) jaminan quality (kualitas) , di mana bahan simplisia dan produk akhir harus memenuhi persyaratan tentang keajegan dari kandungan aktif (senyawa marker) , (2) jaminan safety (keamanan) , dimana produk akhir harus aman atau tidak toksik pada hewan coba yang dipersyaratkan dan (3) jaminan efficacy (manfaat), di mana produk akhir campuran kunyit dan sambiloto harus menunjukkan aktivitas antikanker pada uji praklinik dengan hewan coba, dan menunjukkan aktivitas antikanker pada uji klinik dengan manusia.

Pada penelitian ini digunakan formula kombinasi dengan alasan untuk meningkatkan potensi antikankernya, karena kedua senyawa bioaktif dari etil-parametoksinamat (EPMS) dan andrografolida memiliki aktivitas antikanker yang sama terhadap kanker kolon manusia baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Serta mekanisme antikankernya adalah dengan menginduksi apoptosis sehingga diharapkan adanya efek yang lebih poten, selektif, memiliki efek samping yang lebih kecil dan diharapkan juga penggunaan dosis pemakaiannya juga relatif lebih kecil.

Berdasarkan tinjauan state of the art review atas paten / riset terdahulu, ternyata formula kombinasi dari campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) menjadi obat fitofarmaka untuk antikanker kolon; sampai saat proposal ini ditulis belum ada penelitian sejenis serta belum ada paten yang terdaftar di Direktorat Jenderal Hak Kekayaan Intelektual - Departemen Hukum dan Hak Asasi Manusia RI. Sehingga masih terbuka untuk dilakukan usaha mengajukan paten terhadap proses fraksinasi maupun formula kombinasi dari campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur dan sambiloto.

Tujuan umum penelitian ini adalah membuat formula campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) menjadi obat fitofarmaka untuk antikanker kolon yang potensial , melalui berbagai rangkaian proses standarisasi bahan baku dan produk akhir, melakukan uji toksisita, uji praklinik dengan hewan coba serta melakukan uji klinik pada pasien penderita kanker kolon.

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan landasan ilmiah tentang pengembangan produk bahan obat yang berasal dari tanaman khususnya yang berasal dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dengan senyawa marker etil-parametoksinamat (EPMS) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) dengan senyawa marker andrografolida, sehingga

akan diperoleh sediaan obat fitofarmaka antikanker kolon yang potensial, aman, selektif dan akhirnya dapat digunakan untuk pengobatan kanker kolon di dalam pelayanan kesehatan formal.

Metodologi dari penelitian ini adalah pengumpulan bahan uji, standarisasi simpilisia, pembuatan ekstrak terpurifikasi kencur dengan senyawa marker etil-parametoksinamat (EPMS) dan ekstrak terpurifikasi sambiloto dengan senyawa markernya andrografolida, standarisasi ekstrak terpurifikasi, uji antikanker secara *in vitro* dengan sel kanker kolon WiDr, desain formulasi, studi bioavailabilitas dari kapsul, uji toksisitas kapsul campuran ekstrak terpurifikasi kencur dan sambiloto, yang meliputi toksisitas akut, sub akut, teratogenik serta uji aktivitas antikanker secara *in vivo* pada kanker kolon mencit hasil induksi DMBA dan uji klinik terbatas pada pasien kanker kolon di RSUD Dr Sutomo Surabaya.

1.2. Rumusan Masalah

Kanker kolorektal adalah kanker yang primer berasal dari kolon dan atau rektum. Secara global kanker kolorektal merupakan penyakit keganasan terbanyak urutan ketiga pada wanita dan keempat pada pria, tiap tahunnya dapat diperkirakan terdapat 800.000 kasus baru. Insiden pada pria sedikit lebih banyak dibanding pada wanita. Kanker ini banyak dijumpai di negara industri, sedangkan di negara berkembang insidennya cenderung meningkat. Di Indonesia kanker kolorektal termasuk penyakit keganasan saluran cerna yang paling banyak dijumpai. Kanker kolorektal termasuk juga dalam 10 jenis kanker terbanyak dan menempati urutan ke 6 dari penyakit keganasan yang ada. Oleh karena itu penelitian dan pencarian obat baru khususnya yang berasal dari bahan alam atau tanaman obat terus dikembangkan, baik dalam bentuk obat herbal terstandar (OHT) atau obat fitofarmaka. Kombinasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) banyak digunakan secara tradisional sebagai obat antikanker.

Dari uraian tersebut diatas maka dapat dirumuskan masalahnya sebagai berikut :

1. Apakah sediaan fitofarmaka campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) memiliki aktivitas antikanker secara *in vitro* dan *in vivo* ?
2. Apakah sediaan fitofarmaka campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) memiliki efek toksik pada hewan coba yang meliputi toksisitas akut, sub akut, efek teratogenik ?
3. Apakah sediaan fitofarmaka campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) memiliki aktivitas antikanker terhadap pasien kanker kolon pada uji klinik ?

1.3. Tujuan Umum Penelitian

Membuat produk fitofarmaka campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) sebagai obat antikanker kolon.

1.3.1. Tujuan Khusus Penelitian

2. Menentukan standarisasi simplisia rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees).
3. Melakukan fraksinasi ekstrak dan standarisasi fraksi terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees).
4. Menentukan uji aktivitas antikanker dan uji induksi apoptosis campuran ekstrak terpurifikasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap sel kanker kolon manusia WiDr secara in vitro.
5. Menentukan studi formulasi dan pengujian bioavaibilitas produk fitofarmaka dari campuran ekstrak terpurifikasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees).
6. Penentuan uji toksisitas produk fitofarmaka dari campuran ekstrak terpurifikasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) yang meliputi toksisitas akut, toksisitas sub-akut, uji teratogenik.
7. Penentuan uji aktivitas antikanker produk fitofarmaka dari campuran ekstrak terpurifikasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) secara in vivo pada hewan coba yang diinduksi dengan DMBA .
8. Penentuan uji klinik produk fitofarmaka dari campuran ekstrak terpurifikasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap pasien kanker kolon.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

1.1. Tinjauan Tentang *Kaempferia galanga* Linn.

1.1.1 Klasifikasi Tanaman

- Divisi : Spermatophyta
Sub Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Liliopsida
Ordo : Zingiberales
Famili : Zingiberaceae
Genus : *Kaempferia*
Spesies : *Kaempferia galanga* Linn.

(Backer, 1968)



(a)

(b)

Gambar 2.2 (a) *Kaempferia galanga* Linn (Abdullah, 2009)

(b) Rimpang kencur

1.1.2. Nama Daerah *Kaempferia galanga* Linn.

Indonesia : Kencur (Heyne, 1987)

Malaysia : Cekur

Myanmar : Kunzah gamon

Filipina : Gisol

Vietnam : Dia Lien

Thailand : Proh Hom (Sae-wong *et al.*, 2008)

Inggris : East Indies Galangale

1.1.3. Morfologi *Kaempferia galanga* Linn.

Kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) termasuk suku tumbuhan Zingiberaceae dengan ciri-ciri tera yang hampir menutupi tanah, tidak berbatang, berdesak-desakan, akar-akarnya berbentuk gelendong, kadang-kadang berumbi. Terdapat dua tipe pertumbuhan, yang pertama berdaun lebar dan terhampar di atas tanah, yang kedua berdaun sempit dan agak tegak.

Rimpang kencur mempunyai aroma yang spesifik. Daging buah berwarna putih dan kulit luarnya berwarna coklat. Jumlah helaian daun tidak lebih dari 2-3 lembar dengan susunan berhadapan. Bunganya tersusun setengah duduk dengan mahkota bunga berjumlah antara 4 – 12 buah, bibir bunga berwarna lembayung dengan warna putih lebih dominan. Kencur tumbuh dan berkembang pada musim tertentu, yaitu pada musim penghujan. Kencur dapat ditanam dalam pot

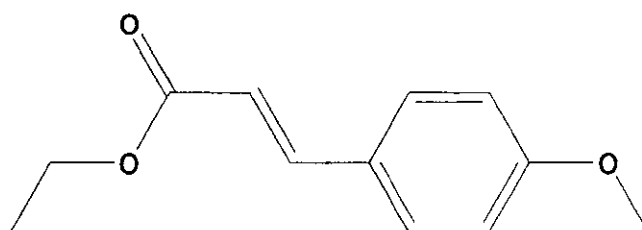
atau di kebun yang cukup sinar matahari, tidak terlalu basah dan di tempat terbuka (Departemen Kesehatan RI, 1977).

1.1.4. Penyebaran *Kaempferia galanga* Linn.

Penyebaran pertumbuhannya meliputi Indonesia, Malaysia, dan India. Kencur dapat tumbuh subur di dataran rendah atau pegunungan yang tanahnya gembur dan tidak terlalu banyak air (Departemen Kesehatan RI, 1977).

1.1.5. Kandungan *Kaempferia galanga* Linn.

Rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) mengandung 1,11% minyak atsiri yang terdiri dari komponen α -pinena (1.28%), camphene (2.47%), karvon (11.13%), benzene (1.33%), eucalyptol (9.59%), borneol (2.87%), metil sinamat (23.23%), pentadekana (6.41%), dan etil-*p*-metoksisinamat (31.77%) (Tewtrakul *et al.*, 2005).



Gambar 2.3 Etil *p*-metoksisinamat

1.1.6. Kegunaan *Kaempferia galanga* Linn.

Kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) secara ekstensif telah digunakan untuk treatment berbagai macam penyakit antara lain hipertensi, rematik, dan asma. Di Thailand, rimpang kencur digunakan untuk mengurangi sakit gigi, nyeri abdomen, inflamasi pada otot, dan rematik (Sirirugsa, 1997). Indikasi lain yang sering digunakan dari tanaman ini selain untuk hipertensi adalah untuk rematik, asma, sakit kepala, batuk, sakit gigi, dan terapi untuk luka dan memar (Perry & Metzger, 1980). Di Malaysia dan Indonesia, tanaman ini digunakan untuk obat kumur, daun dan rimpangnya dikunyah untuk mengobati batuk, obat gosok, dan digunakan sebagai lotion untuk mengobati berbagai penyakit. Hasil sari dari rimpang kencur digunakan sebagai ekspektoran dan karminatif, dan biasanya merupakan bagian dari pengobatan untuk anak-anak (Othman *et al.*, 2006). Di Cina, tanaman ini digunakan untuk mengobati sakit gigi, sebagai

stimulan, karminatif untuk kolera, mengatasi luka memar, sakit di dada, sakit kepala, dan konstipasi (Ibrahim & Rahman, 1988; Mustafa *et al.*, 1995).

Beberapa aktivitas farmakologi dari *Kaempferia galanga* Linn. telah dilaporkan, sebagai contoh adalah untuk *muscle relaxant* (Hidir & Ibrahim, 1991) dan *vasorelaxant* (Othman *et al.*, 2006; Mustafa *et al.*, 1996).

Ekstrak methanol dari *Kaempferia galanga* Linn. yang mengandung etil *p*-metoksisinamat dilaporkan memiliki aktivitas antinosisepsi dengan penghambatan terhadap enzim *cyclooxygenase-2* (COX-2) (Sae-wong *et al.*, 2008) dan sitotoksitas yang besar terhadap sel HeLa (Kosuge *et al.*, 1985). Pada studi terbaru, *Kaempferia galanga* Linn. dipilih karena merupakan salah satu tanaman obat yang banyak digunakan untuk mengobati nyeri abdomen, sakit gigi, bengkak, dan rematik (Sae-wong *et al.*, 2008).

2.2 Tinjauan tentang Tanaman *Andrographis paniculata* Nees.

2.2.1 Klasifikasi Sambiloto (*A. paniculata* Ness)

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Anak Kelas	: Sympetalae
Bangsa	: Tubiflorae
Suku	: Acanthaceae
Marga	: <i>Andrographis</i>
Jenis	: <i>Andrograpis paniculata</i> Ness.

(Backer dan Van der Brink Jr., 1965; Depkes RI, 1979; Sugiarti dan Johny, 1991)

2.2.2 Nama Daerah Sambiloto (*A. paniculata* Ness.)

Ki oray, Ki peurat, takilo (Sunda), bidara, sadilata, sambilata, takila (Jawa), pepaitan (Sumatra), yi jian xi, lan he lian (China), xuyen tem liem, cong cong (Vietnam), kirata, mahatitka (India/Pakistan), creat, green chiretta, halviva, kariyat (Inggris) (Depkes RI, 1979; Sugiarti dan Johny, 1991).

2.2.3 Morfologi Sambiloto (*A. paniculata* Ness.)

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) merupakan tanaman terna, tumbuh tegak, tinggi 40 cm sampai 90 cm, percabangan banyak dengan letak yang berlawanan, cabang berbentuk segi empat dan tidak berambut. Bentuk daun lanset, ujung daun dan pangkal daun tajam atau agak tajam, tepi daun rata, panjang daun 3 cm sampai 12 cm dan lebar 1 cm sampai 3 cm, panjang tangkai 5 mm sampai 25 mm; daun bagian atas bentuknya seperti pelindung.

Perbungaan tegak bercabang-cabang, gagang bunga 3 mm sampai 7 mm, panjang kelopak bunga 3 mm sampai 4 mm. Bunga berbibir tabung, panjang 6 mm, bibir bunga bagian atas berwarna putih dengan warna kuning di bagian atasnya, ukurannya 7 mm sampai 8 mm, bibir bunga bawah lebar berbentuk biji, berwarna ungu dan panjang 6 mm. Tangkai sari sempit dan melebar pada bagian pangkal, panjang 6 mm.

Bentuk buah jorong dengan ujung yang tajam, panjang lebih kurang 2 cm, bila tua akan pecah terbagi menjadi empat keping (Depkes RI, 1979, 2003).

2.2.4 Tinjauan tentang Herba Sambiloto (*A. paniculata* Ness.)

Herba sambiloto adalah bagian di atas tanah tanaman *Andrographis paniculata* Nees. Tidak berbau, rasa sangat pahit. Batang tidak berambut, tebal 2 mm sampai 6 mm, jelas persegi empat, batang bagian atas seringkali dengan sudut agak berusuk. Daun bersilang berhadapan, umumnya terlepas dari batang, bentuk lanset sampai bentuk lidah tombak, panjang 2 cm sampai 7 cm, lebar 1 cm sampai 3 cm, rapuh, tipis, tidak berambut, pangkal daun runcing, tepi daun rata. Permukaan atas berwarna hijau tua atau hijau kecoklatan, permukaan bawah berwarna hijau pucat. Tangkai daun pendek.

Kelopak bunga terdiri dari lima helai daun kelopak, panjang 3 mm sampai 4 mm, berambut. Daun mahkota berwarna putih sampai keunguan. Buah berbentuk jorong, pangkal dan ujung tajam, panjang lebih kurang 2 cm, lebar lebih kurang 4 mm, kadang-kadang pecah secara membujur menjadi lima keping. Permukaan luar kulit buah berwarna putih atau putih kelabu. Biji agak keras, panjang 1,5 mm sampai 3 mm, lebar lebih kurang 2 mm; permukaan luar berwarna coklat muda bertonjol-tonjol. Pada penampang melintang biji terlihat endosperm berwarna kuning kecoklatan, lembaga berwarna putih kekuningan.

Pada daun, epidermis atas terdiri atas satu lapis sel berbentuk polygonal, tidak mempunyai stomata, dan pada epidermis terdapat sistolit berbentuk jorong atau bulat telur panjang. Bentuk

sistolit mirip rangkaian anggur. Rambut kelenjar banyak, rambut penutup sedikit. Pada epidermis bawah banyak ditemukan stomata tipe bidiasitik dan diasitik, rambut kelenjar dan litosis lebih banyak. Berkas pembuluh tipe bikolateral. Pada batang terdapat epidermis yang terdiri dari satu lapis sel, rambut kelenjar dan litosis. Di bawah epidermis ada jaringan kolenkim, parenkim korteks, xylem, floem, kambium dan empulur. Pada batang sambiloto masih terdapat warna hijau seperti pada daun karena masih mengandung kloroplas yang disebut klorenkim (Depkes RI, 1979; Standard of ASEAN Herbal Medicine, 1993).



Gambar 2.5 *Andrographis paniculata* Nees.

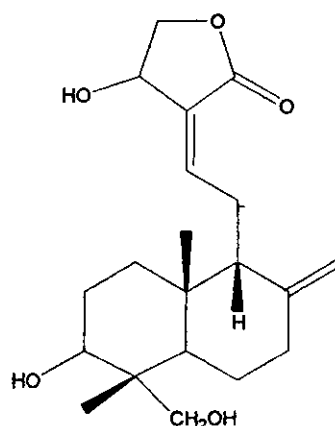
2.2.5 Penyebaran Tanaman

Tumbuh di India, semenanjung Malaya dan hampir di seluruh Indonesia pada tempat terbuka, di kebun, di tepi sungai, pada tanah yang gembur, seringkali tumbuh berkelompok. Tumbuh pada ketinggian tempat 1 m sampai 700 m di atas permukaan laut (Depkes RI, 1979).

2.2.6 Kandungan Kimia

Komponen utama sambiloto adalah andrografolida yang berguna sebagai bahan obat. Kandungan lakton lain adalah neoandrografolida, deoksiandrografolida, androneoandrografolida, 14-deoksi 11,12-didehidroksiandrografolida (dehidroandrografolida), homo andrographolide, andrographan, andrographon, andrographosterin, β -sitosterol-D-glucoside.

Disamping itu, daun sambiloto mengandung saponin, flavonoid meliputi polimetoksi flavon, andrografin, panicolin, mono-*o*-metilwightin dan apigenin-7,4-dimetil eter, alkaloid dan tanin. Kandungan kimia lain terdapat pada daun dan batang adalah lakton, kalmegin dan hablur kuning yang memiliki rasa pahit (Chang, 1987; Depkes RI, 1979; Matsuda, dkk, 1994; Yusron dkk, 2005).



Gambar 2.6 Struktur Andrografolida

2.2.7 Kegunaan Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.)

Hepatitis, infeksi saluran empedu, disetri basiler, tifoid, diare, influenza, radang amandel (tonsilitis), abses paru, malaria, radang paru (pneumonia), radang saluran napas (bronkhitis), radang ginjal akut (pielonefritis), radang telinga tengah (OMA), Radang usus Buntu, sakit gigi, demam, kencing nanah (gonore), kencing manis (DM), TB paru, skrofuloderma, batuk rejan (pertusis), sesak nafas (asma), leptospirosis, darah tinggi, (hipertensi), kusta, keracunan oleh jamur, singkong, tempe bongkreng, makanan laut, kanker: penyakit trofoblas, kehamilan anggur (molahidatidosa), trofoblas ganas (tumor trofoblas), tumor paru, obat HIV dan kanker (Depkes RI, 1979; Yusron, dkk, 2005). Obat HIV dan kanker (Yusron, dkk, 2005), anti kanker (Rajagopal, 2003; Sukardiman, 1997), anti kanker payudara (Sukardiman, 2002), malaria (Suyanto, 1995; Kusumawardhani, 2005), sebagai imunostimulan (Puri *et al.*, 1993), hepatoprotektif (Handa dan Sharma, 1990), dan antidiare (Gupta *et al.*, 1990), anti piretik (Madav *et al.*, 1995), dll.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

2.3. Tinjauan Tentang Standardisasi

Standardisasi simplisia mempunyai pengertian bahwa simplisia yang akan digunakan untuk obat sebagai bahan baku harus memenuhi persyaratan yang tercantum dalam monografi terbitan resmi pemerintah sebagai pihak pembina dan pengawasan (Materia Medika Indonesia) yang meliputi makroskopis, mikroskopis (irisan dan serbuk) serta kimia (Depkes RI, 1989).

2.4. Tinjauan Tentang Simplisia

Simplisia adalah bahan alam yang digunakan sebagai obat, belum mengalami pengolahan apapun, umumnya dalam keadaan kering, langsung digunakan sebagai obat dalam atau banyak digunakan sebagai obat dalam sediaan galenik tertentu atau digunakan sebagai bahan dasar untuk memperoleh bahan baku obat. Sedangkan sediaan galenik berupa ekstrak total mengandung 2 atau lebih senyawa kimia yang mempunyai aktifitas farmakologi dan diperoleh sebagai produk ekstraksi bahan alam serta langsung digunakan sebagai obat atau digunakan setelah dibuat bentuk formulasi sediaan obat tertentu yang sesuai (Depdikbud, 1984).

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 (Depkes RI, 2000).

2.4.1 Klasifikasi Simplisia

Simplisia dibagi menjadi 3 golongan yaitu: simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan (mineral) (Midian dkk, 1985).

2.4.1.1 Simplisia Nabati

Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman/eksudat tanaman (Depkes RI, 1979). Yang dimaksud dengan eksudat tanaman adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya, atau zat-zat nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya (Midian dkk, 1985).

2.4.1.2 Simplisia Hewani

Simplisia hewani ialah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni (Midian dkk, 1985).

2.4.1.3 Simplisia Pelikan (Mineral)

Simplisia pelikan atau mineral ialah simplisia yang berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Midian dkk, 1985).

2.4. 2. Pembuatan simplisia secara umum

2.4.2.1 Pengumpulan bahan baku

Kadar senyawa aktif dalam suatu simplisia berbeda-beda antara lain tergantung pada :

1. Bagian tanaman yang digunakan
2. Umur tanaman atau bagian tanaman pada saat panen
3. Waktu panen
4. Lingkungan tempat tumbuh

Waktu panen sangat erat hubungannya dengan pembentukan senyawa aktif di dalam bagian tanaman yang akan dipanen. Waktu panen yang tepat pada saat bagian tanaman tersebut mengandung senyawa aktif dalam jumlah terbesar. Senyawa aktif terbentuk secara maksimal di dalam bagian tanaman atau tanaman pada umur tertentu. Penentuan waktu panen dalam sehari juga perlu dipertimbangkan karena kestabilan kimia dan fisik senyawa aktif dari beberapa simplisia yang mengandung minyak atsiri dipengaruhi oleh sinar matahari.

Panen dilakukan dengan tangan, menggunakan alat atau mesin. Ketrampilan memetik sangat diperlukan agar diperoleh simplisia yang benar, tidak tercampur dengan bagian tanaman lain dan tidak merusak tanaman induk. Alat yang terbuat dari logam sebaiknya tidak digunakan bila diperkirakan akan merusak senyawa aktif simplisia seperti : fenol, glikosida dan sebagainya.

Tanaman yang pada saat panen diambil rimpangnya, pengambilan dilakukan pada musim kering dengan tanda-tanda mengeringnya bagian atas tanaman. Dalam keadaan ini, rimpang dalam keadaan besar maksimum. Cara pengumpulan simplisia yang berupa rimpang yaitu ; rimpang dicabut, dibersihkan dari akar, dipotong dengan ketebalan tertentu (Depkes RI, 1985).

2.4.2.2. Sortasi basah

Sortasi basah dilakukan untuk menghilangkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Misalnya pada simplisia yang dibuat dari akar suatu tanaman obat, bahan-bahan asing seperti tanah, serta pengotoran lainnya harus dibuang. Tanah mengandung bermacam-macam mikroba dalam jumlah yang tinggi, oleh karena itu pembersihan simplisia dari tanah yang terikut dapat mengurangi jumlah mikroba awal (Depkes RI, 1985).

2.4.2.3. Pencucian

Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotoran lainnya yang melekat pada bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih, misalnya air dari mata air, air sumur atau air PAM. Bahan simplisia yang mengandung zat yang mudah larut di dalam air yang mengalir, pencucian agar dilakukan dalam waktu sesingkat mungkin. Cara sortasi dan pencucian sangat mempengaruhi jenis dan jumlah mikroba awal simplisia. Misalnya jika air yang digunakan untuk pencucian kotor, maka akan menambah jumlah mikroba dan air pada permukaan bahan simplisia yang akan mempercepat pertumbuhan mikroba (Depkes RI, 1985).

2.4.2.4. Perajangan

Beberapa jenis bahan simplisia perlu mengalami proses perajangan. Perajangan bahan simplisia dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan. Tanaman yang baru diambil jangan langsung dirajang tetapi dijemur dalam keadaan utuh selama 1 hari. Hal ini diperlukan untuk menghindari pewarnaan akibat reaksi antara bahan dengan logam pisau. Perajangan dapat dilakukan dengan pisau, dengan alat mesin perajang khusus sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran yang dikehendaki. Semakin tipis bahan yang akan dikeringkan, semakin cepat penguapan air, sehingga mempercepat waktu pengeringan. Akan tetapi irisan yang terlalu tipis juga dapat menyebabkan berkurangnya atau hilangnya zat berkhasiat yang mudah menguap, sehingga mempengaruhi komposisi, bau dan rasa yang diinginkan (Depkes RI, 1985).

2.4.2.5. Pengeringan

Tujuan pengeringan ialah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Dengan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik akan dicegah penurunan mutu atau perusakan simplisia. Pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan sinar matahari atau menggunakan suatu alat pengering. Hal-hal yang perlu diperhatikan selama proses pengeringan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara, waktu pengeringan dan luas permukaan bahan.

Pada dasarnya dikenal dua cara pengeringan, yaitu pengeringan secara alamiah dan buatan. Pengeringan alamiah dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan panas sinar matahari langsung dan dengan diangin-anginkan. Pengeringan dengan sinar matahari langsung dilakukan untuk mengeringkan bagian tanaman yang relatif keras seperti kayu, kulit kayu, biji, dan mengandung senyawa aktif yang relatif stabil. Kecepatan pengeringan dari cara ini sangat tergantung pada keadaan iklim, sehingga baik jika dilakukan di daerah yang udaranya panas atau kelembabannya rendah, serta tidak turun hujan. Pengeringan dengan cara diangin-anginkan dan tidak dipanaskan dengan sinar matahari langsung digunakan untuk mengeringkan bagian tanaman yang lunak seperti bunga, daun dan bagian tanaman yang mengandung senyawa aktif mudah menguap. Pada pengeringan buatan digunakan suatu alat yang suhu, kelembaban, tekanan dan aliran udaranya dapat diatur. Dengan menggunakan alat ini dapat diperoleh simplisia dengan mutu yang lebih baik karena pengeringan akan lebih merata dan waktu pengeringan lebih cepat tanpa dipengaruhi oleh keadaan cuaca (Depkes RI, 1985).

2.4.2.6. Sortasi kering

Sortasi setelah pengeringan sebenarnya merupakan tahap akhir pembuatan simplisia. Tujuan sortasi untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotoran-pengotoran lain yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering. Proses ini dilakukan sebelum simplisia dibungkus untuk kemudian disimpan. Seperti halnya pada sortasi awal, sortasi disini dapat dilakukan dengan atau secara mekanik. Pada simplisia bentuk rimpang, jumlah akar yang melekat pada rimpang terlampau besar dan harus dibuang (Depkes RI, 1985).

2.4.2.7 Pengepakan dan Penyimpanan

Simplisia dapat rusak, mundur atau berubah mutunya karena berbagai faktor luar dan dalam, antara lain : cahaya, oksigen udara, reaksi kimia intern, dehidrasi, penyerapan air, pengotoran, serangga, dan kapang. Selama penyimpanan ada kemungkinan terjadi kerusakan pada simplisia. Kerusakan tersebut dapat mengakibatkan kemunduran mutu, sehingga simplisia bersangkutan tidak lagi memenuhi syarat yang diperlukan atau yang ditentukan. Oleh karena itu pada penyimpanan simplisia perlu diperhatikan beberapa hal yang dapat mengakibatkan kerusakan simplisia, yaitu cara pengepakan, pembungkusan dan pewadahan, persyaratan gudang simplisia, cara sortasi dan pemeriksaan mutu, serta cara pengawetannya. Penyebab kerusakan pada simplisia yang utama adalah air dan kelembaban.

Cara pengemasan simplisia tergantung pada jenis simplisia dan tujuan penggunaan pengemasan. Bahan dan bentuk pengemasannya harus sesuai, dapat melindungi dari kemungkinan kerusakan simplisia, dan memperhatikan segi pemanfaatan ruang untuk keperluan pengangkutan maupun penyimpanan. Wadah harus bersifat tidak beracun dan tidak bereaksi (inert) dengan isinya sehingga tidak menyebabkan terjadinya reaksi serta penyimpangan warna, bau, rasa dan sebagainya pada simplisia. Selain itu wadah harus melindungi simplisia dari cemaran mikroba, kotoran dan serangga serta mempertahankan senyawa aktif yang mudah menguap atau mencegah pengaruh sinar, masuknya uap air dan gas-gas lain yang dapat menurunkan mutu simplisia (Depkes RI, 1985).

2.4.2.8 Pemeriksaan Mutu

Pemeriksaan mutu simplisia dilakukan pada waktu penerimaan atau pembeliannya dari pengumpul atau pedagang simplisia. Simplisia yang diterima harus berupa simplisia murni dan memenuhi persyaratan umum untuk simplisia seperti yang disebutkan dalam buku Farmakope Indonesia, Ekstra Farmakope Indonesia ataupun Materia Medika Indonesia edisi terakhir. Apabila untuk simplisia yang bersangkutan terdapat paparannya dalam salah satu atau ketiga buku tersebut, maka simplisia tadi harus memenuhi persyaratan yang disebutkan pada paparannya. Suatu simplisia dapat dinyatakan bermutu Farmakope Indonesia, Ekstra Farmakope Indonesia, atau Materia Medika Indonesia, apabila simplisia bersangkutan memenuhi persyaratan yang disebutkan dalam buku-buku yang bersangkutan. Pada pemeriksaan mutu simplisia pemeriksaan dilakukan dengan cara organoleptik, makroskopik dan atau cara kimia.

Beberapa jenis simplisia tertentu ada yang perlu diperiksa dengan uji mutu secara biologi. Sebelum disortir simplisia diayak dulu untuk membuang debu pasir yang terikut (Depkes RI, 1985).

2.5 Tinjauan tentang Ekstrak

2.5.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. (Farmakope Indonesia IV, 1995)

Ekstrak tumbuhan obat yang dibuat dari simplisia nabati dapat dipandang sebagai bahan awal, bahan antara, atau bahan produk jadi. Ekstrak sebagai bahan awal dianalogkan dengan komoditi bahan baku obat yang dengan teknologi fitofarmasi diproses menjadi bahan yang dapat diproses lagi menjadi fraksi-fraksi, isolat senyawa tunggal ataupun tetap sebagai campuran dengan ekstrak lain. Ekstrak sebagai produk jadi berarti ekstrak yang berada dalam sediaan obat jadi siap digunakan oleh penderita. (Sutarjadi dan Noor Cholies, 1992).

2.5.2 Faktor Yang Berpengaruh pada Mutu Ekstrak

2.5.2.1 Faktor Biologi

Mutu ekstrak dipengaruhi oleh bahan asal yaitu tanaman obatnya dan khusus dipandang dari segi biologi. Faktor biologi baik untuk bahan dari tumbuhan obat hasil budidaya (kultivar), maupun dari tumbuhan liar (wild crop) yang meliputi beberapa hal, yaitu :

1. Identitas jenis (spesies)

Jenis tanaman dari sudut keragaman hayati dapat dikonfirmasi sampai informasi genetik sebagai faktor internal untuk validasi jenis (spesies).

2. Lokasi tanaman asal

Lokasi berarti faktor eksternal, yaitu lingkungan (tanah dan atmosfer) dimana tanaman berinteraksi berupa energi (cuaca, temperatur, cahaya) dan materi (air, senyawa organik, dan senyawa anorganik).

3. Periode pemanenan hasil tanaman

Faktor ini merupakan dimensi waktu dari proses kehidupan tanaman terutama metabolisme sehingga menentukan senyawa kandungan. Kapan senyawa kandungan mencapai kadar optimal dari proses biosintesis dan sebaliknya kapan sebelum senyawa tersebut dikonversi atau dibiotransformasi atau biodegradasi menjadi senyawa lain.

4. Penyimpanan bahan tanaman

Merupakan faktor eksternal yang dapat diatur karena berpengaruh pada stabilitas bahan serta adanya kontaminasi (biotik dan abiotik).

5. Umur tanaman dan bagian yang digunakan.

Selain kelima faktor diatas, maka untuk bahan dari tanaman obat hasil budidaya (kultivar) adalah faktor GAP (*Good Agriculture Practice*) sedangkan untuk bahan dari tumbuhan liar ada faktor kondisi proses pengeringan yang umumnya dilakukan di lapangan (Depkes RI, 2000).

2.5.2.2 Faktor Kimia

Mutu ekstrak dipengaruhi oleh bahan asal yaitu tanaman obatnya, khususnya dipandang dari segi kandungan kimianya. faktor kimia baik untuk bahan dari tanaman obat hasil budidaya (kultivar) ataupun dari tumbuhan liar (*wildcrop*), meliputi beberapa hal, yaitu :

- a. Faktor internal:
 1. Jenis senyawa aktif dalam bahan
 2. Komposisi kualitatif senyawa aktif
 3. Komposisi kuantitatif senyawa aktif
 4. Kadar total rata-rata senyawa aktif
- b. Faktor eksternal:
 1. Metode ekstraksi
 2. Perbandingan ukuran alat ekstraksi (diameter dan tinggi alat)
 3. Ukuran, kekerasan, dan kekeringan bahan
 4. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi
 5. Kandungan logam berat
 6. Kandungan pestisida

Senyawa kimia dalam ekstrak ditinjau dari asalnya dapat dibedakan menjadi beberapa kelompok, yaitu :

1. Senyawa kandungan asli dari tanaman asal

Senyawa asli sebenarnya berarti senyawa yang memang sudah ada sejak masa tanaman tersebut hidup. Jika proses preparasi simplisia dan ekstraksi dijamin tidak menyebabkan perubahan kimia, maka hasil analisis kimia terhadap ekstrak mencerminkan komposisi senyawa kandungan asli.

2. Senyawa dari hasil perubahan senyawa asli

Dari kajian dan riset memang sudah dapat diprediksi terjadi perubahan kimia senyawa asli karena memang sifat fisika kimia senyawa asli dan proses penstabilan yang sulit.

3. Senyawa kontaminasi

Senyawa kontaminasi merupakan senyawa eksogen yang tercampur pada ekstrak baik polusi yang tidak terhindari atau sebagai sisa atau residu proses.

4. Senyawa hasil interaksi kontaminasi dengan senyawa asli atau senyawa perubahan.

Pengertian dan kesadaran akan adanya 4 kelompok senyawa yang terkandung dalam ekstrak akan meningkatkan validasi standarisasi dan parameter mutu ekstrak. Kelompok pertama dan kedua terkait dengan parameter standard umum yang bersifat spesifik sedangkan kelompok tiga dan empat merupakan parameter standard nonspesifik (Depkes RI, 2000).

2.5.3 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu :Pembuatan serbuk simplisia dan klasifikasinya, menentukan cairan pengekstraksi, separasi dan pemurnian, pemekatan dan penguapan, pengeringan ekstrak (Depkes RI, 2000).

2.5.3.1 Pembuatan serbuk simplisia

Proses awal pembuatan ekstrak adalah tahapan pembuatan serbuk simplisia kering. Dari simplisia dibuat serbuk simplisia dengan peralatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak dengan beberapa hal, yaitu :

- Makin halus serbuk simplisia, proses ekstraksi makin efektif-efisien namun makin halus serbuk maka makin rumit secara teknologi peralatan untuk tahapan filtrasi.

- Selama penggunaan peralatan penyerbukan dimana ada gerakan dan interaksi dengan benda keras (logam, dan lain-lain) yang dapat berpengaruh pada senyawa kandungan. Namun hal ini dapat dikompensasi dengan penggunaan nitrogen cair.

2.5.3.2. Menentukan cairan pengekstraksi

Cairan pengekstraksi dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat dipisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Dalam hal ekstrak total, maka cairan pengekstraksi dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Faktor utama untuk pertimbangan dalam pemilihan cairan pengekstraksi adalah :

- Selektifitas
- Kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut
- Ekonomis
- Ramah lingkungan
- Keamanan

Pada prinsipnya cairan pengekstraksi harus memenuhi syarat kefarmasian atau dalam perdagangan dikenal dengan kelompok spesifikasi "Pharmaceutical grade" (Depkes RI, 2000).

2.5.3.3 Separasi dan Pemurnian

Tujuan dari tahapan ini adalah menghilangkan (memisahkan) senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki, sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. Proses-proses pada tahapan ini adalah pengendapan, pemisahan dua cairan tidak campur, sentrifugasi, dekantasi, filtrasi serta proses adsorpsi dan penukar ion (Depkes RI, 2000).

2.5.3.4. Pemekatan atau penguapan (vaporasi dan evaporasi)

Pemekatan berarti peningkatan jumlah partial solut (senyawa terlarut) secara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kondisi kering. Ekstrak hanya menjadi kental atau pekat (Depkes RI, 2000). Alat yang sering digunakan yaitu dengan menggunakan Konsentrator Tradisional Tipe Robert, *Descending-Film Evaporator* dan *Horizontal-Film Evaporator*. Pada evaporator lapis

tipis, pelarut menguap pada lapisan yang berisi larutan ekstrak dalam jumlah sedikit, sehingga pemekatan dengan menggunakan alat ini membutuhkan waktu yang singkat. Dengan penggunaan vakum/penghisap dan suhu evaporasi yang cukup rendah, sangat mungkin menjamin perlakuan yang hati-hati dari produk yang termosensitif (Wijisekera, 1991).

2.5.3.5. Pengerinan Ekstrak

Pengerinan berarti menghilangkan pelarut dari bahan sehingga menghasilkan serbuk, massa kering rapuh, tergantung proses dan peralatan yang digunakan. Ada beberapa proses pengerinan ekstrak, yaitu dengan cara:

- Pengerinan evaporasi
 - Pengerinan kontak
 - Pengerinan vaporasi
 - Pengerinan radiasi
 - Pengerinan sublimasi
 - Pengerinan dielektrik
 - Pengerinan konveksi
- (Depkes RI, 2000).

2.5.4. Metode Ekstraksi

2.5.4.1 Ekstraksi dengan menggunakan pelarut

1. Cara dingin.

1.1 Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes RI, 2000).

1.2 Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/ penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Depkes RI, 2000).

2. Cara panas

2.1 Refluks

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI, 2000).

2.3 Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinyu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yang secara umum dilakukan pada temperatur 40-50⁰C (Depkes RI, 2000).

2.4 Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup ke dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98⁰C) selama waktu tertentu (15- 20 menit) (Depkes RI, 2000).

2.5 Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ($\geq 30^0$ C) dan temperatur sampai titik didih air (Depkes RI, 2000).

2.6 Destilasi uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan partial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dan ketel secara kontinyu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama sentawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian.

Pada destilasi uap, bahan (simplisia) benar-benar tidak tercelup ke air yang mendidih, namun dilewati uap air sehingga senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi. Destilasi uap dan air, bahan (simplisia) bercampur sempurna atau sebagian dengan air mendidih, senyawa kandungan menguap tetap kontinyu ikut terdestilasi (Depkes RI, 2000).

2.5.4.2. Cara ekstraksi lainnya.

1. Ekstraksi berkesinambungan

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi (Depkes RI, 2000).

2. Superkritikal karbondioksida

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia, dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variabel temperatur dan tekanan akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak (Depkes RI, 2000).

3. Ekstraksi ultrasonik

Getaran ultrasonik (>20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (cavitation) sebagai stress dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekwensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi (Depkes RI, 2000).

4. Ekstraksi energi listrik

Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta "electric-discharges" yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelembung tekanan berkacepatan ultrasonik (Depkes RI, 2000).

2.6 Tinjauan tentang Parameter Standar Umum Simplisia dan Ekstrak

2.6.1 Parameter Non Spesifik

Parameter non spesifik merupakan tolak ukur baku yang dapat berlaku untuk semua jenis simplisia maupun ekstrak, tidak khusus untuk jenis simplisia atau ekstrak dari tanaman tertentu, ataupun jenis proses yang telah dilalui (Depkes RI, 2000).

2.6.1.1 Susut Pengerinan.

Pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C selama 30 menit atau sampai berat konstan, yang dinyatakan sebagai nilai prosen. Dalam hal khusus (bahan tidak mengandung minyak menguap/etsiri dan sisa pelarut menguap) identik dengan kadar air, yaitu kandungan air karena kandungan air berada di atmosfer/lingkungan udara terbuka. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (Depkes RI, 2000).

2.6.1.2 Kadar Air

Pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan, dilakukan dengan cara yang tepat diantara cara titrasi, destilasi atau gravimetri. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air dalam bahan (Depkes RI, 2000)

2.6.1.3 Kadar Abu

Dilakukan dengan memanaskan bahan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak (Depkes RI, 2000).

2.6.1.4. Cemarkan Logam Berat

Penentuan kandungan logam berat secara spektroskopi serapan atom atau lainnya yang lebih valid. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung logam berat tertentu (Hg, Pb, Cd dan lain-lain) melebihi nilai yang ditetapkan karena berbahaya (toksik) bagi kesehatan (Depkes RI, 2000)

2.6.1.6 Cemarkan Mikroba

1. Parameter Cemarkan Mikroba

Penentuan /identifikasi adanya mikroba yang patogen secara analisis mikrobiologis. Penentuan parameter ini untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak boleh mengandung

mikroba nonpatogen melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan berbahaya (toksik) bagi kesehatan.

2. Parameter Cemaran Kapang, Khamir dan Aflatoksin.

Penentuan adanya jamur secara mikrobiologis dan adanya aflatoksin dengan KLT. Penentuan parameter ini untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung cemaran jamur melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan aflatoksin yang berbahaya bagi kesehatan (Depkes RI, 2000).

2.6.2 Parameter Spesifik

Parameter spesifik merupakan tolak ukur khusus yang dapat dikaitkan dengan jenis tanaman asal ekstrak atau proses ekstraksi tertentu. Umumnya yang spesifik adalah komposisi kandungan dalam ekstrak yang dapat diartikan sebagai komponen utama, dalam hal ini kurkumin (Depkes RI, 2000).

2.6.2.1 Identitas

Parameter identitas ekstrak meliputi deskripsi tata nama meliputi nama ekstrak (generik, dagang, paten), nama latin tumbuhan (sistematika botani), bagian tumbuhan yang digunakan (rimpang, daun, dan sebagainya) dan nama Indonesia tumbuhan. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan identitas obyektif dari nama dan spesifik dari senyawa identitas, yaitu senyawa tertentu yang menjadi petunjuk spesifik dengan metode tertentu (Depkes RI, 2000).

2.6.2.2 Organoleptik

Parameter organoleptik ekstrak merupakan pendeskripsian bentuk, warna, bau, rasa dengan menggunakan pancaindra. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan pengenalan awal yang sederhana dan seobyektif mungkin (Depkes RI, 2000).

2.6.2.3 Senyawa Terlarut Dalam Pelarut Tertentu

Parameter senyawa terlarut dalam pelarut tertentu ditentukan dengan cara melarutkan ekstrak dengan pelarut (alkohol atau air) untuk ditentukan jumlah solut yang identik dengan

jumlah senyawa kandungan secara gravimetri. Dalam hal tertentu dapat diukur senyawa yang terlarut dalam pelarut lain, misalnya heksana, diklorometan, metanol. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan (Depkes RI, 2000).

2.6.2.4 Kadar Senyawa Kimia Tertentu

Dengan tersedianya suatu kandungan kimia yang berupa senyawa identitas atau senyawa kimia utama ataupun kandungan kimia lainnya, maka secara kromatografi instrumental dapat dilakukan penetapan kadar kandungan kimia tersebut. Instrumen yang dapat digunakan adalah Densitometer, Kromatografi Gas, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau instrumen lain yang sesuai. Metode penetapan kadar harus diuji dulu validitasnya, yaitu batas deteksi, selektivitas, linieritas, ketelitian, ketepatan dan lain-lain. Penentuan kadar senyawa identitas ini dapat memberikan data kadar kandungan kimia tertentu sebagai senyawa identitas atau senyawa yang diduga bertanggung jawab pada efek farmakologi (Depkes RI, 2000).

2.5 Tinjauan tentang Kromatografi

2.6.1 Kromatografi secara Umum

Kromatografi merupakan salah satu metode pemisahan yang memungkinkan peneliti untuk mengidentifikasi, memisahkan, dan memurnikan komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Pemisahan dalam kromatografi ditunjang oleh adanya fase diam dan fase gerak. Prinsip dari kromatografi adalah proses penarikan komponen zat berkhasiat dan zat lain yang ada di fase diam oleh fase gerak yang berdasarkan proses partisi, adsorpsi, dan pertukaran ion. Kromatografi terbagi menjadi kromatografi kolom dan kromatografi planar. Berdasarkan fase geraknya kromatografi kolom terbagi menjadi kromatografi cair dan kromatografi gas (Skoog, 1985).

2.6.2 Kromatografi lapis tipis

Digunakan pada pemisahan zat secara cepat, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca. Pemisahan didasarkan pada penyerapan, pembagian atau gabungannya, tergantung dari zat penyerap dan cara pembuatan lapisan zat penyerap dan jenis pelarut (Markham, 1988). Pada dasarnya teknik KLT adalah sebagai berikut : larutan sampel ditotolkan di dekat ujung fase diam, yaitu lapisan tipis penyerap,

sebagai zona awal. Sampel kemudian dikeringkan. Fase diam yang sudah mengandung totalan sampel tersebut kemudian diekspansi dengan fase geraknya, biasanya merupakan campuran dari 2 sampai 4 pelarut murni, di dalam bejana tertutup. Jika lapisan penyerap dan fase geraknya tepat, komponen – komponen dalam campuran pelarut akan bermigrasi dari fase gerak melewati fase diam. Jika fase gerak telah bermigrasi pada jarak yang ditentukan, fase diam diangkat dan dikeringkan, dan zona bercak di deteksi dengan penglihatan langsung atau dengan lampu ultraviolet, dengan atau tanpa penampak noda yang sesuai. Macam–macam fase diam yang sering digunakan di KLT adalah silika gel, selulosa, alumina, silikon dioksida inert, poliamida dan sephadex (Sherma, 2003).

Mekanisme partisi adalah campuran yang akan dipisahkan, didistribusikan diantara dua fase cair yang tidak saling campur. Hal ini berdasarkan perbedaan kelarutan relatif dari masing-masing komponen dan fase gerak.

Sebagai parameter untuk menentukan letak noda pada KLT adalah harga R_f yaitu hasil bagi jarak noda dari titik awal dengan jarak yang ditempuh pelarut dari titik awal.

$$R_f = \frac{\text{Jarak noda dari titik awal}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Setiap zat akan memiliki nilai R_f yang spesifik dengan fase gerak dan fase diam tertentu (Skoog, 1985)

2.6.3. Tinjauan tentang Densitometer

Densitometri adalah metode analisis instrumental yang berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan noda pada KLT. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada KLT yang ditentukan adalah absorpsi, transmisi, pantulan (refleksi) pendar fluor atau pemadaman pendar fluor dari radiasi semula. Densitometri lebih dititik beratkan untuk analisis kuantitatif analit-analit dengan kadar yang sangat kecil yang perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu dengan KLT. Prinsip analisis kuantitatif dengan metoda densitometri hampir sama dengan spektrofotometri. Penentuan kadar analit yang dikorelasikan dengan area noda pada KLT akan lebih terjamin kesahihannya dibanding metode KCKT (Kromatografi cair kinerja tinggi) atau KGC (Kromatografi Gas) sebab area noda kromatogram

diukur pada posisi diam atau zigzag menyeluruh. Korelasi kadar analit pada noda kromatogram yang dirajah terhadap area tidak menunjukkan garis lurus tetapi merupakan garis lengkung mendekati parabola (Stahl, 1969).

2.7 Tinjauan Tentang Validasi Metode Analisis

2.7.1 Selektivitas

Langkah pertama yang harus dilakukan ialah memastikan bahwa puncak/noda kromatogram KLT tidak terganggu dengan zat pengotor tertentu, seperti eksipien obat, hasil degradasi analit, blanko cairan biologis atau metabolit lainnya maupun zat lain yang strukturnya mirip. Jika puncak analit terkontaminasi dengan zat lain, maka hasil analisis yang diperoleh akan menyimpang dari keadaan sebenarnya. Resolusi analit dengan zat lain sebaiknya kurang lebih 1,5. Bila resolusinya kecil ($< 1,2$) perlu dilakukan optimalisasi lagi dari kondisi kromatografi yang dilakukan (Indrayanto, 1994).

2.7.2 Linearitas dan Homogenitas

Linieritas dari suatu prosedur analisis adalah kemampuan (dalam range yang diberikan) untuk menunjukkan hasil analisa secara langsung dan proporsional dengan konsentrasi (jumlah) analit dalam sampel. Penentuan linieritas dilakukan minimum 5 konsentrasi. Linieritas suatu metode harus diuji untuk menentukan adanya hubungan korelasi antara konsentrasi analit dengan respon detektor. Untuk menyatakan adanya korelasi atau tidak menggunakan parameter koefisien korelasi (r), pada analisis regresi $y = bx + a$. Parameter lain yang perlu ditentukan untuk mengevaluasi linieritas menurut Funk et al.(1992) adalah deviasi rata-rata dari garis regresi (Sy), standar deviasi fungsi (Sxo) dan koefisien variasi dari fungsi (Vxo).

$$Sy = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{N - 2}} \quad \text{dimana } y_i = a + b x_i$$

$$Sxo = \frac{Sy}{b} \quad Vxo = \frac{Sxo}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Selain itu perlu dibuktikan homogenitas dari kurva linier dengan melakukan analisis ($n = 10$) pada konsentrasi analit tertinggi dan konsentrasi analit terkecil. Kemudian dilakukan perhitungan harga F hitung. Harga F hitung harus lebih kecil dari F tabel. Bila harga F hitung

lebih besar dari F tabel, maka percobaan harus diulang untuk meneliti kesalahan yang dilakukan (Indrayanto, 1994).

$$F = \frac{S_N^2}{S_I^2} ; F < F \text{ tabel} \qquad S^2 = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N - 1} \text{ (Harmita, 2004)}$$

dimana; N = Konsentrasi terbesar; I = Konsentrasi terkecil; \bar{y} = rata-rata area

2.7.3 LOD dan LOQ

Limit deteksi (LOD) merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat memberikan respon yang signifikan dibandingkan blangko. Sedang yang dimaksud dengan Limit kuantitasi (LOQ) adalah jumlah analit terkecil yang dapat ditentukan dengan presis dan akurasi tertentu. LOD dan LOQ mutlak ditentukan pada analit yang mempunyai konsentrasi yang relatif kecil.

Untuk penentuan LOD dan LOQ pada suatu metode analisis, maka pertama kali harus ditentukan harga S/N dahulu (S=signal, N=noise). Menurut Wahlich dan Carr (1990), harga S/N dapat dihitung dengan mengukur fluktuasi kromatogram blangko yang terbesar pada daerah 20 x lebar puncak pada ½ tinggi dari puncak analit (N) dan mengukur tinggi puncak analit (S). Untuk membedakan antara puncak analit dan blangko maka harga S/N harus tidak boleh kurang dari 5. Kemudian membuat suatu seri konsentrasi analit (4-5 konsentrasi) yang relatif kecil dan dihitung tinggi kromatogramnya, dan kemudian dibuat kurva regresinya (Slopanya = *Sl*). Menurut Warlich dan Carr, harga LOD dan LOQ dapat dihitung menurut rumus:

$$Q = \frac{k \cdot sb}{Sl} ; \text{dimana harga } sb = N/5, k = 3 \text{ untuk LOD dan } k = 10 \text{ untuk LOQ (Indrayanto, 1994).}$$

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (S_y).

$$Q = \frac{k \cdot S_y}{Sl} ; k = 3 \text{ untuk LOD dan } k = 10 \text{ untuk LOQ (Harmita, 2004).}$$

2.7.4. Presisi

Presisi suatu metode dapat ditentukan dengan melakukan analisis sampel yang sama berulang kali. Edwardson et al. (1990) menyarankan analisis dilakukan 10 kali dan harga RSD (Relative Standard Deviation)/KV (Koefisien Variasi) tidak boleh lebih besar dari 2 %. Bila suatu metode harga RSD-nya lebih besar dari 2 % maka metode ini perlu divalidasi lagi (Indrayanto, 1994).

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

2.7.5. Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan kedekatan hasil analisis dengan nilai sebenarnya. Akurasi dihitung dengan persen rekovery yang dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit yang telah diketahui kadarnya pada sampel. Untuk analisis sediaan obat sebaiknya % rekovery berkisar antara 98 -102 %, tetapi angka 95-105 % sudah cukup memadai untuk suatu laboratorium QC di industri farmasi (Indrayanto, 1994).

2.8 Tinjauan tentang kanker payudara

Kanker payudara merupakan tumor ganas dan menduduki peringkat kedua setelah kanker leher rahim di antara kanker yang menyerang wanita Indonesia. Di Indonesia, prevalensi kanker payudara meningkat, jumlahnya mencapai 11,6 % dari seluruh keganasan. Prevalensi ini cenderung meningkat disebabkan perubahan pola hidup di antaranya perubahan pola makanan dengan mengkonsumsi lemak tinggi dan peningkatan kesadaran masyarakat tentang kesehatan serta kemajuan teknologi kedokteran di bidang diagnosis dini (www.pitapink.com, 2005).

Pada tahun 2006, kurang lebih 212.980 wanita di Amerika Serikat didiagnosis menderita kanker payudara. Meskipun kanker payudara pada pria jarang terjadi dan jumlahnya kurang dari satu persen, tahun ini telah terdiagnosa sebanyak 1300 pria menderita kanker payudara (www.sciencedirect.com, 2003).

Kanker payudara tergolong tumor ganas. Tumor ganas mempunyai sifat yang khas yaitu dapat menyebar luas ke bagian lain di seluruh tubuh untuk berkembang menjadi tumor yang baru. Penyebaran ini disebut metastase. Kanker memiliki karakteristik yang berbeda-beda. Ada yang tumbuh secara cepat, ada yang tumbuh tidak terlalu cepat, seperti kanker payudara. Khusus

untuk kasus kanker payudara, sel kanker yang pertama dapat tumbuh menjadi tumor sebesar 1 cm pada waktu 8-12 tahun. Sel kanker tersebut diam pada kelenjar payudara (www.sciencedirect.com, 2003).

Sel-sel kanker payudara ini dapat menyebar melalui aliran darah ke seluruh tubuh. Sel kanker payudara dapat bersembunyi di dalam tubuh selama bertahun-tahun tanpa diketahui dan tiba-tiba aktif menjadi tumor ganas atau kanker. Pada tahap awal kanker payudara, penderita tidak merasakan sakit atau tidak ada tanda-tandanya sama sekali. Namun, ketika tumor semakin membesar, akan timbul gejala-gejala seperti : benjolan yang tidak hilang atau permanen, biasanya tidak sakit dan terasa keras bila disentuh atau penebalan pada kulit payudara atau di sekitar ketiak; perubahan ukuran atau bentuk payudara; kerutan pada kulit payudara; keluarnya cairan dari payudara, umumnya berupa darah, nanah, cairan encer atau keluar air susu pada ibu yang tidak hamil atau tidak sedang menyusui; serta adanya pembengkakan atau tarikan pada puting susu (www.pitapink.com, 2005).

2.9 Tinjauan tentang antikanker

Obat antikanker adalah senyawa kemoterapeutik yang digunakan untuk pengobatan tumor yang membahayakan kehidupan. Obat antikanker sering dinamakan pula sebagai obat sitotoksik, sitostatik atau antineoplasma (Soekardjo, 2000). Obat antikanker yang ideal adalah yang mampu membunuh sel-sel kanker saja tanpa membahayakan sel-sel yang normal. Sampai saat ini belum ada obat yang mampu memenuhi kriteria tersebut. Oleh karena itu, penggunaan kliniknya dilakukan dengan memperhitungkan keuntungan atau kemanfaatannya dibandingkan efek toksisitasnya untuk dapat mencapai terapi yang optimal (Katzung, 1995).

Obat antikanker banyak yang bekerja dengan cara mempengaruhi metabolisme asam nukleat, terutama DNA atau biosintesis protein. Antikanker diharapkan memiliki toksisitas yang selektif, artinya menghancurkan tanpa merusak jaringan normal. Pada umumnya antineoplastik menekan pertumbuhan atau proliferasi sel dan menimbulkan toksisitas karena menghambat sel yang proliferasinya cepat seperti sumsum tulang, epitel germinativum, mukosa saluran cerna dan folikel rambut. Antikanker berhasil baik bila dosis yang digunakan dapat mematikan sel kanker dan tidak terlalu mengganggu sel normal yang berproliferasi (Nafrialdi dan Ganiswara, 1995).

Obat antikanker dapat mempengaruhi proses kehidupan sel. Proses kehidupan sel merupakan suatu siklus yang terdiri dari beberapa fase sebagai berikut :

1. Fase mitotik (M) : fase pembelahan sel aktif

Setelah melalui fase ini ada dua alternatif yaitu :

a. Menuju fase G1 dan melalui proses proliferasi

b. Masuk ke fase istirahat (Go), kemampuan sel untuk berproliferasi hilang dan sel meninggalkan siklus secara tak terpulihkan.

2. Fase post mitotik (G1), pada fase ini tidak terjadi sintesis DNA tetapi terjadi sintesis RNA dan protein. Pada akhir fase G1 terjadi sintesis RNA yang optimum.

3. Fase sintetik (S), pada fase ini terjadi replikasi DNA sel

4. Fase post sintetik (G2), fase ini dimulai bila sel sudah tetraploid dan mengandung 2 DNA, kemudian sintesis RNA dan protein dilanjutkan. Selanjutnya sel kembali ke fase mitotik, demikian seterusnya sehingga merupakan suatu siklus.

Obat antikanker dibagi menjadi lima kelompok yaitu senyawa pengalkilasi, antimetabolit, antikanker produk alam, hormon dan golongan lain.

1. Senyawa pengalkilasi

Senyawa pengalkilasi adalah senyawa reaktif yang dapat mengalkilasi ADN, ARN dan enzim-enzim tertentu. Senyawa ini terutama digunakan untuk pengobatan kanker pada jaringan limfoid dan sistem retikuloendotel, seperti limfosarkoma dan penyakit Hodkin, leukimia limfositik dan mieloma.

Contoh : mekloretamin, klorambusil, melfalan, busulfan.

2. Antimetabolit

Antimetabolit adalah senyawa yang dapat menghambat jalur metabolit yang penting untuk kehidupan dan reproduksi sel kanker, melalui penghambatan asam folat, purin, pirimidin dan asam amino, serta jalur nukleosida pirimidin, yang diperlukan pada sintesis ADN.

Contoh : antagonis pirimidin (5-fluorourasil, tegafur, sitarabin), antagonis purin (6-merkaptopurin, azatioprin, 6-tioguanin), antagonis asam folat (aminopterin, metotreksat, ketotreksat), antagonis asam amino (azaserin, DON).

3. Antikanker Produk Alam

Antikanker produk alam adalah senyawa yang dihasilkan dari produk alam dan berkhasiat sebagai antikanker.

Contoh : antibiotika antikanker (mitomisin C, daktinomisin, plikamisin), antikanker produk tanaman (vinblastin sulfat, vinkristin sulfat, etoposida), antikanker produk rekayasa genetika (antineoplaston, avaron, interferon α -2a).

4. Hormon

Beberapa neoplasma dapat dikontrol dengan baik oleh hormon seks, seperti hormon androgen, progesterin dan estrogen serta hormon adrenokortikoid. Biasanya untuk pengobatan tambahan sesudah pembedahan, dikombinasi dengan obat antikanker yang lain.

Contoh : tamoksifen sitrat, flutamid, megestrol asetat.

5. Golongan Lain-Lain

Contoh : mitotan, L-Asparaginase, sisplatinum, hidroksiurea (Soekardjo, 2000).

2.10 Tinjauan tentang kultur sel

Kultur sel merupakan kultur yang diperoleh dari hasil dispersi sel jaringan hidup. Jaringan yang akan digunakan dipecah-pecah melalui proses enzimatik, kimiawi ataupun secara mekanis untuk menghasilkan suspensi sel, yang kemudian ditanam ke dalam media yang sesuai. Kultur ini disebut sebagai kultur sel primer. Hasil pembiakan secara berulang-ulang ataupun hasil transformasi dari kultur sel primer disebut *cell line*. Pemisahan kultur *cell line* berdasarkan karakteristik tertentu akan menghasilkan kelompok-kelompok tertentu yang disebut *strain cell* (Freshney, 1987).

Pada kultur sel, sel yang akan diteliti ditempatkan dalam wadah kultur yang memiliki permukaan pertumbuhan dan nutrisi yang cukup sebagai media kultur, 37°C, lingkungan gas (5 % CO₂ / 95 % O₂) dan pH 7,4-7,7 (Spector, 1998).

Keuntungan penggunaan sistem kultur ini antara lain terletak pada segi kontrol lingkungan fisika kimia yang lebih tepat dan kondisi biologis yang relatif konstan. Selain itu karakterisasi dan homogenitas sampel dari sistem kultur sel jauh lebih baik dibandingkan jaringan hidup dari hewan. Secara ekonomi, penggunaan sistem kultur sel ini juga lebih menguntungkan karena pereaksi yang digunakan lebih sedikit, konsentrasi larutan uji lebih kecil dan bahan uji yang digunakan lebih sedikit (Freshney, 1987).

Di sisi lain, kerugian yang ditimbulkan dari kultur sel ini tidak sedikit. Diantaranya karena teknik ini harus dikerjakan pada kondisi aseptik sehingga memerlukan keahlian khusus.

Selain itu, biaya yang dihabiskan dalam penelitian menggunakan kultur sel lebih banyak daripada bila dilakukan pada hewan coba (Freshney, 1987).

2.11 Tinjauan tentang metode MTT

Salah satu metode pewarnaan pada viabilitas sel yang berkembang saat ini adalah metode MTT atau 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (www.bmrservice.com, 2007). Metode ini pada mulanya berkembang dari metode cepat untuk pertumbuhan dan kehidupan dari sel limfoma mamalia berdasarkan perubahan dan pemeriksaan kolorimetri (Freimoser, et al, 1999).

Metode kolorimetri dengan MTT ini digunakan untuk mengetahui kemampuan sel hidup dengan cara mengubah garam tetrazolium (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yang larut menjadi tidak larut. Pada proses reaksi akan terjadi perubahan dari garam berwarna kuning menjadi kristal berwarna biru formazan yang memisah dan dapat diamati dengan spektrofotometer (www.bdbiosciences.com, 2007). Dehidrogenase mitokondria yang aktif pada sel hidup diyakini yang dapat menyebabkan perubahan ini. Formazan yang tidak larut air dapat dilarutkan menggunakan DMSO atau isopropanol dan bahan-bahan yang terpisah dapat diamati dengan spektrofotometer yang menghasilkan serapan sebagai fungsi dari konsentrasi warna yang berubah (www.bmrservice.com, 2007). Dari hasil tersebut akan dapat ditaksir jumlah mitokondria dan jumlah sel yang hidup dalam sampel. Cara ini dapat memberikan keuntungan pada uji sitotoksitas atau metode proliferasi sel yang digunakan secara luas pada imunologi, toksikologi dan biologi sel (Freimoser, et al, 1999).

Larutan MTT ditambahkan ke dalam kultur sebanyak 1/20 atau 1/40 dari jumlah volume media dan dinkubasi selama 20-30 menit. Serapan dari perubahan warna diamati pada panjang gelombang 550 - 600 nm (www.atcc.com, 2001).

Metode MTT ini memiliki beberapa keuntungan, antara lain cepat dan mempunyai reproduibilitas yang tinggi sesuai untuk skrining pada skala besar, artinya relevan untuk hampir semua sel, MTT berhubungan dengan protein seluler dan jumlah sel hidup serta metode MTT lebih sensitif.

2.12 Tinjauan tentang viabilitas sel

Adanya pemaparan bahan-bahan toksik terhadap sel dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel. Kemampuan sel untuk bertahan hidup terhadap bahan-bahan toksik inilah yang digunakan sebagai dasar dilakukannya uji sitotoksisitas dan salah satunya dengan *cell viability test*. Kerusakan atau kematian sel diikuti dengan adanya perubahan integritas membran yang diketahui dengan menggunakan pewarnaan. Sel yang mati bersifat permeabel terhadap warna tertentu sehingga dapat menyerap warna sedangkan sel yang hidup bersifat impermeabel dan tidak dapat menyerap warna. Viabilitas sel dinyatakan sebagai prosentase sel yang hidup atau yang tidak terwarnai (Freshney, 1987).

Secara garis besar, metode penentuan viabilitas sel digolongkan menjadi dua, yaitu berdasarkan :

1. Penentuan respon singkat atau respon jangka pendek
2. Penentuan respon jangka panjang atau respon yang bersifat permanen

Penentuan viabilitas sel berdasarkan adanya respon jangka pendek atau respon singkat digunakan untuk menentukan jumlah sel yang hidup setelah dilakukannya prosedur penelitian yang berpotensi menyebabkan terjadinya kerusakan sel, seperti disagregasi jaringan, pemisahan sel serta pembekuan dan pengaktifan kembali kultur sel yang telah dibekukan. Sedangkan penentuan viabilitas sel berdasarkan respon jangka panjang atau respon yang bersifat permanen digunakan jika efek yang dihasilkan oleh sebuah perlakuan pada tahapan penelitian hanya akan ditunjukkan setelah beberapa jam atau hari setelah perlakuan (Freshney, 1987).

Zat warna yang dapat digunakan untuk mengindikasikan kematian sel antara lain nigrosin, tripan biru dan eritrosin (Freshney, 1987). Untuk menghitung jumlah sel dapat digunakan metode atau alat, antara lain :

1. *cell counting*

ada beberapa metode *cell counting* yang dapat digunakan, antara lain :

- hemositometer
- *electronic particle counting*
- *coulter counting*

2. *cell weight*

3. *DNA content*

2.13 Tinjauan tentang etoposida

Etoposida merupakan derivat semisintetik podophyllotoksin yang berasal dari tanaman *Podophyllum peltatum*. Etoposida merupakan salah satu obat kemoterapi kelompok *DNA Topoisomerase II Inhibitor*. *DNA Topoisomerase II Inhibitor* merupakan kelompok obat sitotoksik poten yang banyak digunakan dan dikenal sebagai penginduksi apoptosis. Tahapan pertama dari apoptosis yang disebabkan oleh induksi etoposida diketahui berawal dari interaksi obat ini dengan *DNA Topoisomerase II*. Namun, mekanisme detilnya belum diketahui. Penghambatan *DNA Topoisomerase II* terjadi pada fase G2 dan fase S akhir sehingga etoposida menghentikan siklus sel dan membunuh sel pada fase G2 dan akhir fase S. Interaksi ini menyebabkan rusaknya DNA. Efek sitotoksik etoposida diduga berkaitan dengan perusakan DNA tersebut (www.drugbank.com, 2006).

Etoposida digunakan untuk pengobatan karsinoma paru, kanker testis, kariokarsinoma, leukemia mielogenous akut dan limfoma. Etoposida dapat meningkatkan kerja antikoagulan oral, selain itu phenylbutazon, sodium salisilat dan asam salisilat dapat mempengaruhi ikatan protein etoposida. Etoposida dapat memberikan efek potensiasi sitotoksik dan supresi batang otak. Kandungan etoposida mempunyai efek genotoksik yang bisa menyebabkan kecacatan pada pertumbuhan embrio dan terbukti mengakibatkan teratogenik dan mempunyai efek mutagenik pada hewan (Siswandono, 2000).

2.14 Tinjauan Tentang Apoptosis.

Apoptosis merupakan program bunuh diri dari sebuah sel. Program ini memiliki peran yang penting untuk menjaga homeostatis perkembangan – biakan sel dan dengan adanya disregulasinya bisa berakibat timbulnya macam-macam penyakit (Evan dan Littlewood, 1998). Salah satu peran pentingnya adalah untuk membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan yang sekiranya akan dapat menyebabkan kanker. Pada sel-sel kanker program apoptosis ini telah mengalami gangguan sehingga sel akan mengalami metastasis (Peter *et al*, 1997).

Apoptosis merupakan mekanisme alamiah yang dialami oleh sel. Ada dua alasan utama mengapa sel melakukan mekanisme itu. Pertama apoptosis memang diperlukan untuk proses pertumbuhan atau perkembangan sel, jaringan atau organ lebih lanjut. Hal ini dapat dilihat pada peristiwa pemutusan ekor kecebong sebelum menjadi katak atau penghilangan selaput diantara jari-jari tangan pada janin di dalam rahim. Alasan kedua adalah untuk menghancurkan sel-sel

yang dianggap membahayakan bagi integritas organisme itu sendiri, seperti sel yang terinfeksi oleh virus, sel dengan kerusakan DNA maupun sel kanker (Meier, 2000; Nagata, 1977).

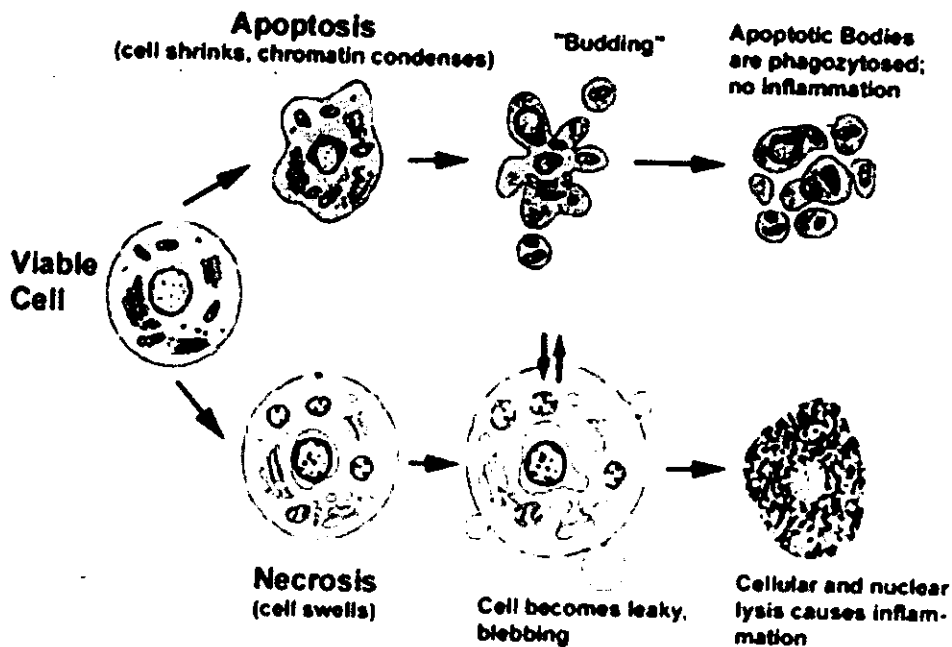
Proses apoptosis memiliki kegunaan yang luas dalam proses biologi, seperti pada proses perkembangan, diferensiasi, proliferasi atau homeostatis, regulasi, fungsi sistem imun, perbaikan kecacatan karena pengaruh sel yang berbahaya. Kelainan fungsi ataupun disregulasi dari program apoptosis dapat berimplikasi pada beberapa kondisi patologis atau penyakit. Disregulasi dari apoptosis dapat menyebabkan berbagai penyakit antara lain: penyakit kanker, penyakit autoimmune, penyebaran infeksi virus, *neurodegenerative disorders*, AIDS dan penyakit *ischemia* karena proses apoptosis yang meningkat dan berlebihan (Fadeel, 1999).

Apoptosis memiliki arti penting dalam proses biologi, kematian sel terprogram menunjukkan fenomena yang luas, termasuk terjadi pada semua *metazoans* (Tittel, 2000) seperti pada mamalia, insekta (Richardson, 2002), nematoda (Liu, 1999b) dan cnidaria (Cikala, 1999). Selain itu, kematian sel terprogram berperan juga dalam biologi tanaman (Solomon, 1999) dan kematian sel yang mirip kematian sel terprogram bisa diamati pada model atau sistem ragi (Frohlich, 2000; Skulachev, 2002). Pada perkembangannya apoptosis bisa terjadi evolusi dari keadaan asal, di mana kematian sel terprogram menjadi bagian integral dari siklus hidup eukaryota seperti pada parasit kinetoplastida yaitu *Trypanosoma brucei brucei*, *Tetrahymena thermophila*, *Dictyostelium discoideum* dan bahkan terjadi pada prokaryota seperti *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* and *Myxobacteria*) yang kadang-kadang mengarah pada kematian sel yang diatur (Ameisen, 2002).

2.14.1 Bentuk Morfologi dari Apoptosis

Sel yang mengalami apoptosis dapat dikenali dari perubahan stereotipikal morfologinya, seperti sel mengkerut, terlihat adanya perubahan bentuk dan terjadi kehilangan kontak antar sel tetangga. Terjadi kondensasi atau pepadatan kromatin dan terjadinya peminggiran pada membran inti, terjadi *blebbing* atau *budding* pada membran plasma, dan akhirnya sel terbagi-bagi kedalam struktur yang kompak dengan membran yang *enclosed* (kepingan sel mati), yang disebut dengan '*apoptotic bodies*' atau badan apoptotik dengan kandungan sitosol, kromatin yang memadat dan organel-organel. Selanjutnya *apoptotic bodies* ditelan oleh makrofag, dan

akan dipindahkan dari jaringan tersebut tanpa menyebabkan respon inflamasi. Sehingga perubahan morfologi merupakan konsekuensi dari karakteristik molekular dan proses biokimia yang terjadi di dalam sel apoptosis, yang secara khusus mengaktifkan enzim-enzim proteolitik yang menyebabkan terjadinya pemotongan DNA kedalam bentuk fragmen-fragmen *oligonucleosomal*, seperti halnya dalam pemotongan substrat protein spesifik yang akan menentukan integritas dan bentuk sitoplasma atau organel-organel (Saraste, 2000).



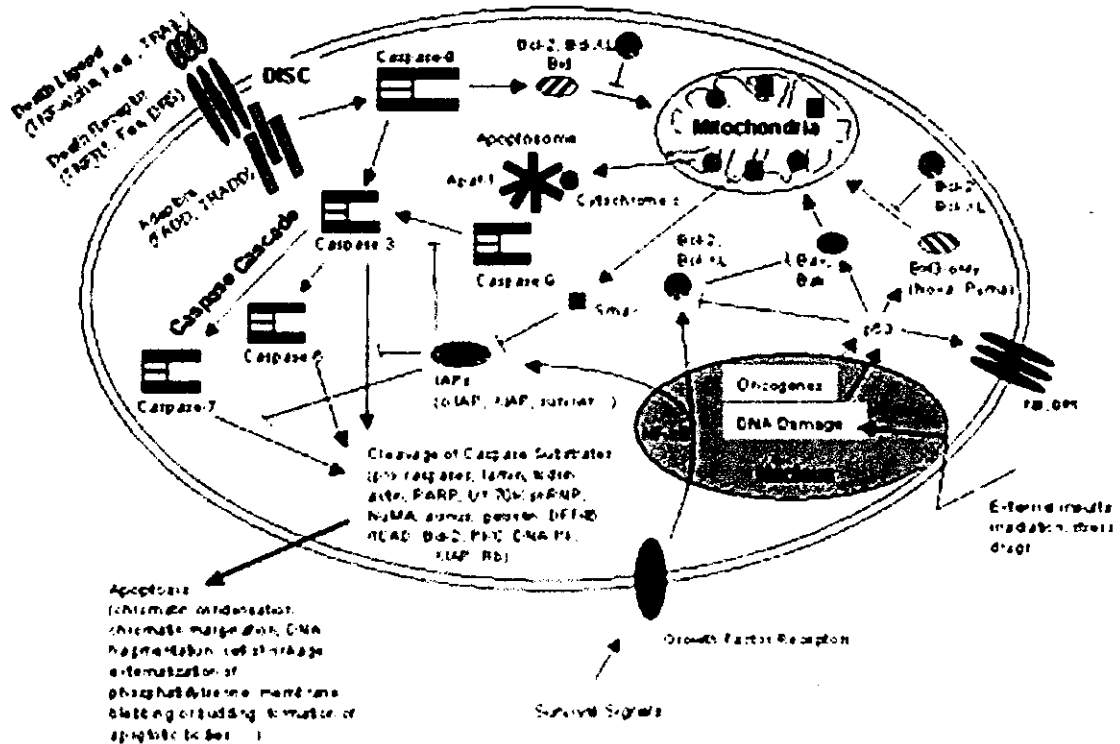
Gambar 2.7 Perbedaan morfologi sel apoptosis dan nekrosis (Saraste, 2000 ; Leist, 2001a).

Apoptosis beda dengan kematian nekrosis di mana sel akan kehilangan integritas membran, *swelling* atau mengembang dan *disrupture* dari sel. Selama nekrosis, kandungan sel akan terlepas secara tidak terkontrol kedalam lingkungan sel dan akibatnya menimbulkan kerusakan sekitar sel dan menyebabkan respon inflamasi yang sangat kuat di dalam jaringan (Leist, 2001a).

2.14.2 Jalur ekstrinsik dan instrinsik apoptosis

Beberapa faktor yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis dapat diklasifikasi menjadi dua kelompok besar, yaitu rangsangan instrinsik dan ekstrinsik. Kerusakan DNA, stress

oksidatif dan hipoksia dapat merangsang terjadinya apoptosis dari dalam sel itu sendiri sehingga mengaktifkan apoptosis melalui jalur mitokondria (jalur instrinsik). Sedangkan dari luar sel adalah *death factor*, seperti TNF- α (*Tumor Necrosis Factor -alpha*), limfotoksin dan *Fas ligand* (FasL) serta kurang atau tidak adanya *survival factor*, seperti interleukin-2 dan interleukin-3, dapat mengaktifkan apoptosis melalui jalur *growth factor* (jalur ekstrinsik). Obat kemoterapi antikanker yang bersifat *genotoxic* seperti etoposida dan radiasi sinar gamma dapat menyebabkan kerusakan pada DNA sel kanker maka gen p53 sebagai gen supresor tumor akan terakumulasi, menghentikan replikasi DNA pada *check point* dan memberi kesempatan kepada DNA untuk memperbaiki diri. Bila proses perbaikan gagal, p53 akan merangsang mitokondria mengeluarkan sitokrom c ke sitosol, dan dalam hal ini akan dihalangi oleh *anti-apoptosis member* yaitu gen bcl-2. Di dalam sitosol sitokrom c bersama dengan *Apoptosis Protease Activating Factor-1* (Apaf-1) dan pro-caspase 9 membentuk caspase 9, kompleks ini disebut *apoptosome*. Terbentuk caspase 9 sebagai caspase awal akan mengaktifkan caspase eksekusioner, yaitu caspase 3, 6 dan 7 sehingga dapat menyebabkan kematian sel secara apoptosis (Nagata, 1998; Cotran, 1999).



Gambar 2.8 Skema sinyal transduksi dari apoptosis (Nagata, 1997)

Hubungan antara p53 dengan apoptosis diatas memang memiliki peran besar dalam timbulnya apoptosis , dimana p53 sendiri dikenal sebagai *tumor suppressor gene* dimana telah dibuktikan bahwa p53 mengalami mutasi pada lebih 50% tumor dan mengalami hambatan fungsi pada sebagian tumor yang lain. Hal itu terjadi karena p53 berperan besar dalam mengatur siklus sel, perbaikan DNA dan aktivasi bax. Struktur p53 terdiri dari gugus N-terminal transaktivasi, gugus kaya prolin , gugus *DNA-binding* spesifik, gugus tetramerisasi, dan ekor *basic C-terminal*. Gugus N-terminal transaktivasi berguna untuk pengaturan stabilitas p53 di dalam sel sel, gugus kaya prolin berguna untuk menekan pertumbuhan sel, gugus *DNA-binding* spesifik berguna untuk menempelnya p53 pada DNA di mana penempel ini berefek menghambat proses transkripsi, dan gugus ekor *basic C-terminal* berfungsi untuk menempelnya p53 pada rantai tunggal DNA di mana hal ini menyebabkan p53 dapat berfungsi lebih lanjut pada proses berhentinya siklus sel, aktivasi GADD45 pada proses perbaikan DNA, dan aktivasi bax pada apoptosis. Serangkaian fungsi inilah yang membuat p53 dinobatkan sebagai *tumor suppressor gene* (Burn & El-Deirey, 1999 ; Cotran, 1999). Dalam sel yang tenang kadar p53 akan dijaga untuk tetap stabil rendah dan tidak aktif. Pada dasarnya jenis p53 ini (*wildtype* p53) memiliki waktu paruh yang sangat singkat , sekitar 20-30 sehingga jarang terdeteksi pada sel yang tidak mengalami stress. Bila sel mengalami stress akibat bahan-bahan – bahan perusak DNA seperti radiasi, hipoksia, hipoglikemia, obat-obat kemoterapi maka p53 akan mengalami stabilisasi sehingga masa hidup lebih lama guna mengatur berhentinya siklus sel, perbaikan DNA dan apoptosis (Burn & El-Deirey, 1999).

BAB III.

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Bahan

Bahan rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) diperoleh dari Mojokerto, Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berderajat pro analisa kecuali metanol. Bahan kimia dapat dilihat pada rincian anggaran bahan kimia.

3.2. Alat

Maserator, rotavapour, inkubator CO₂, elektroforesa, water bath inkubator, sentrifuse, mikroskop biasa dan flouresent, HPLC, spektrofotometer : UV, FTIR, NMR, MS dan densitometer

3.3. Tahapan Penelitian

3.3.1. Standarisasi simplisia

a. Standarisasi simplisia kencur dan sambiloto digunakan metode Materia Medika Indonesia, Dep Kes RI yang meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis simplisia, penetapan kadar abu, penetapan kadar abu tidak larut asam, kadar abu larut air, kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar air, penetapan susut pengeringan.

b. Penetapan kadar senyawa marker etil-parametoksinamat dari simplisia rimpang kencur dan andrografolida dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees). Metode penetapan kadar dilakukan dengan metode KLT- densitometri, untuk memperoleh data pengukuran yang valid maka perlu dilakukan : (1) penentuan selektifitas pelarut (2) Penentuan panjang gelombang maksimum (3) Linieritas (4) Homogenitas (5) Penentuan batas deteksi (LOD) batas kuantitasi (LOQ) (6) Akurasi dan (7) Presisi.

c. Pengukuran cemaran pestisida, pengukuran residu pelarut, penentuan cemaran aflatoxin dilakukan dengan metode HPLC, pengukuran cemaran logam berat dilakukan dengan metode AAS, sedangkan untuk cemaran mikroba ditentukan dengan metode mikrobiologi.

3.1.2. Ekstraksi dan Pembuatan Ekstrak Terpurifikasi serta Standarisasi Ekstrak Terpurifikasi

a. Ekstraksi Serbuk Kencur dan Sambiloto

Serbuk kering bahan simplisia diekstraksi dengan etanol (96%) dengan metode maserasi, secara terpisah. Ekstrak etanol cair diuapkan dengan evaporator sampai diperoleh ekstrak kental. Sehingga diperoleh ekstrak etanol kencur, dan ekstrak etanol sambiloto.

b. Pembuatan Ekstrak Terpurifikasi

Pembuatan ekstrak terpurifikasi dari ekstrak etanol kencur dilakukan dengan cara, ekstrak etanol ditambah aquadest (1 : 1 v/v) kemudian dilakukan partisi dengan etil asetat (

perbandingan 3 : 1 v/v) dengan menggunakan corong pisah. Partisi dilakukan secara bertahap, sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan kemudian dievaporator sampai diperoleh fraksi etil asetat pekat, yang selanjutnya ditambah dispersi padat PEG - 6000, Cabo-Sil dan laktosa dengan perbandingan tertentu, sehingga diperoleh ekstrak terpurifikasi kencur dengan kandungan utama etil-parametoksinamat.

Pembuatan ekstrak terpurifikasi dari ekstrak etanol sambiloto dilakukan dengan cara, ekstrak etanol ditambah aquadest (1 : 1) kemudian dilakukan partisi dengan heksan dengan menggunakan corong pisah, sebanyak 3X, fraksi heksan dibuang. Kegunaan penambahan heksan adalah untuk menghilangkan klorofil. Selanjutnya ekstrak cair ditambah dengan etil asetat dengan menggunakan corong pisah. Partisi dilakukan secara bertahap, sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan kemudian dievaporator sampai diperoleh fraksi pekat, yang selanjutnya ditambah dispersi padat PEG -6000, Cabo-Sil dan laktosa dengan jumlah dan perbandingan tertentu, sehingga diperoleh ekstrak terpurifikasi sambiloto dengan kandungan utama andrografolida.

c. Standarisasi Ekstrak Terpurifikasi Kencur dan Sambiloto.

Standarisasi ekstrak terpurifikasi kencur dan sambiloto digunakan metode Pedoman Umum Standart Ekstrak, DepKes RI, yang meliputi : pengamatan organoleptis, penetapan kadar abu, penetapan kadar abu tidak larut asam, kadar abu larut air, kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar air, penetapan susut pengeringan.

Penetapan kadar senyawa marker etil - p metoksisinamat dari simplisia rimpang kencur dan andrografolida dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dalam dari ekstrak terpurifikasi kencur dan sambiloto. Metode penetapan kadar dilakukan dengan metode KLT-densitometri, untuk memperoleh data pengukuran yang valid maka perlu dilakukan : (1) penentuan selektifitas pelarut (2) Penentuan panjang gelombang maksimum (3) Linieritas (4) Homogenitas (5) Penentuan batas deteksi (LOD) batas kuantitasi (LOQ) (6) Akurasi dan (7) Presisi.

Penetapan *finger print* ekstrak terpurifikasi dengan menggunakan metode KLT Densitometri, HPLC dan GC-MS.

d. Pengukuran cemaran pestisida, pengukuran residu pelarut, penentuan cemaran aflatoksin dilakukan dengan metode HPLC, pengukuran cemaran logam berat dilakukan dengan metode AAS, sedangkan untuk cemaran mikroba ditentukan dengan metode mikrobiologi.

3.1.4 Uji aktivitas antikanker dan uji induksi apoptosis campuran ekstrak terpurifikasi, secara in vitro dengan kultur sel kanker kolon WiDr

Kultur sel kanker yang digunakan adalah kultur sel kanker kolon WiDr. Pertama sel ditambah RPMI 1640 disentrifugasi pada temperatur 4°C, 800 rpm selama 5 menit. Medium tersebut kemudian dibuang, dan selanjutnya ditambah medium penumbuh kira-kira 20 ml, dan diinkubasi dalam botol kultur pada temperatur 37°C dengan 5% CO₂. Pada tahap permulaan, sel diencerkan dengan medium tanpa serum sampai volume tertentu, untuk mendapatkann jumlah sel 2×10^5 setiapi sumuran. Sel dimasukkan dalam tissue culture cluster 24, kemudian diinkubasi

selama 24 jam pada temperatur 37°C. Medium diganti dengan medium baru sebelum mencapai perkembangan 100%, kemudian jumlah sel dihitung dan selanjutnya larutan campuran ekstrak terpurifikasi (yang dilarutkan dalam media dengan bantuan DMSO) dengan konsentrasi : 10 , 50 , 100 µg/ml ditambahkan kedalamnya. Kontrol negatif dan kontrol positif juga disiapkan, kontrol positif digunakan senyawa etoposida.

Efek antikanker dilihat pertumbuhan dan kematian sel yang diamati setelah 24 jam setelah inkubasi. Jumlah sel tiap sumuran dihitung dengan alat penghitung sel Neubauer hemositometer, menggunakan tripan biru sehingga dapat diketahui jumlah sel total dan sel yang mati. Analisis data uji antikanker digunakan parameter viabilitas sel dari tiap-tiap perlakuan diolah dengan menggunakan analisis varian *Completely Randomized Design* dan menggunakan Program Persen Probit dari SPSS untuk menentukan harga IC_{50} dengan derajat kepercayaan (interval confidence) 95%.

Analisis efek induksi apoptosis digunakan sel kanker hasil perlakuan dan kemudian sel ditambah RPMI 1640 disentrifuga pada temperatur 4°C, 800 rpm selama 5 menit. Medium tersebut kemudian dibuang, sebagian sel kemudian dipindahkan dalam object glass dan kemudian ditambah pereaksi akridin orange – etidium bromida . Selanjutnya diamati pada mikroskop flouresens. Sel yang mengalami apoptosis akan terlihat adanya warna orange flouresens, sedangkan sel hidup akan berwarna hijau. Dan kemudian dihitung jumlah sel yang mengalami apoptosis untuk tiap lapang pandang, minimal 300 sel.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN PENELITIAN

4.1. Hasil Penentuan Standarisasi Simplisia Sambiloto

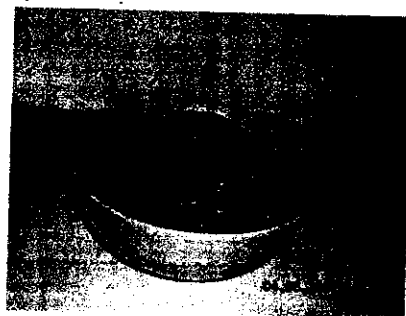
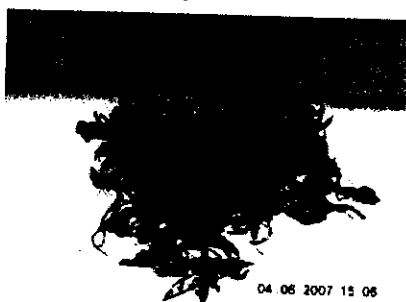
4.1.1. Uji Organoleptis Simplisia

Bentuk : serbuk kasar

Warna : hijau putih

Bau : tidak berbau

Rasa : pahit



Gambar 4.1 Simplisia kering sambiloto

Gambar 4.2 Serbuk simplisia sambiloto

4.1.2 Uji Makroskopis Simplisia

Hasil pengamatan uji makroskopis simplisia tertera pada tabel 4.1 dibawah ini:

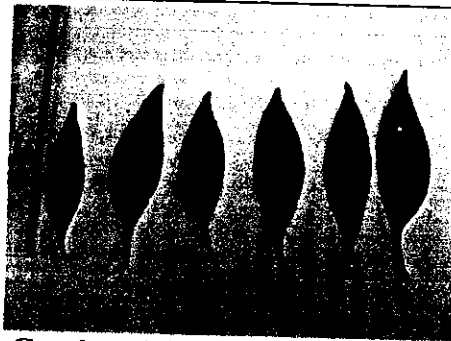
Tabel 4.1 Uji makroskopis simplisia herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

No.	Uraian	Hasil Pengamatan
1.	Daun	
	Bentuk :	Lanset dengan duduk daun bersilang berhadapan
	Helaian daun :	
	Bentuk	Lanset
	Ujung daun	Tajam/meruncing
	Pangkal daun	Agak tajam/agak meruncing
	Permukaan daun	Agak kasar
	Tepi daun	Rata
	Tulang daun	Menyirip
	Ukuran daun :	
	Panjang daun	3 - 15 cm

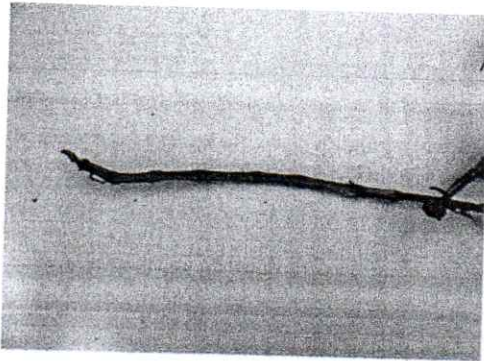
	Lebar daun Tangkai daun	1,5 - 4 cm 0,5 - 2,5 cm
2.	Batang Bentuk : Warna : Bergetah/tidak : Percabangan :	Segiempat, tidak berambut dengan sudut agak berusuk Permukaan luar : hijau ; permukaan dalam : putih Tidak bergetah dan tidak berair Banyak dan letaknya berlawanan
3.	Bunga Kelopak bunga : Daun mahkota :	5 helai daun kelopak, panjang 3-4 mm, berambut Berbibir tabung, panjang 5-6 mm, permukaan atas dan bawah berwarna putih
4.	Buah Bentuk : Ukuran : Warna :	Jorong dengan ujung tajam dan bagian tengahnya beralur Panjang 2 cm Hijau, coklat sampai kehitaman
5.	Biji Bentuk : Ukuran : Warna :	Kecil, tidak beraturan dengan permukaan keras Panjang = 1,5 - 3 mm; lebar = 2 mm Coklat muda bertonjol-tonjol



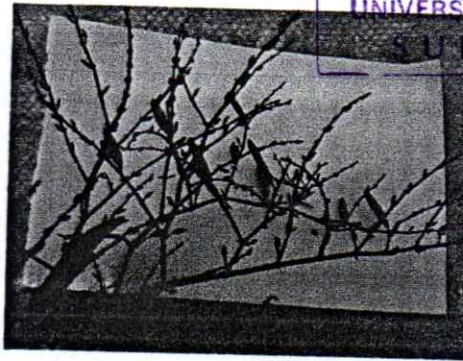
Gambar 4.3. Herba sambiloto



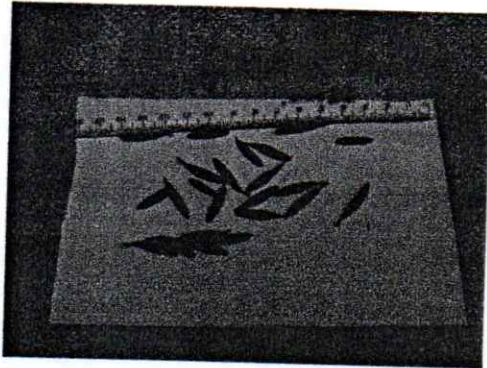
Gambar 4.4. Daun sambiloto



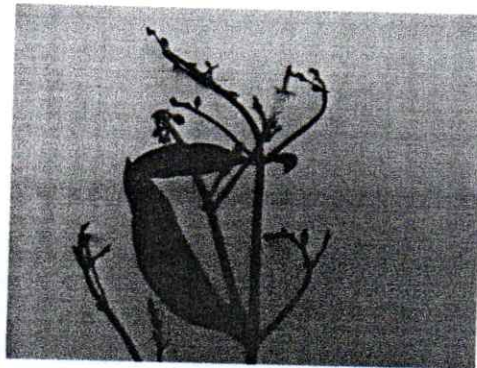
Gambar 4.5. Batang sambiloto



Gambar 4.6. Percabangan sambiloto



Gambar 4.7. Buah sambiloto



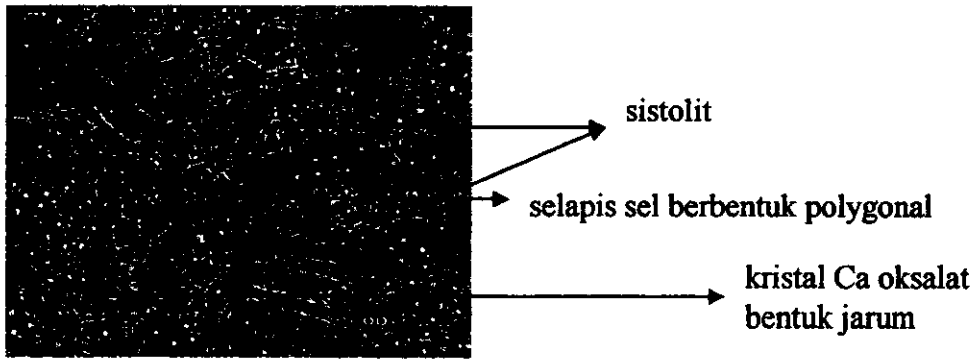
Gambar 4.8. Bunga sambiloto

4.1.3 Uji Mikroskopis Simplisia

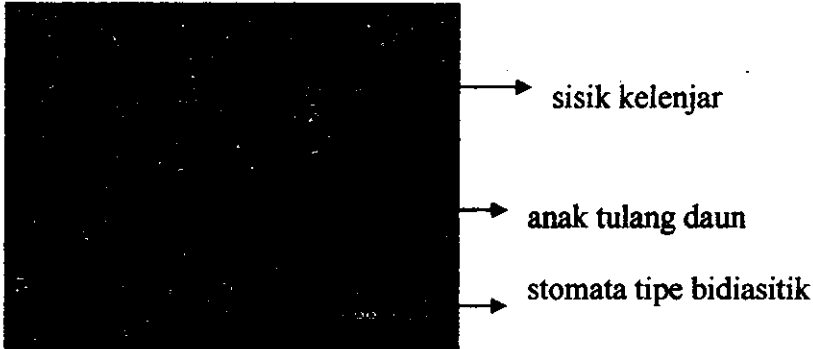
Hasil pengamatan uji mikroskopis simplisia tertera pada tabel 4.2 dibawah ini :

Tabel 4.2. Irisan melintang daun

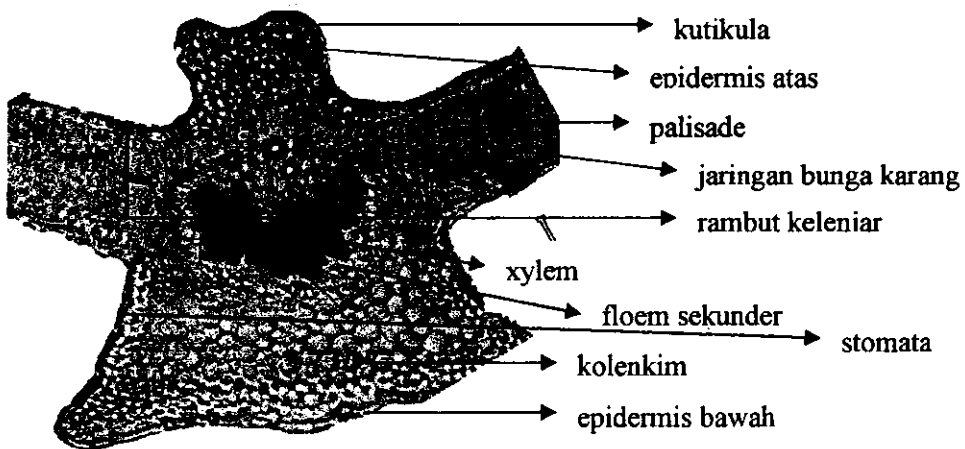
No.	Susunan	Uraian
1.	Epidermis atas	Terdiri atas satu lapis sel berbentuk poligonal, tidak terdapat stomata, terdapat sistolit berbentuk jorong, dan banyak terdapat rambut kelenjar.
2.	Epidermis bawah	Banyak terdapat stomata tipe bidiasitik, lebih banyak terdapat rambut kelenjar dan litosis. Terdapat berkas pembuluh tipe bikolateral.
3.	Mesofil	Terdiri atas satu lapis sel.



Gambar 4.9. Epidermis atas daun sambiloto



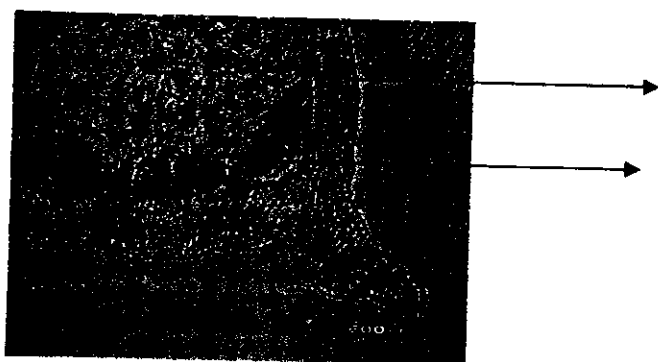
Gambar 4.10. Epidermis bawah daun sambiloto



Gambar 4.9 Irisan melintang daun sambiloto

Tabel 4.3. Irisan melintang batang

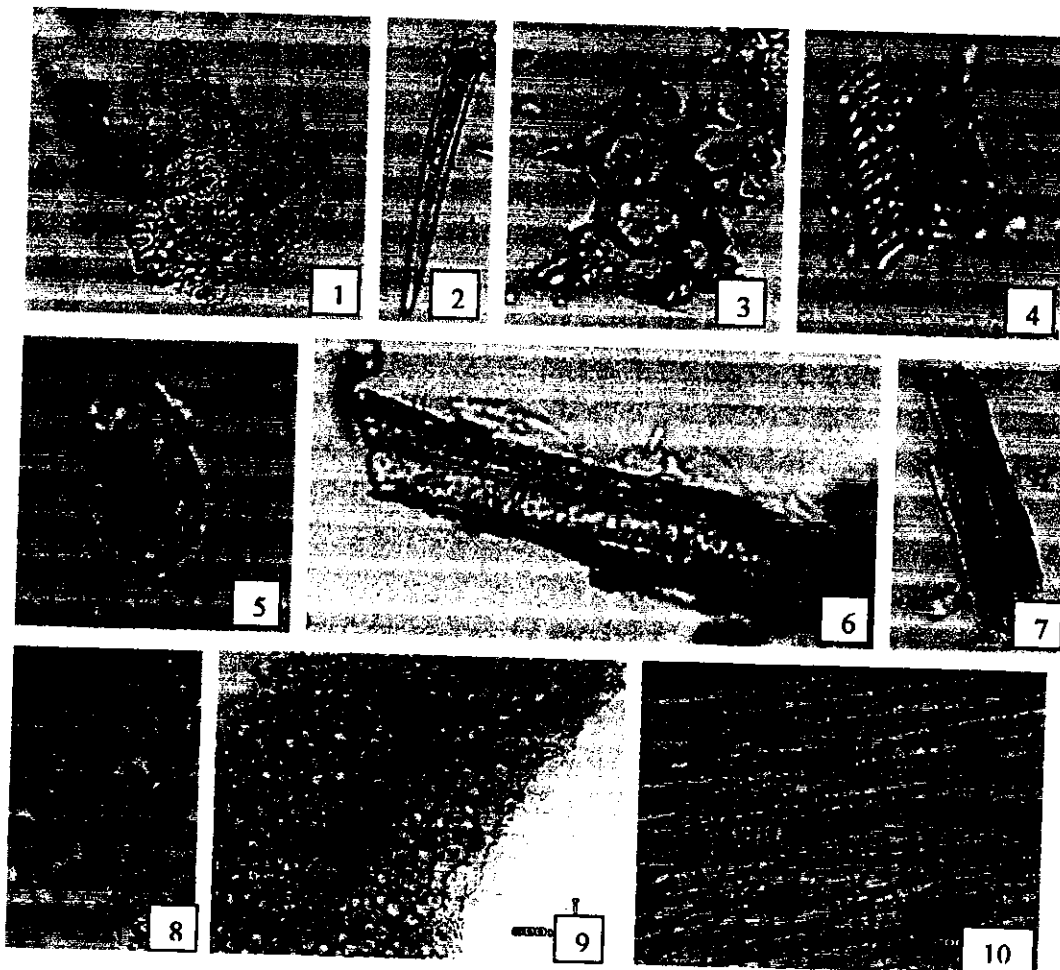
No.	Susunan	Uraian
1.	Epidermis	Terdiri atas selapis sel berbentuk persegi panjang, rambut kelenjar dan litosis
2.	Korteks	Terdiri dari beberapa lapis sel
3.	Floem sekunder	Sedikit
4.	Xylem sekunder	Sebagian besar terdiri dari serabut kayu, pembuluh kayu bernoktah dan yang berpennebalan tangga tersebar
5.	Empulur	Terdiri atas sel besar berbentuk poligonal, dinding bernoktah, sel empulur berisi hablur Ca oksalat bentuk jarum



Gambar 4.10. Irisan melintang batang

4.1.4 Identifikasi Serbuk Simplisia

Hasil pengamatan fragmen serbuk herba sambiloto diperoleh antara lain :



Gambar 4.11. Uji mikroskopis serbuk sambiloto

Keterangan gambar :

- | | |
|--|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Epidermis bawah dengan stomata dan sisik kelenjar 2. Rambut penutup 3. Kolenkim 4. Xylem sekunder dengan penebalan tangga 5. Sisik kelenjar | <ol style="list-style-type: none"> 6. Xylem sekunder dengan penebalan noktah 7. Xylem+ floroglusin HCl → ungu 8. Kutikula, epidermis atas dan mesofil daun 9. Mesofil dengan costa daun 10. Sistolit dalam sel epidermis atas |
|--|--|

4.2.1. Penetapan Kadar Abu

Tabel 4.4 Hasil penetapan kadar abu pada serbuk simplisia herba sambiloto

No	Berat simplisia (g)	berat abu (g)	% abu (b/b)
1.	2,0023	0,2221	11,09
2.	2,0025	0,225	11,24
3.	2,0006	0,2239	11,19
Rata-rata			11,17
Standar deviasi			0,2864
Koefisien variasi			0,68
Persyaratan kadar*			< 12 (memenuhi)
Ket. (*) : pustaka Materia Medika Indonesia jilid III			

4.2.2. Penetapan Kadar Abu Larut Air

Tabel 4.5 Hasil penetapan kadar abu yang larut air pada serbuk simplisia herba sambiloto

No	Berat simplisia (g)	berat abu (g)	abu larut air (g)	% abu larut air (b/b)
1.	2,0009	0,2329	0,0907	4,53
2.	2,0031	0,2345	0,0937	4,68
3.	2,0016	0,2344	0,0868	4,38
Rata-rata				4,52
Standar deviasi				0,1391
Koefisien variasi				3,08
Persyaratan kadar				-

4.2.3. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Tabel 4.6 Hasil penetapan kadar abu yang tidak larut asam pada serbuk simplisia herba sambiloto

No	Berat simplisia (g)	berat abu (g)	abu tidak larut asam (g)	% abu tidak larut asam (b/b)
1.	2,0112	0,2363	0,0181	0,90
2.	2,0114	0,2287	0,0149	0,74

3.	2,0141	0,2035	0,0154	0,76
Rata-rata				0,80
Standar deviasi				0,0872
Koefisien variasi				10,90
Persyaratan kadar*				< 2,2 (memenuhi)
Ket. (*) : pustaka Materia Medika Indonesia jilid III				

4.2.4. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Tabel 4.7 Hasil penetapan kadar sari larut etanol pada serbuk simplisia herba sambiloto

No	Berat simplisia (g)	berat residu (g)	% sari larut etanol (b/b)
1.	5,0013	0,629	12,6
2.	5,0001	0,619	12,4
3.	5,0005	0,620	12,4
Rata-rata			12,47
Standar deviasi			0,1155
Koefisien variasi			0,93
Persyaratan kadar*			> 9,7 (memenuhi)
Ket. (*) : pustaka Materia Medika Indonesia jilid III			

4.2.5. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Tabel 4.8 Hasil penetapan kadar sari larut air pada serbuk simplisia herba sambiloto

No	Berat simplisia (g)	berat residu (g)	% sari larut air (b/b)
1.	5,0071	0,925	18,47
2.	5,0070	0,905	18,07
3.	5,0084	0,922	18,40
Rata-rata			18,31
Standar deviasi			0,2136
Koefisien variasi			1,17
Persyaratan kadar*			> 18 (memenuhi)
Ket. (*) : pustaka Materia Medika Indonesia jilid III			

4.2.6. Penetapan Susut Pengeringan

Tabel 4.9 Hasil penetapan susut pengeringan pada serbuk simplisia herba sambiloto

No	Berat simplisia (g)	Berat akhir (g)	% penyusutan (b/b)
1.	1,5021	1,3756	8,43
2.	1,5013	1,3768	8,29
3.	1,5041	1,3734	8,69
Rata-rata			8,47
Standar deviasi			0,1657
Koefisien variasi			1,96
Persyaratan kadar*			< 10 (memenuhi)
Ket. (*) : pustaka Standard of ASEAN Herbal Medicine, Volume I, tahun 1993			

4.2.7. Penetapan Kadar Air

Tabel 4.10 Hasil penetapan kadar air pada serbuk simplisia herba sambiloto

No	Berat simplisia (g)	Volume air (mL)	% kadar air (b/v)
1.	30	2,7	9
2.	30	2,6	8,67
3.	30	2,6	8,67
Rata-rata			8,78
Standar deviasi			0,1905
Koefisien variasi			2,17
Persyaratan kadar*			< 10 (memenuhi)
Ket. (*) : pustaka Standard of ASEAN Herbal Medicine, Volume I, tahun 1993			

4.3. Parameter Non Spesifik Ekstrak

4.3.1. Penetapan Kadar Andrografolida dalam Simplisia dan Ekstrak

4.3.1.1. Penentuan Selektivitas Eluen

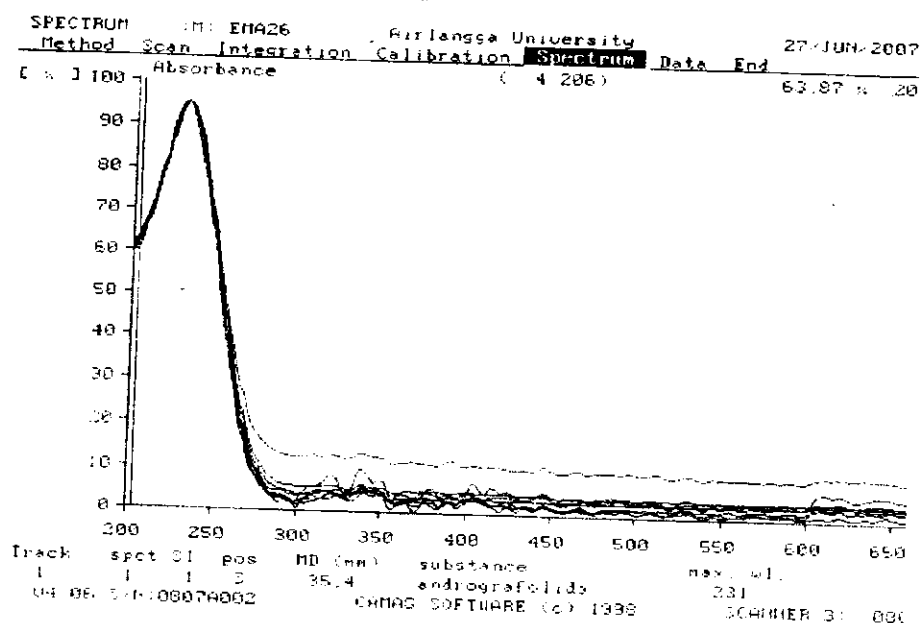
Hasil uji selektivitas mengacu pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Kusumardhani, 2005. Adapun eluen yang diuji selektivitasnya diantaranya seperti yang tertera pada tabel 4.22.

Tabel 4.21 Hasil uji selektivitas eluen (Kusumawardhani, 2005)

No	Jenis eluen	Harga Rs	
		Noda atas	Noda bawah
1	CHCl ₃ : metanol (9 : 1)	3,50	2,73
2	CHCl ₃ : metanol (8 : 2)	1,17	2,73
3	CHCl ₃ : metanol (7 : 3)	-	1,45

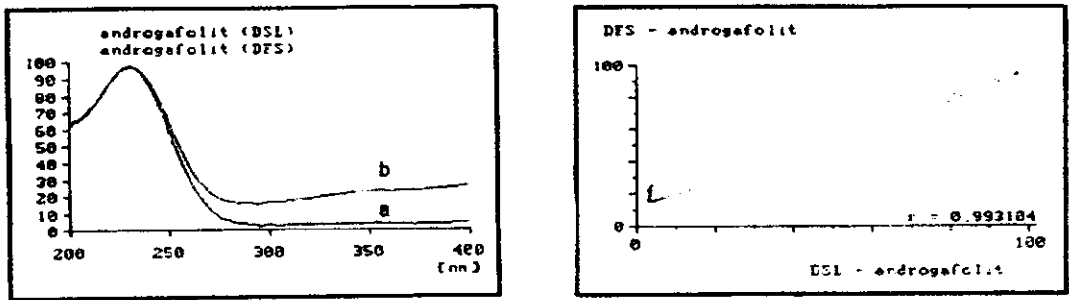
Dari hasil uji selektivitas eluen, dapat disimpulkan bahwa eluen CHCl₃ : metanol = 9 : 1 memberikan nilai Rs yang paling baik dan memenuhi syarat, yaitu Rs > 1,5, selain itu pada plat KLT setelah diamati secara visual memberikan noda yang bulat, tidak berekor.

4.3.1.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum



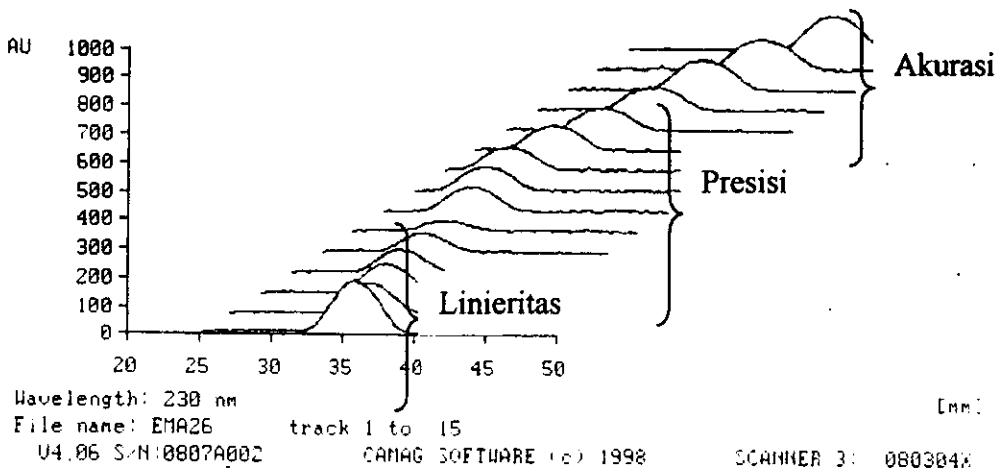
Gambar 4.15 Penentuan panjang gelombang maksimum dari andrografolida

Dari penentuan panjang gelombang maksimum diperoleh bahwa andrografolida memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 231 nm.



Gambar 5.16 Perbandingan profil spektra andrografolida dalam sampel dan standar

4.3.1.3 Linieritas



Gambar 4.17 Integrasi seluruh noda pada plat KLT untuk pengukuran linieritas, presisi dan akurasi

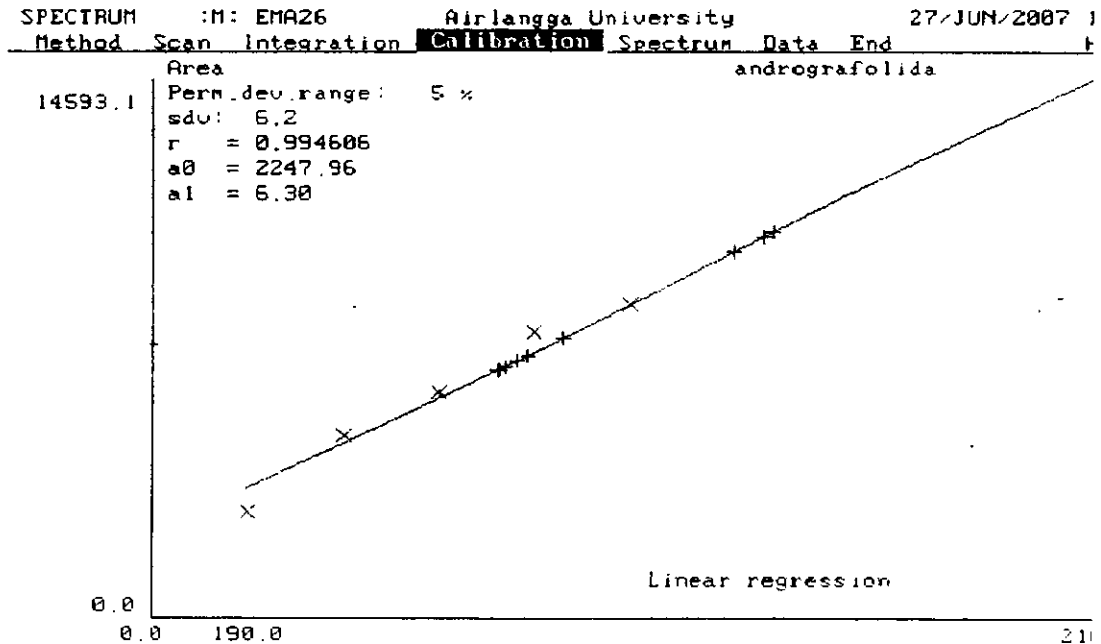
Tabel 4.22 Hasil pengukuran luas area untuk penentuan linearitas pada berbagai konsentrasi

Konsentrasi standar andrografolida (ppm)	Jumlah penotolan (µg)	Area noda (y _o)	y _i	(y _i -y _o) ²
202	0,40	2708,3	3507,6583	638973,6918
404	0,81	4173,9	4767,3707	352207,4718
606	1,21	7415,4	6027,0831	1927423,815
808	1,61	11052,7	7286,7955	14182036,7
1010	2,02	13780,0	8546,5079	27389439,56
2020	4,04	15707,4	14845,0699	743613,2014

$\sum (y_i - y_0)^2$	1970730086
----------------------	------------

$y = 6,2362 x + 2247,9459 \quad r = 0,9946 \quad r \text{ tabel} = 0,943 (\alpha = 0,01)$

Karena $r > r \text{ tabel}$, maka terdapat korelasi yang linier antara konsentrasi (x) dan area (y)



Wavelength: 231 nm
 Used files: peak data: EMA26 , analysis data: EMA26
 U4.06 S/N:0807A002 CAMAG SOFTWARE (c) 1998 SCANNER 3: 0803

Gambar 4.18 Kurva hubungan antara kadar (ppm) dengan area noda dengan densitometer

4.3.1.4 Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Dari hasil penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ), diperoleh hasil seperti yang tercantum dalam tabel 4.23 di bawah ini :

Konsentrasi standar andrografolida (ppm)	Jumlah penotolan (μg)	Area noda	y_i	$(y_i - y_0)^2$
25	0,05	1342,8	1039,36	92075,8336
50	0,10	1296,2	1374,36	6108,9856
75	0,15	2709,1	1709,36	136707,6676
100	0,20	1874,8	2044,36	28750,5936
150	0.30	2235,3	2714,36	229498,4836

250	0,50	3809,9	4054,36	59760,6916
400	0,80	6357,7	6064,36	86048,3556
$\sum (y_i - y_o)^2$				638950,6112

$$y = 13,4x + 704,36 \quad r = 0,983655 \quad r \text{ tabel} = 0,893 \quad (\alpha = 0,01)$$

$$sd = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_o)^2}{n - 2}} \rightarrow sd = \sqrt{\frac{638950,6112}{5}} \rightarrow 357,4774$$

$$LOD = \frac{3xsd}{slope} \rightarrow LOD = \frac{3 \times 357,4774}{13,4} \rightarrow LOD = 80,0323 \text{ ppm atau } 0,16 \mu\text{g}$$

$$LOQ = \frac{10xsd}{slope} \rightarrow LOQ = \frac{10 \times 357,4774}{13,4} \rightarrow LOQ = 266,7742 \text{ ppm atau } 0,53 \mu\text{g}$$

Batas deteksi dan batas kuantitasi andrografolida dari densitometer yang digunakan yaitu 0,16 μg dan 0,53 μg .

4.3.1.5 Akurasi

Tabel 4.24 Hasil pengukuran akurasi pada penetapan kadar andrografolida

Replikasi ke-	Penimbangan		Andrografolida dalam 5,0 ml (mg)	Kadar yang diperoleh (mg)	% recovery
	Sampel (mg)	Standar (mg)			
1	25,2	2,5	6,2578	6,1388	98,10
2	25,2	2,5	6,2578	6,4691	103,38
3	25,1	2,5	6,2429	6,5713	105,26
% recovery rata-rata					102,25
Koefisien variasi (%)					3,63

Persen recovery yang didapat masuk dalam rentang yang diperbolehkan yaitu 80 -120 % (USP XXIV dan Swarbrick, 1970).

4.3.1.6 Penetapan Kadar Andrografolida dalam Serbuk Simplisia

Ekstraksi menggunakan metode perkolasi hingga kandungan andrografolida habis, yang diuji dengan pengamatan secara visual setelah dipayar pada lampu UV.

Tabel 4.25 Hasil perkolasi serbuk simplisia herba sambiloto

No	Berat simplisia (g)	Pelarut pengembang (mL)	Pelarut perkolasi (mL)	Perkolat (mL)
1.	5,0020	15	130	143
2.	5,0011	15	145	157
3.	5,0016	15	150	150

Tabel 4.26 Pengukuran area noda pada penetapan kadar andrografolida pada simplisia

$$y = 8,19 x + 4370,35$$

$$r = 0,998476$$

$$r \text{ tabel} = 0,943 (\alpha = 0,01)$$

Konsentrasi standar - (ppm)	Jumlah penotolan ($\mu\text{g}/\text{bercak}$)	Area
400	0,8	6839,8
600	1,2	9509,6
800	1,6	11198,0
1000	2,0	13031,1
2000	4,0	20759,3
3000	6,0	28766,8

Tabel 4.27 Penetapan kadar andrografolida dalam serbuk simplisia

Berat simplisia (g)	Luas area noda	Kadar (mg/60mL)	Kadar (%)
5,0020	21433,5	125,0048	2,50
5,0011	24304,6	146,0341	2,92
5,0016	15840,8	84,0326	1,68
Kadar rata-rata			2,37
Standar deviasi			0,631
Koefisien variasi			26,65

Kadar andrografolida dalam serbuk simplisia herba sambiloto sebesar $(2,37 \pm 0,631)\%$ dengan koefisien variasi sebesar 26,65%.

- Penetapan Kadar Andrografolida pada Simplisia dengan Metode Ekstraksi Maserasi Kinetik

Tabel 4.28 Pengukuran area noda pada penetapan kadar andrografolida pada simplisia

$y = 5,88 x + 4400,04$
 $r = 0,9947$
 $r \text{ tabel} = 0,943 (\alpha = 0,01)$

Konsentrasi standar (ppm)	Jumlah penotolan ($\mu\text{g}/\text{bercak}$)	Area
400	0,8	6336,1
600	1,2	8551,0
800	1,6	8770,2
1000	2,0	9973,2
2000	4,0	17072,7
3000	6,0	21540,3

Tabel 5.29 Penetapan kadar andrografolida dalam serbuk simplisia

Berat simplisia (g)	Volume ekstrak (mL)	Luas area noda	Kadar dalam ekstrak (mg)	Kadar (%)
5,0064	106	11144,6	121,6403	2,43
5,0057	103	12561,6	143,0310	2,86
5,0040	111	11098,8	126,5145	2,53
Kadar rata-rata				2,61
Standar deviasi				0,224
Koefisien variasi				8,6

Kadar andrografolida dalam serbuk simplisia herba sambiloto sebesar $(2,37 \pm 0,631)\%$ dengan koefisien variasi sebesar 26,65%.

4.3.1.7 Penetapan Kadar Andrografolida dalam Ekstrak

Luas area standar andrografolida berbagai konsentrasi pada berbagai jumlah penotolan ditunjukkan pada tabel 5.25, dan hasil penetapan kadar andrografolida dalam ekstrak etanol 96% dari tanaman *Andrographis paniculata* Nees. ditunjukkan pada tabel 5.31 dibawah ini :

Tabel 4.30 Luas area standar andrografolida berbagai konsentrasi pada berbagai jumlah penotolan

Konsentrasi standar (ppm)	Jumlah penotolan ($\mu\text{g}/\text{bercak}$)	Area
202	0,40	2708,3
404	0,81	4173,9
606	1,21	7415,4
808	1,61	11052,7
1010	2,02	13780,0
2020	4,04	15707,4

$$y = 6,2362 x + 2247,9459 \quad r = 0,9946 \quad r \text{ tabel} = 0,943 (\alpha = 0,01)$$

Karena $r \text{ hitung} > r \text{ tabel}$ maka ada korelasi yang linear

Tabel 4.31 Penetapan kadar andrografolida dalam ekstrak etanol 96% dari tanaman *Andrographis paniculata* Nees.

Sampel (mg)	Luas area	Kadar (mg/5mL)	Kadar (%)
25,3	6818,4	3,6644	14,48
25,2	6889,5	3,7214	14,76
25,3	6810,2	3,6579	14,46
25,3	7044,9	3,8460	15,20
253	7190,2	3,9625	15,66
Kadar rata-rata			14,91
Standar deviasi			0,514
Koefisien variasi			3,45

Kadar andrografolida rata-rata dalam ekstrak etanol 96% herba sambiloto ($14,91 \pm 0,514$)% dengan koefisien variasi sebesar 3,45%.

4.4. Parameter Spesifik Fraksi Diterpen Lakton dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

4.4.1. Organoleptis Fraksi Diterpen Lakton

Pengamatan yang dilakukan pada fraksi sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dimaksudkan untuk mengetahui ciri tanaman dari bentuk, warna, bau dan rasa. Berikut hasil pengamatan pemeriksaan organoleptik fraksi :

Bentuk : Padatan keras
 Warna serbuk : Kuning kecoklatan
 Rasa : Pahit
 Bau : Tidak berbau

4.4.2. Kadar Sari Larut Air

Tabel 5.1 Hasil penetapan kadar sari yang larut dalam air fraksi diterpen lakton dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

No.	Berat Awal (g)	Berat Akhir (g)	Kadar (% b/b)
1.	1,0780	0,0859	39,84
2.	1,0309	0,0856	41,52
3.	1.092	0,0850	38,87
Rata-rata			40,08
SD			1,3406
KV			3,34

4.4.3. Kadar Sari Larut Etanol

Tabel 5.2 Hasil penetapan kadar sari yang larut dalam etanol fraksi diterpen lakton dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

Tabel 4.30 Luas area standar andrografolida berbagai konsentrasi pada berbagai jumlah penotolan

Konsentrasi standar (ppm)	Jumlah penotolan ($\mu\text{g}/\text{bercak}$)	Area
202	0,40	2708,3
404	0,81	4173,9
606	1,21	7415,4
808	1,61	11052,7
1010	2,02	13780,0
2020	4,04	15707,4

$$y = 6,2362 x + 2247,9459 \quad r = 0,9946 \quad r \text{ tabel} = 0,943 (\alpha = 0,01)$$

Karena $r \text{ hitung} > r \text{ tabel}$ maka ada korelasi yang linear

Tabel 4.31 Penetapan kadar andrografolida dalam ekstrak etanol 96% dari tanaman *Andrographis paniculata* Nees.

Sampel (mg)	Luas area	Kadar (mg/5mL)	Kadar (%)
25,3	6818,4	3,6644	14,48
25,2	6889,5	3,7214	14,76
25,3	6810,2	3,6579	14,46
25,3	7044,9	3,8460	15,20
253	7190,2	3,9625	15,66
Kadar rata-rata			14,91
Standar deviasi			0,514
Koefisien variasi			3,45

Kadar andrografolida rata-rata dalam ekstrak etanol 96% herba sambiloto ($14,91 \pm 0,514$)% dengan koefisien variasi sebesar 3,45%.

4.4. Parameter Spesifik Fraksi Diterpen Lakton dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

4.4.1. Organoleptis Fraksi Diterpen Lakton

Pengamatan yang dilakukan pada fraksi sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dimaksudkan untuk mengetahui ciri tanaman dari bentuk, warna, bau dan rasa. Berikut hasil pengamatan pemeriksaan organoleptik fraksi :

Bentuk : Padatan keras
 Warna serbuk : Kuning kecoklatan
 Rasa : Pahit
 Bau : Tidak berbau

4.4.2. Kadar Sari Larut Air

Tabel 5.1 Hasil penetapan kadar sari yang larut dalam air fraksi diterpen lakton dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

No.	Berat Awal (g)	Berat Akhir (g)	Kadar (% b/b)
1.	1,0780	0,0859	39,84
2.	1,0309	0,0856	41,52
3.	1.092	0,0850	38,87
Rata-rata			40,08
SD			1,3406
KV			3,34

4.4.3. Kadar Sari Larut Etanol

Tabel 5.2 Hasil penetapan kadar sari yang larut dalam etanol fraksi diterpen lakton dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

No.	Berat Awal (g)	Berat Akhir (g)	Kadar (% b/b)
1.	0,5085	0,0951	93,51
2.	0,5065	0,0986	97,33
3.	0,5057	0,0924	91,36
Rata-rata			94,07
SD			3,023
KV			3,214

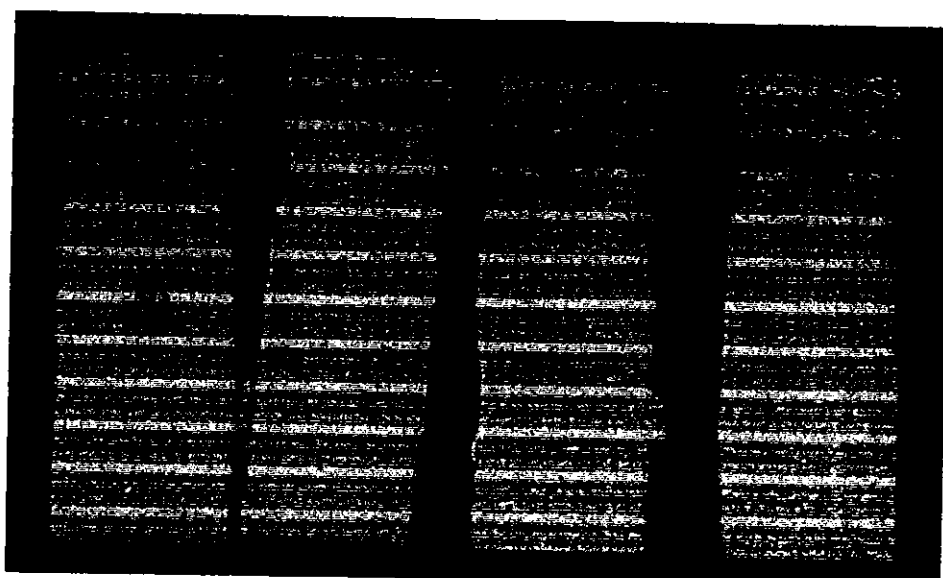
4.4.4. Kadar Andrografolid dalam Fraksi Diterpen Lakton dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

4.4.4.1. Penentuan Selektifitas Eluen

Hasil uji selektifitas mengacu pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Kusumawardhani, 2005. Adapun eluen yang diuji selektifitasnya diantaranya seperti yang tertera pada table 5.

Tabel 5.3 Hasil uji selektifitas eluen (Kusumawardhani, 2005)

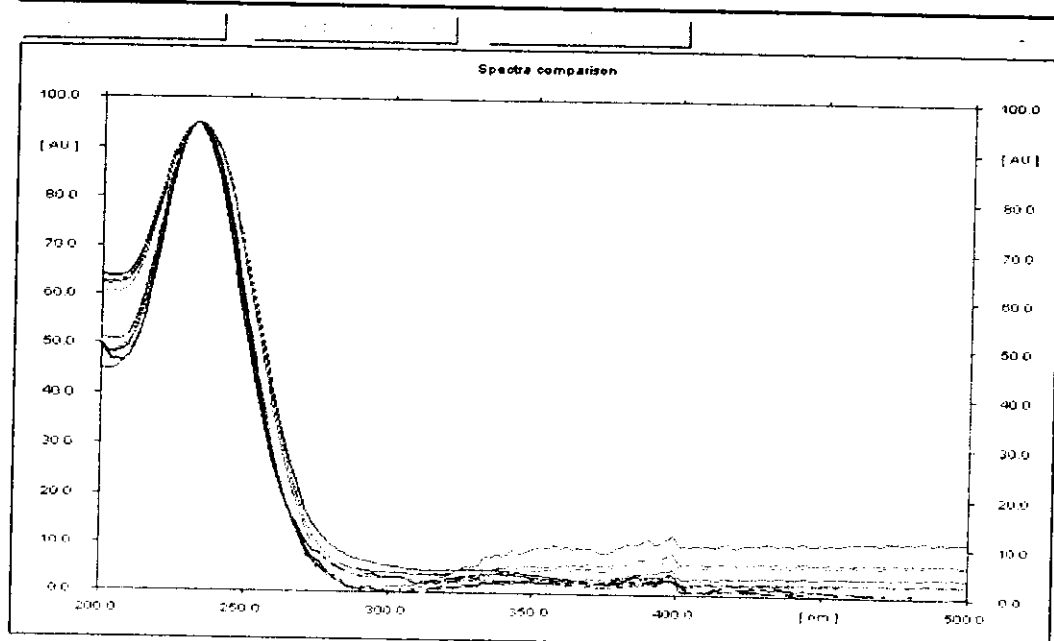
No.	Jenis eluen	Harga Rs	
		Noda Atas	Noda Bawah
1.	Kloroform : methanol (9:1)	3,50	2,73
2.	Kloroform : methanol (8:2)	1,17	2,73
3.	Kloroform : methanol (7:3)	-	1,45



Gambar 5.2 Pengamatan secara visual dengan lampu UV

Dari hasil uji selektifitas eluen, dapat disimpulkan bahwa eluen kloroform : metanol = 9 : 1 memberikan nilai R_s yang paling baik dan memenuhi persyaratan yaitu $R_s > 1,5$, selain itu pada plat KLT setelah diamati secara visual memberikat noda yang tidak berekor.

4.4.4.2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum



Gambar 5.3 Profil spektra andrografolid dari sambiloto

Show all of selected sub bands

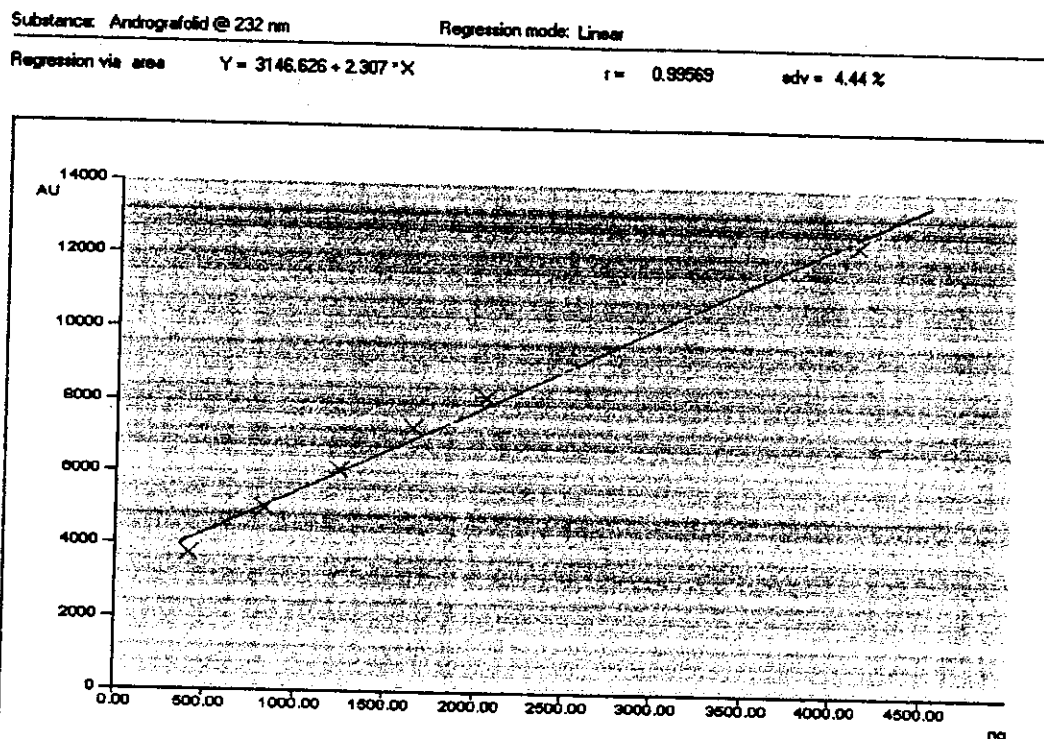
Clear all

Peak	Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment	Wavenumber (cm ⁻¹)
1	0.42	Andrografolid	101 AU @ 232 nm
2	0.54	Andrografolid	755 AU @ 232 nm
3	0.49	Andrografolid	249 AU @ 232 nm
4	0.46	Andrografolid	799 AU @ 233 nm
5	0.45	Andrografolid	307 AU @ 233 nm
6	0.45	Andrografolid	751 AU @ 233 nm
7	0.44	Andrografolid	852 AU @ 232 nm
8	0.48	Andrografolid	809 AU @ 233 nm
9	0.59	Andrografolid	105 AU @ 294 nm
10	0.48	Andrografolid	389 AU @ 232 nm
11	0.49	Andrografolid	787 AU @ 233 nm
12	0.48	Andrografolid	503 AU @ 232 nm
13	0.49	Andrografolid	449 AU @ 232 nm
14	0.49	Andrografolid	494 AU @ 232 nm
15	0.49	Andrografolid	474 AU @ 232 nm
16	0.50	Andrografolid	376 AU @ 232 nm
17	0.50	Andrografolid	408 AU @ 232 nm
18	0.52	Andrografolid	158 AU @ 232 nm

Gambar 5.4 Penentuan panjang gelombang maksimum andrografolid

Dari hasil penentuan panjang gelombang maksimum diperoleh bahwa andrografolida memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 231 nm.

4.4.4.3. Linieritas



Gambar 5.5 Penentuan linieritas noda pada KLT-Densitometri
(kadar VS area noda)

Tabel 5.4 Hasil pengukuran luas area untuk penentuan linieritas pada berbagai konsentrasi

Konsentrasi standar andrografolida (ppm)	Jumlah penotolan (ng)	Area noda (y_0)	y_i	$(y_i - y_0)^2$
206	0,41	3716,59	3621,8472	8976,1982
412	0,82	4987,87	4097,0686	793527,1342
618	1,24	6074,02	4572,2900	2255192,993
824	1,65	7306,08	5047,5114	5101132,121

1030	2,06	8143,78	5522,7328	6869888,425
2060	4.12	12412,97	7898,8398	20377371,46
$\Sigma (y_i - y_o)^2$				35406088,33

$$Y = 2,3069 X + 3146,6258$$

$$r = 0,99569$$

$$r \text{ tabel} = 0,943$$

Karena r yang diperoleh lebih besar dari r tabel, maka terdapat korelasi antara konsentrasi (x) dan luas area (y).

4.4.4.4. Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ) -

Tabel 5.5 Penentuan LOD dan LOQ

Konsentrasi Standar Andrografolid (ppm)	Jumlah penotolan (μg)	Area Noda	y_i	$(y_i - y_o)^2$
75	0,15	1420,97	754,7657	443828,1693
100	0,20	1129,15	840,7782	83158,2904
150	0,30	1433,74	1012,8023	177187,7896
250	0,50	2279,94	1356,8532	852089,2403
400	0,80	3616,95	1872,9282	3041612,039
$\Sigma (y_i - y_o)^2$				8592330,286

$$Y = 3,4 X + 496,7$$

$$r = 0,92706$$

Tabel 5.6 Penentuan LOD dan LOQ dengan KLT-Densitometri

Substance: Andrografolid @ 232 nm		Regression mode: Linear						
Regression via area		$Y = 496.7282 + 3.4405 \cdot X$	$r = 0.92706$ $sdv = 22.19\%$					
TIA	W	M	Amount Fraction	Retent	X (GMS)	Area	X (GMS)	Y (GMS)
1	1							Std Level 1: No peak detected or peak deleted
2	1							Std Level 2: No peak detected or peak deleted
3	1	0.61	150.00 ng	41.46		1420.97		Std Level 3
4	1	0.54	200.00 ng	36.89		1129.15		Std Level 4
5	1	0.53	400.00 ng	54.73		1433.74		Std Level 5
6	1	0.55	600.00 ng	74.96		2279.94		Std Level 6
7	1	0.60	800.00 ng	74.51		3616.95		Std Level 7

$$sd = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_o)^2}{n - 2}} \rightarrow sd = \sqrt{\frac{8592330}{3}} \rightarrow 1692$$

$$LOD = 3 \times sd \rightarrow 3 \times 1692 \rightarrow LOD = 1475 \text{ ppm atau } 2,9 \mu\text{g}$$

$$\text{Slope } 3,4405$$

$$LOQ = 10 \times sd \rightarrow 10 \times 1692 \rightarrow LOD = 4917 \text{ ppm atau } 9,8 \mu\text{g}$$

Batas deteksi dan batas kuantitasi andrografolida dari densitometri yang digunakan adalah 2,9 μg dan 9,8μg.

4.4.4.5. Akurasi

Tabel 5.7

Hasil pengukuran akurasi pada penetapan kadar andrografolid

Replikasi ke -	Penimbangan		Andrografolid dalam 5,0 ml (mg)	Kadar yang diperoleh (mg)	% recovery
	Sampel (mg)	Standar (mg)			
1.	25,8	2,6	8,8436	10,220	86,53
2.	25,8	2,6	8,8438	10,260	86,19
3.	25,8	2,6	8,8438	10,110	87,47
% Recovery rata - rata					86,74
Sd					0,6631
KV					0,76

Persen recovery yang didapat masuk dalam rentang yang diperbolehkan yaitu 80 % - 120 % (USP XXIV dan Swarbrick, 1970).

4.4.4.6. Penetapan Kadar Andrografolid

Dilakukan penetapan kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton herba sambiloto dengan metode KLT-Densitometri. Hasil luas area larutan baku standar andrografolida dan persamaan garis regresi dapat dilihat pada Tabel 5.1, dan hasil penetapan kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton herba sambiloto dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.1 Luas area larutan baku standar andrografolida dalam berbagai konsentrasi

Kadar (ppm)	Luas Area
----------------	-----------

200	2407,1
300	2763,1
400	3178,2
600	3985,8
800	4684,3
1000	6114,1

$$y = 4,4457x + 1410,2839$$

$$r = 0,9912$$

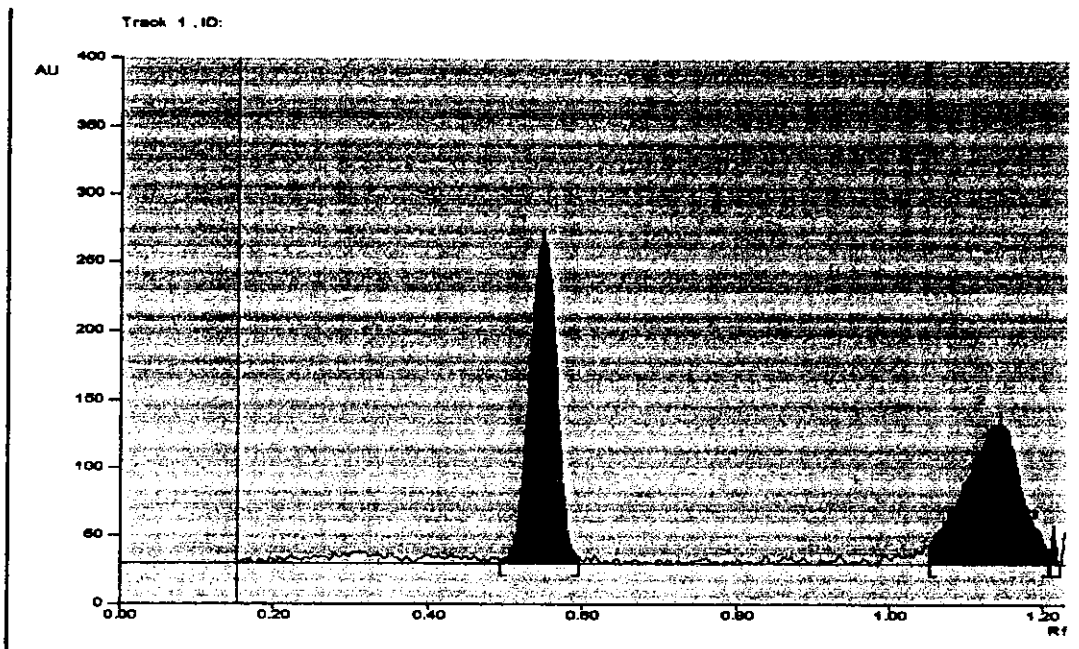
Tabel 5.2 Penetapan kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton herba sambiloto

Replikasi	Berat sampel (mg)	Jumlah penotolan (μ l/bercak)	Luas area	Kadar (ppm)	Kadar (%b/b)
1	10,6	2,0	3527,8	476,30	89,87
2	10,1	2,0	3419,7	451,99	89,50
3	10,4	2,0	3456,8	460,33	88,53
Kadar rata-rata					89,30 \pm 0,57

4.4.4.7. Penentuan Profil Fingerprint Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dengan KLT-Densitometri, FTIR

4.4.4.7.1. Profil Fingerprint KLT-Densitometri

A. Profil standar andrografolida



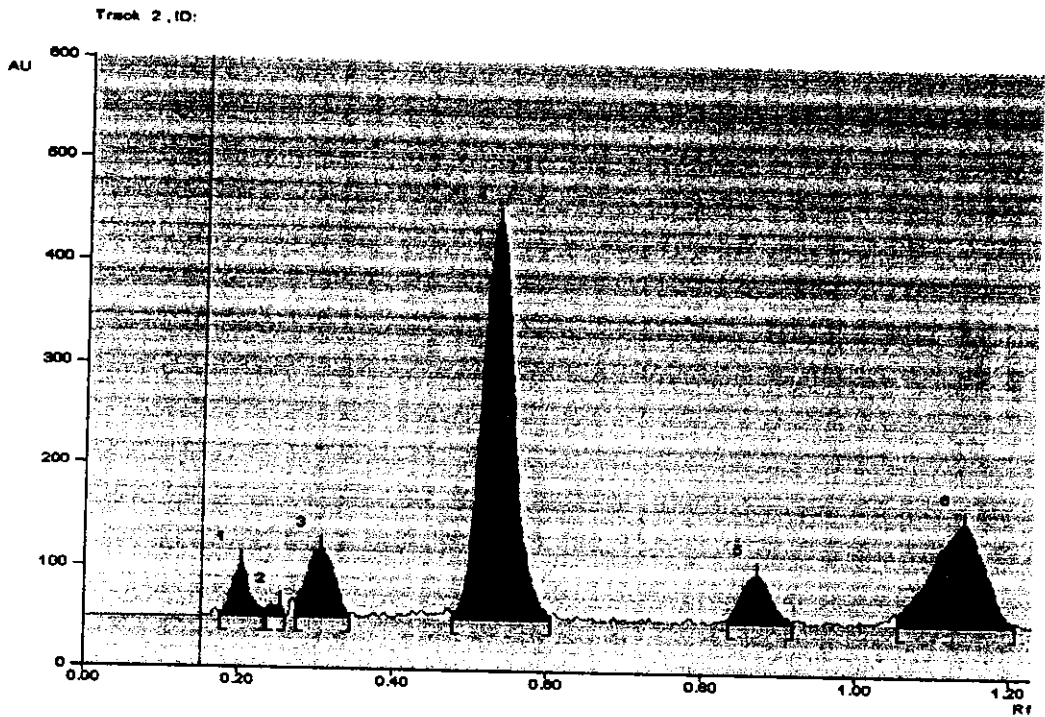
**Gambar 5. Kromatogram standar andrografolid dengan eluen kloroform :
methanol (9:1)**

Tabel 5. Penentuan profil fingerprint standar

Track 1, ID:

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.49 Rt	2.4 AU	0.55 Rt	237.0 AU	65.22 %	0.60 Rt	5.5 AU	6271.6 AU	50.95 %	unknown *
2	1.05 Rt	13.9 AU	1.14 Rt	105.6 AU	29.07 %	1.21 Rt	8.0 AU	6937.3 AU	48.24 %	unknown *
3	1.21 Rt	9.7 AU	1.21 Rt	20.8 AU	5.72 %	1.22 Rt	0.2 AU	100.0 AU	0.81 %	unknown *

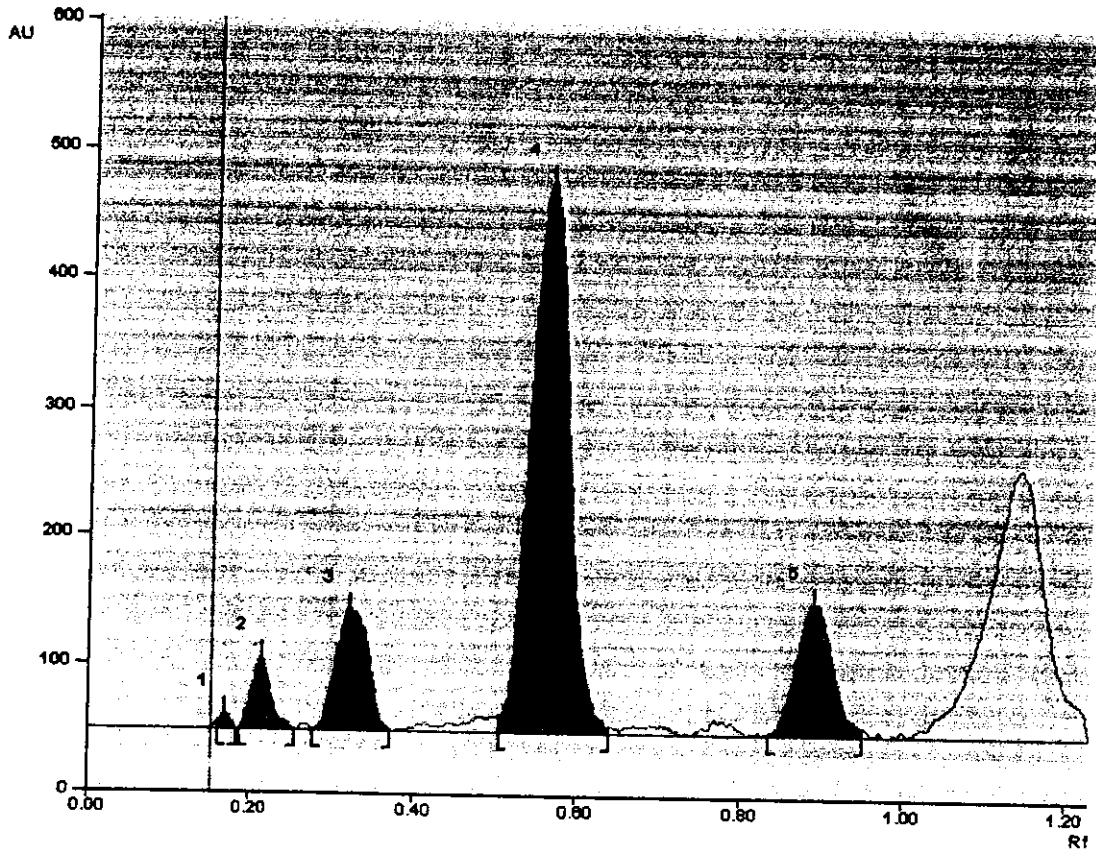
B. Profil fraksi diterpen lakton



Gambar 5. Kromatogram fraksi diterpen lakton dengan eluen kloroform : metanol (9:1)

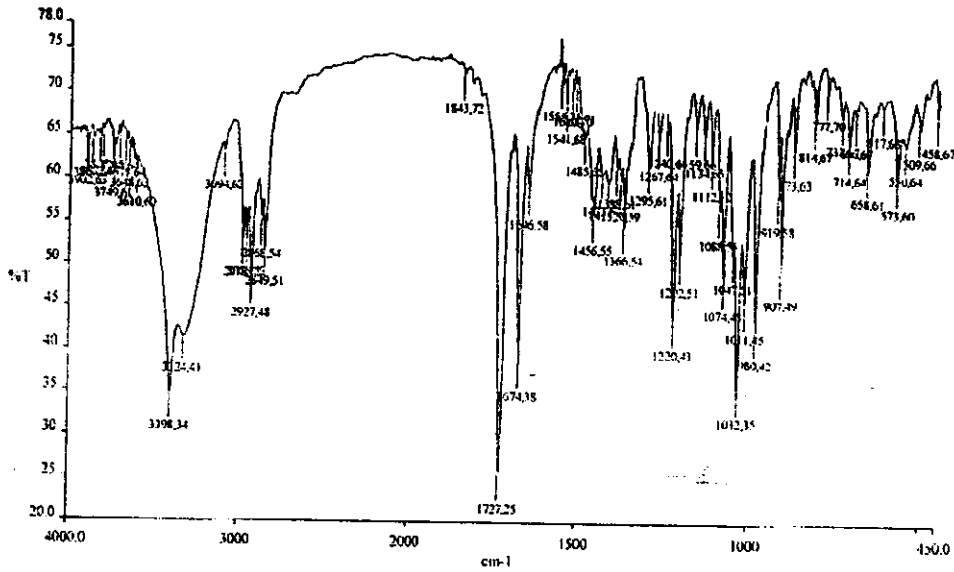
C. Profil ekstrak etanol 96% sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

Track 3, ID:



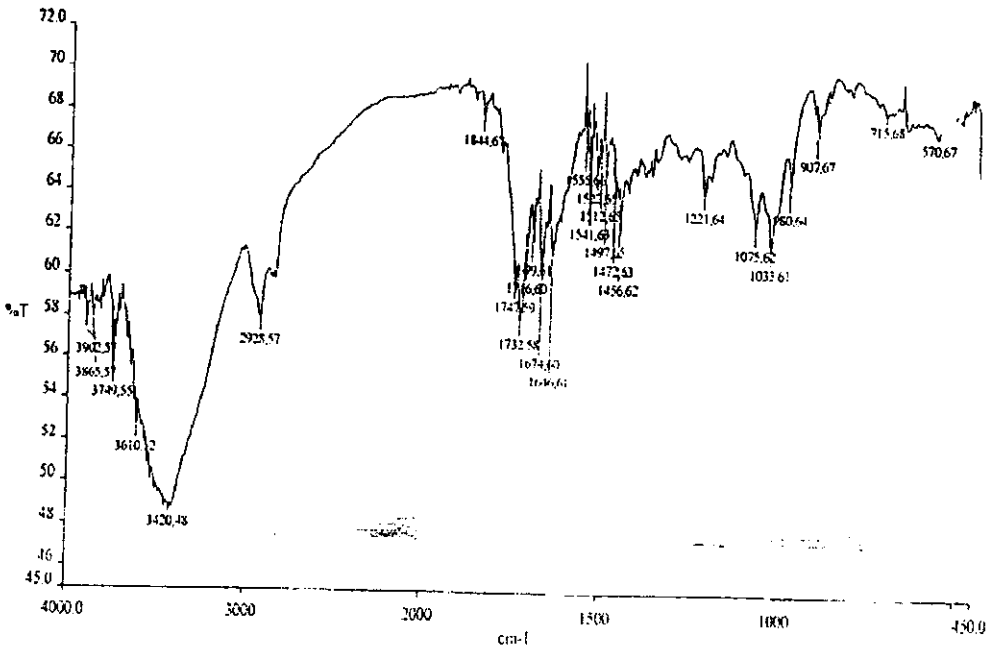
Gambar 5. Kromatogram ekstrak etanol 96% dengan eluen kloroform : methanol (9:1)

Profil Fingerprint FTIR

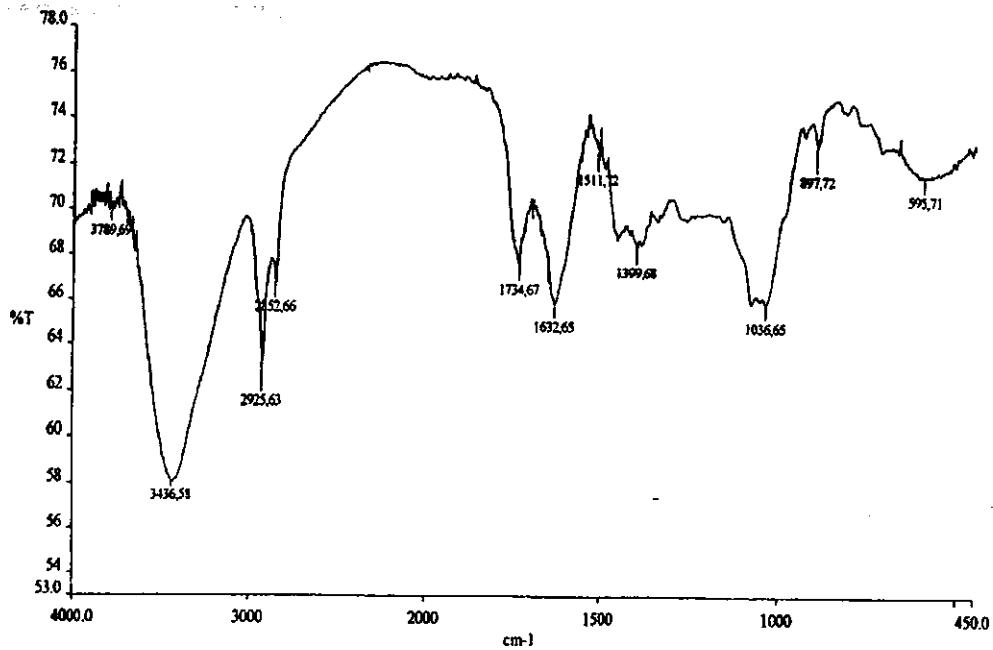


Andrographolide.pk

Gambar 5. Profil Fingerprint Standar Andrografolida dengan FTIR



Gambar 5. Profil Fingerprint Fraksi Diterpen Laktone dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)



Gambar 5. Profil Fingerprint Ekstrak Etanol 96% Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

4.4.4.8. Parameter Non Spesifik Fraksi Diterpen Lakton dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

4.4.4.8.1. Susut Pengerinan

Tabel 5.5 Hasil penetapan susut pengeringan fraksi Diterpen Lakton dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

No.	Berat Awal (g) A	Berat Akhir (g) B	Susut Pengerinan (%) (a-b)/a x 100 %
1.	0,4976	0,4870	2,13
2.	0,5012	0,4905	2,13
3.	0,4980	0,4872	2,17
Rata-rata			2,14
SD			0,023
KV			1,08

4.4.4.8.2. Kadar Abu

Tabel 5. Hasil penetapan kadar abu fraksi Diterpen Lakton dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

No.	Berat Awal (g)	Berat Abu (g)	Kadar Abu (%)
1.	0,5026	0,0502	9,95
2.	0,5067	0,0523	10,23
3.	0,4980	0,0500	10,40
Rata-rata			10,19
SD			0,2272
KV			2,23

4.4.4.8.3. Cemaran Logam Berat

Tabel 5.18 Hasil penetapan kadar cemaran logam berat fraksi diterpen lakton dari *Andrographis paniculata* (Labkesda Surabaya)

Parameter	Kadar Dalam serbuk (ppm)
Timbal (Pb)	0,749
Merkuri (Hg)	0
Arsen (As)	0
Cadmium (Cd)	0,461
Tembaga (Cu)	0,288

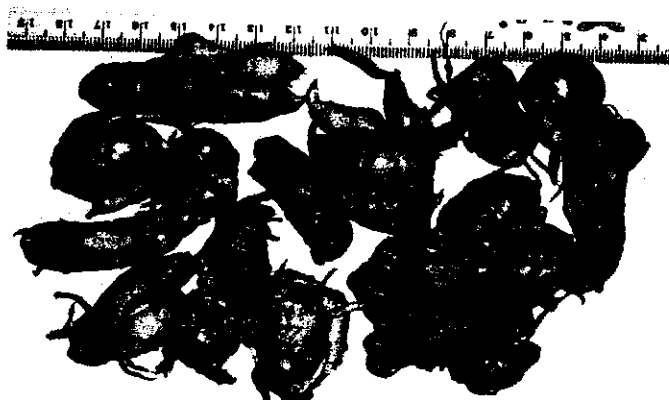
4.5. Standardisasi Simplisia Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

4.5.1. Pemeriksaan makroskopis rimpang kencur segar dan kering

Berikut ini adalah hasil uji makroskopik rimpang kencur:

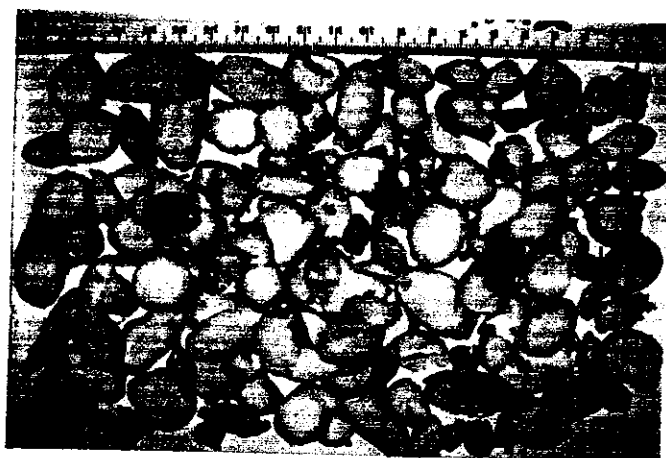
Tabel 5.1 Hasil uji makroskopik rimpang kencur

No.	Bagian yang Diperiksa	Hasil Pengamatan
1	Bentuk rimpang secara umum	Bentuk irisan melintangnya bulat, agak lonjong dan kadang tak beraturan, ukuran panjang-rimpang bervariasi, rata-rata yang terpanjang sekitar 7-8 cm
2	Bagian tepi rimpang - bentuk permukaan - warna	berombak, tidak rata coklat muda sampai coklat tua
3	Bagian tengah rimpang - warna	putih, putih kekuningan sampai putih kecoklatan
4	Bagian korteks - ukuran - warna - berkas pembuluh	sempit, lebar 1,5-3 mm Putih Ada
5	Bagian silinder pusat - ukuran - berkas pembuluh	diameternya rata-rata 0,4-1,8 cm Ada



Kaempferiae Rhizoma

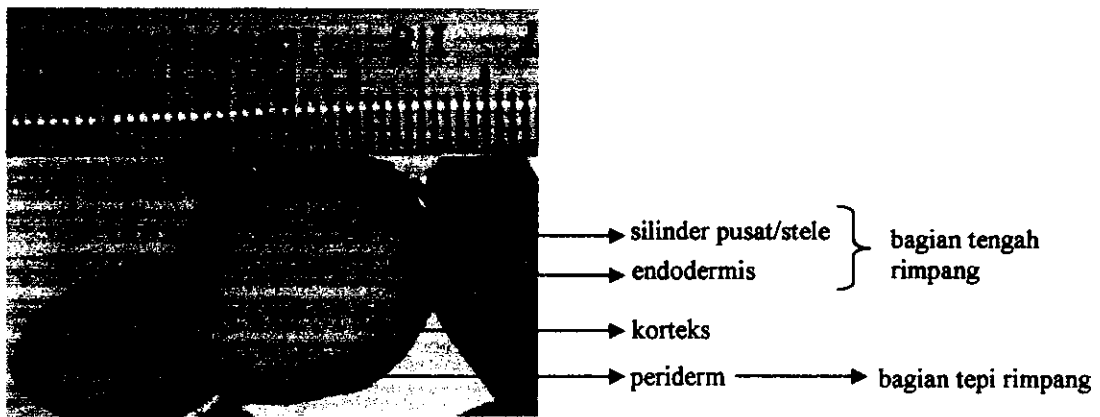
Gambar 5.1 Rimpang kencur segar



Gambar 5.2 Rajangan melintang rimpang kencur (segar)



Gambar 5.3 Rajangan melintang rimpang kencur (kering)



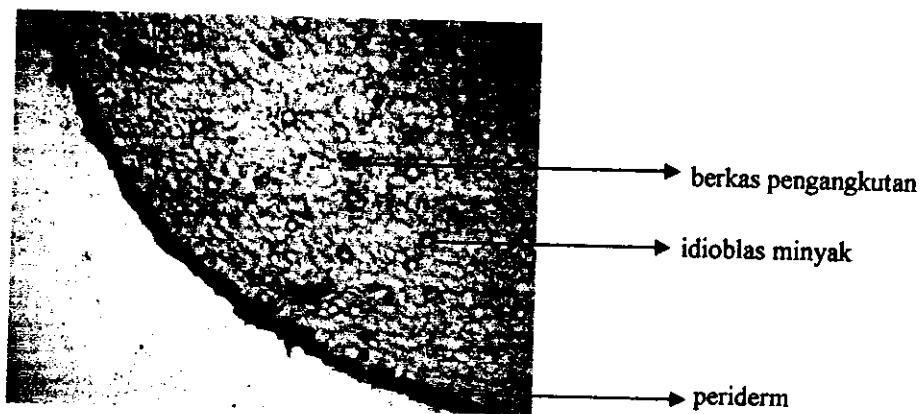
Gambar 5.4 Rajangan melintang rimpang kencur

4.5.1.2 Uji Mikroskopik Rimpang Kencur

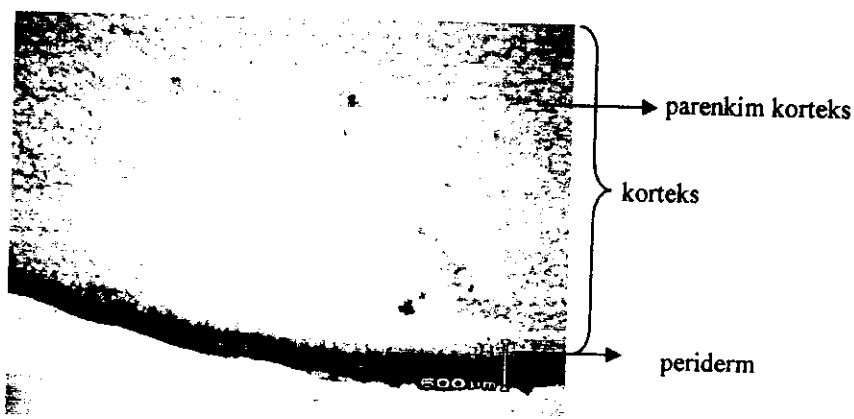
Berikut ini adalah hasil uji mikroskopik sayatan melintang rimpang kencur:

Tabel 5.2 Hasil uji mikroskopik sayatan melintang rimpang kencur

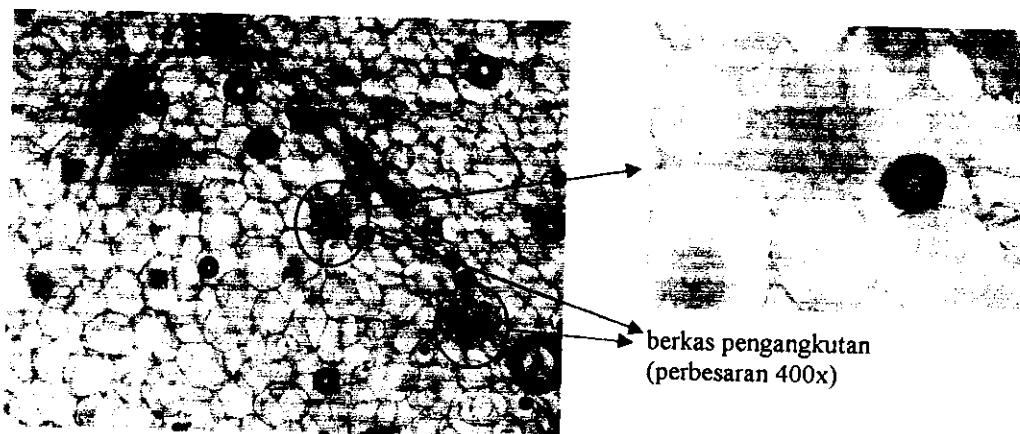
No.	Bagian	Hasil Pengamatan
1	Periderm	terdiri 3-6 lapis sel, sel berbentuk segi empat
2	Parenkim korteks	letaknya dibawah periderm, berisi butir-butir pati, sel idioblas minyak yang bentuknya hampir bulat dan berwarna kekuningan hingga tak berwarna
3	Berkas pengangkutan	letaknya tersebar pada korteks dan silinder pusat, tipenya ampivasal (xilem mengelilingi floem)
4	Endodermis	letaknya setelah korteks, terdiri atas selapis sel, dinding selnya agak menebal, tidak berisi butir pati
5	Silinder pusat atau stele	letaknya setelah endodermis, parenkimatik, berisi butir pati dan idioblas minyak seperti pada korteks, tipenya adalah ataktosteles (berkas pengangkutan tersusun secara acak)



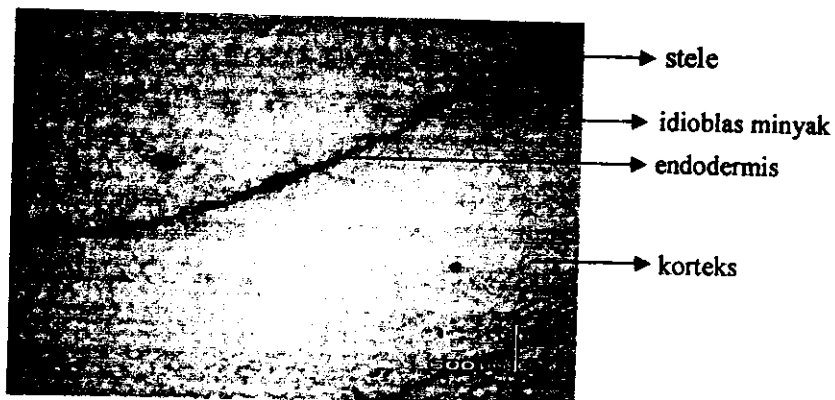
Gambar 5.5 Sayatan melintang bagian periderm hingga korteks rimpang kencur (perbesaran 100x)



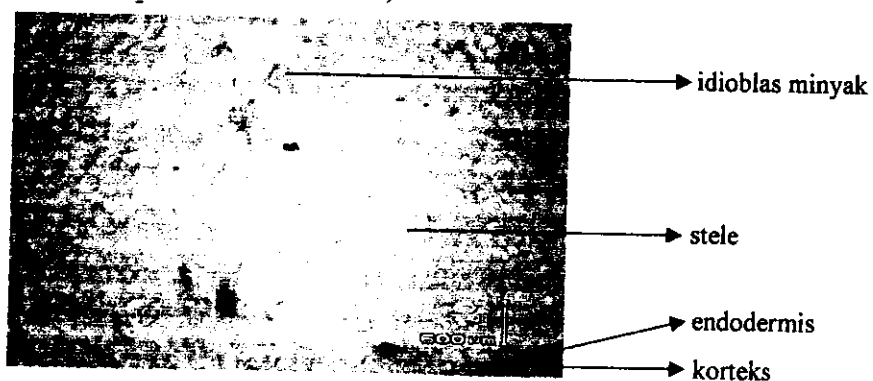
Gambar 5.6 Sayatan melintang bagian periderm sampai korteks rimpang kencur (perbesaran 100x)



Gambar 5.7 Sayatan melintang bagian korteks rimpang kencur (perbesaran 400x)



Gambar 5.8 Sayatan melintang bagian korteks sampai stele rimpang kencur (perbesaran 100x)

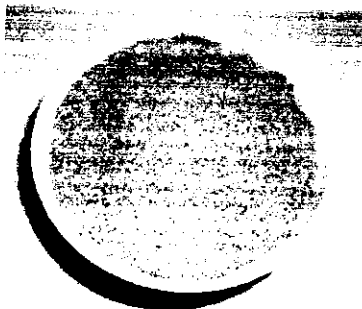


Gambar 5.9 Sayatan melintang bagian korteks sampai stele rimpang kencur (perbesaran 100x)

5.1.3 Uji Makroskopik dan Mikroskopik Serbuk Simplisia Rimpang Kencur

Berikut ini adalah hasil uji makroskopik serbuk simplisia rimpang kencur:

- a. Warna : coklat muda
- b. Bau : khas aromatik
- c. Rasa : pedas, hangat, agak pahit



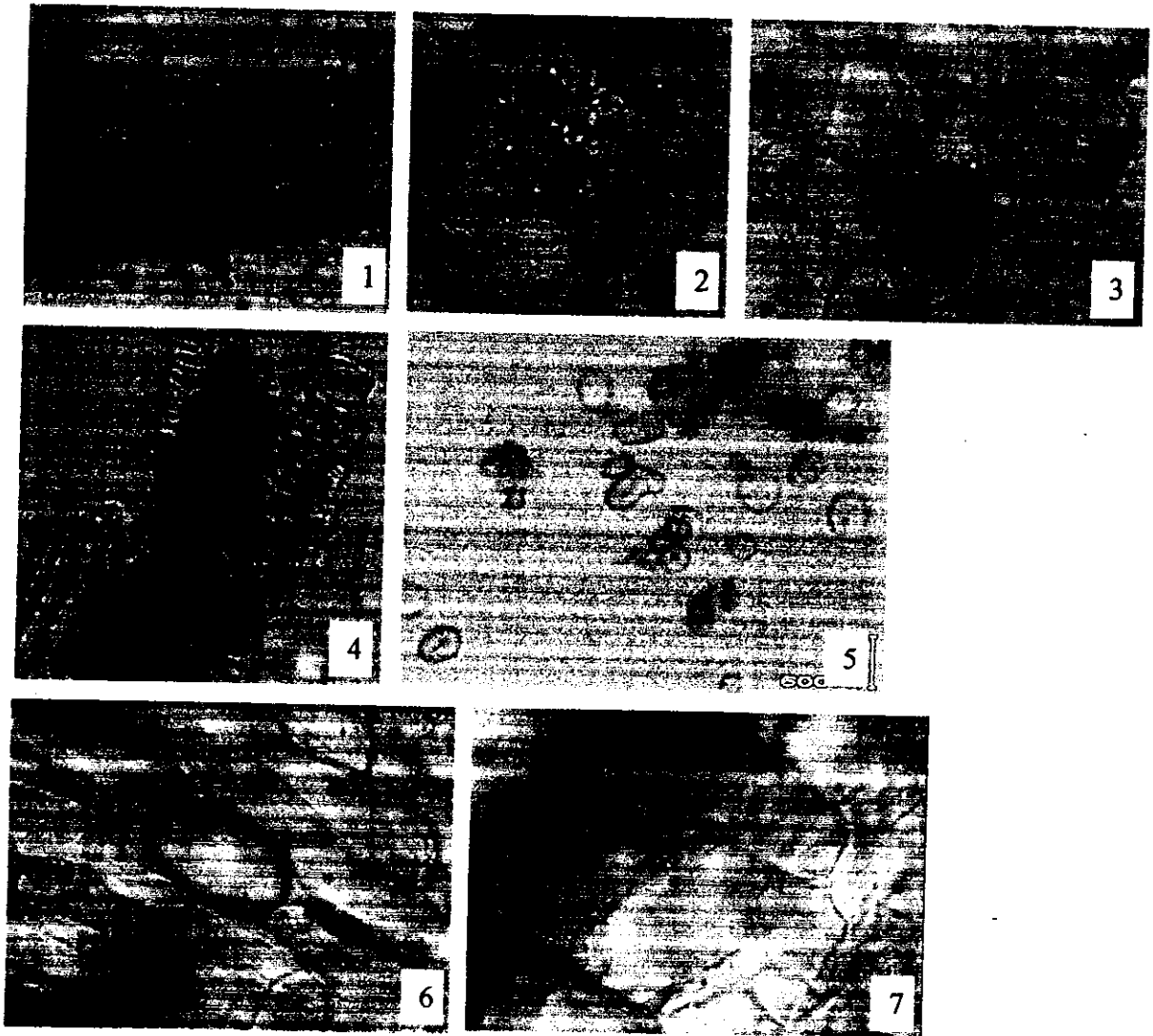
Gambar 5.10 Serbuk simplisia rimpang kencur

Berikut ini adalah hasil uji mikroskopik yakni pengamatan fragmen serbuk simplisia rimpang kencur dalam air:

Tabel 5.3 Hasil uji mikroskopik fragmen serbuk simplisia rimpang kencur dalam air

No.	Bagian	Hasil Pengamatan
1	Periderm	terdiri 3-6 lapis sel, sel berbentuk segi empat
2	Parenkim dengan butir pati	letaknya dibawah periderm, berisi butir-butir pati, terdapat pada bagian korteks maupun bagian silinder pusat
3	Jaringan vaskuler	letaknya tersebar pada korteks dan silinder pusat
4	Pembuluh kayu dengan penebalan spiral	Pembuluh kayu memiliki penebalan menyerupai bentuk spiral
5	Butir pati	umumnya tunggal, besar, bentuknya hampir bulat sampai bulat telur, lamela dan hilus tidak jelas
6	Parenkim dan sel minyak	letaknya dibawah periderm, berisi idioblas minyak dengan warna kekuningan hingga tidak berwarna, terdapat pada bagian korteks maupun bagian silinder pusat
7	Periderm dengan parenkim	periderm terdiri 3-6 lapis sel, sel berbentuk segi empat, sedangkan parenkim berbentuk lebih bulat

Berikut ini adalah fragmen-fragmen serbuk simplisia rimpang kencur dalam air yang dihasilkan:

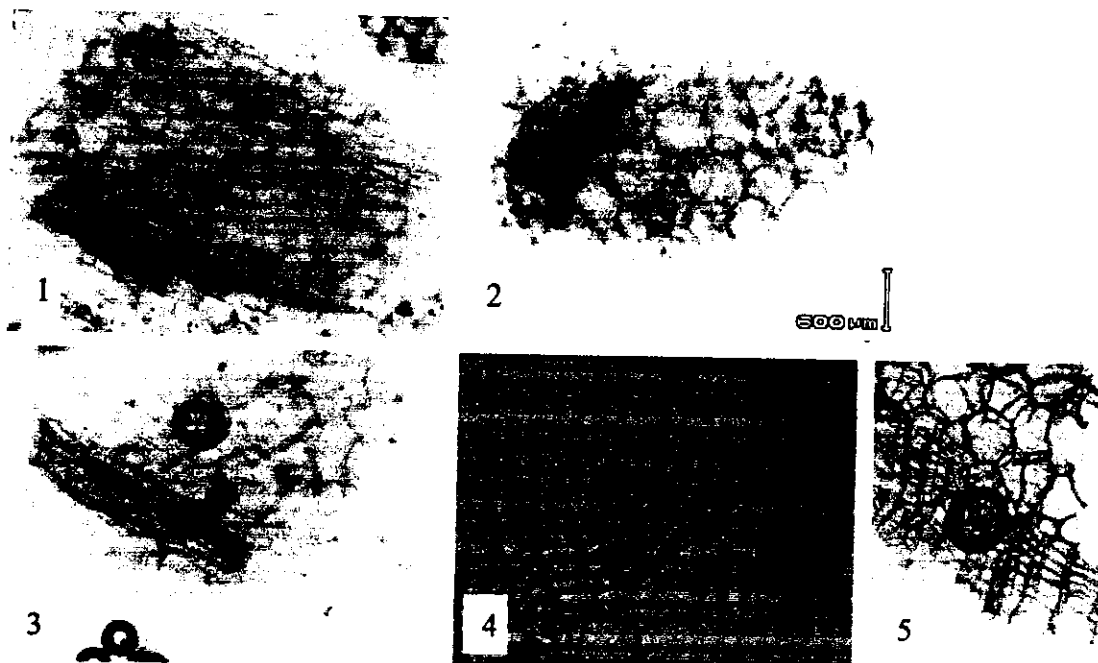


Gambar 5.11 Hasil uji mikroskopik serbuk simplisia rimpang kencur dalam air

Keterangan gambar:

1. Periderm (perbesaran 400x)
2. Parenkim dengan butir pati (perbesaran 400x)
3. Berkas pembuluh (perbesaran 400x)
4. Pembuluh kayu dengan penebalan spiral (perbesaran 400x)
5. Butir pati (perbesaran 400x)
6. Parenkim dan sel minyak (perbesaran 400x)
7. Periderm dengan parenkim korteks (perbesaran 400x)

Berikut ini adalah fragmen-fragmen serbuk simplisia rimpang kencur dalam kloralhidrat yang dihasilkan:



Gambar 5.12 Hasil uji mikroskopik serbuk simplisia rimpang kencur dalam kloralhidrat

Keterangan gambar:

1. Parenkim dan sel minyak (perbesaran 100x)
2. Parenkim (perbesaran 100x)
3. Parenkim dengan pembuluh kayu penebalan spiral (perbesaran 100x)
4. Periderm (perbesaran 100x)
5. Periderm dan parenkim korteks (perbesaran 100x)

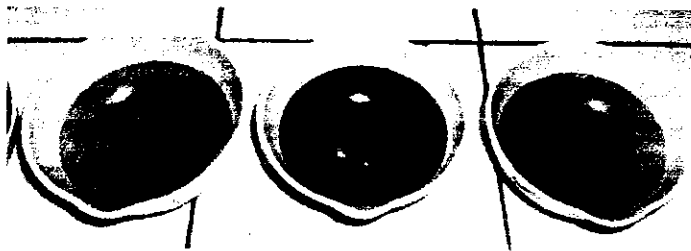
5.1.4 Penetapan Kadar Sari yang Larut dalam Air

Berikut ini adalah hasil penetapan kadar sari yang larut dalam air dari serbuk simplisia rimpang kencur:

Tabel 5.4 Hasil penetapan kadar sari yang larut dalam air

Replikasi ke-	Berat simplisia (g)	Berat residu (g)	% sari larut air (b/b)
1	5,0002	0,1441	14,4094
2	5,0027	0,1553	15,5216
3	5,0008	0,1444	14,4377
Rata-rata			14,7896
Standar deviasi (SD)			0,6341
Koefisien variasi (KV)			4,29
Persyaratan kadar*			tidak kurang dari 14%
Ket. (*): pustaka Materia Medika Indonesia jilid I			

Dari hasil tersebut, diketahui bahwa serbuk simplisia rimpang kencur yang diuji memenuhi persyaratan kadar sari yang larut dalam air yang ditetapkan Materia Medika Indonesia.



Gambar 5.13 Penetapan kadar sari larut air

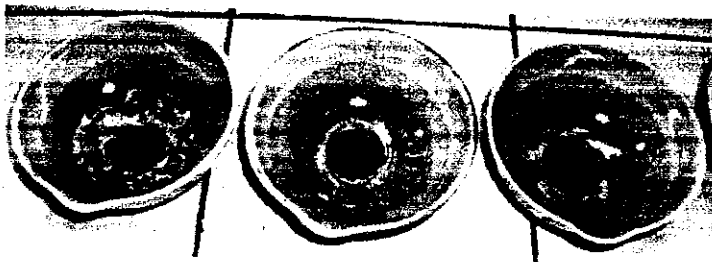
5.1.5 Penetapan Kadar Sari yang Larut dalam Etanol

Berikut ini adalah hasil penetapan kadar sari yang larut dalam etanol dari serbuk simplisia rimpang kencur:

Tabel 5.5 Hasil penetapan kadar sari yang larut dalam etanol

Replikasi ke-	Berat simplisia (g)	Berat residu (g)	% sari larut etanol (b/b)
1	5,0011	0,0264	2,6394
2	5,0018	0,0253	2,5291
3	5,0058	0,0255	2,5470
Rata-rata			2,5718
Standar deviasi (SD)			0,0592
Koefisien variasi (KV)			2,30
Persyaratan kadar*			tidak kurang dari 4%
Ket. (*): pustaka Materia Medika Indonesia jilid I			

Dari hasil tersebut, diketahui bahwa serbuk simplisia rimpang kencur yang diuji tidak memenuhi persyaratan kadar sari yang larut dalam etanol yang ditetapkan Materia Medika Indonesia.



Gambar 5.14 Penetapan kadar sari larut etanol

5.1.6 Penetapan Kadar Minyak Atsiri

Berikut ini adalah hasil penetapan kadar minyak atsiri dari serbuk simplisia rimpang kencur:

Tabel 5.6 Hasil penetapan kadar minyak atsiri

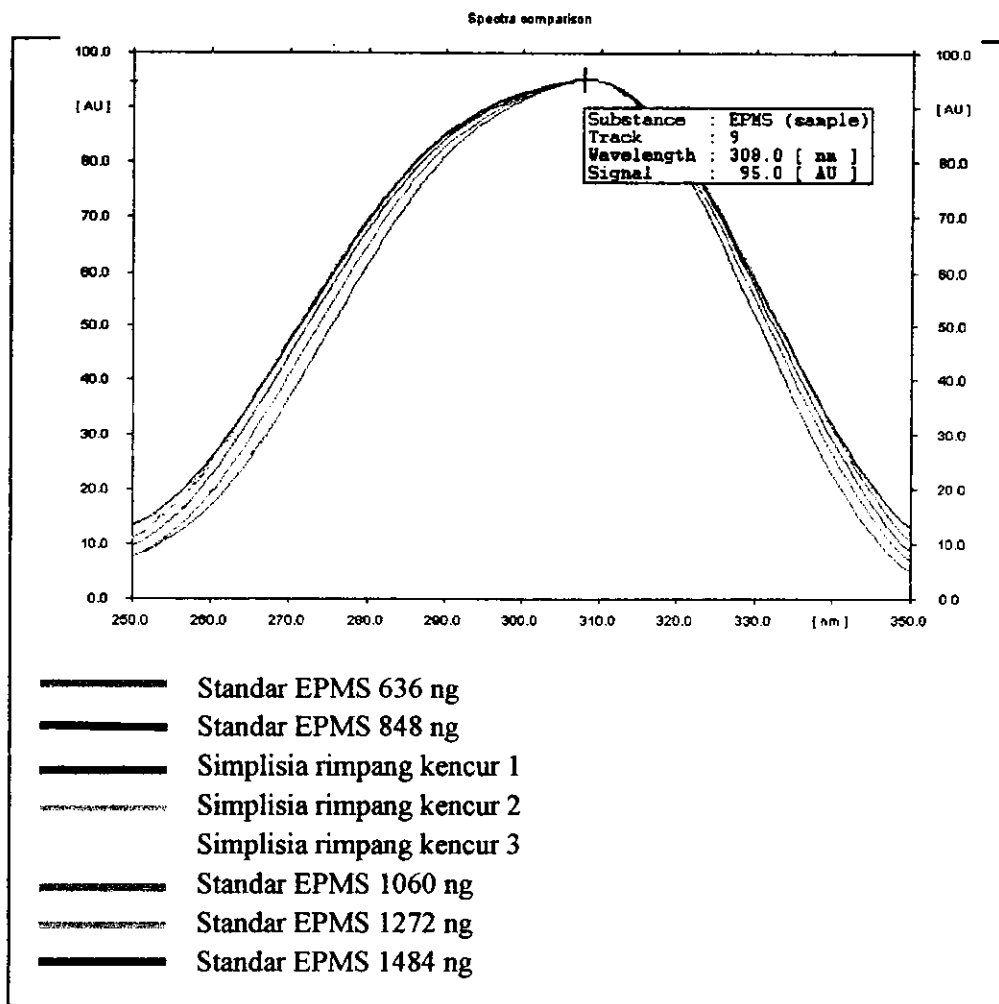
Replikasi ke-	Berat simplisia (g)	Volume minyak atsiri (mL)	% kadar minyak atsiri (%v/b)
1	10,0010	0,09	0,90
2	10,0140	0,10	1,00
3	10,0851	0,09	0,89
Rata-rata			0,93
Standar deviasi (SD)			0,0608
Koefisien variasi (KV)			6,54
Persyaratan kadar*			2,4-3,9%
Ket. (*): pustaka Materia Medika Indonesia jilid I			

Dari hasil tersebut, diketahui bahwa serbuk simplisia rimpang kencur yang diuji tidak memenuhi persyaratan kadar minyak atsiri yang ditetapkan Materia Medika Indonesia.

5.1.7 Validasi Metode Analisis

5.1.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Berikut ini merupakan hasil penentuan panjang gelombang maksimum dari lima standar EPMS yang diekstraksi menggunakan eluen heksan:etil asetat: asam formiat dengan perbandingan 9 : 1 : 2 tetes (2 tetes untuk 10 mL):

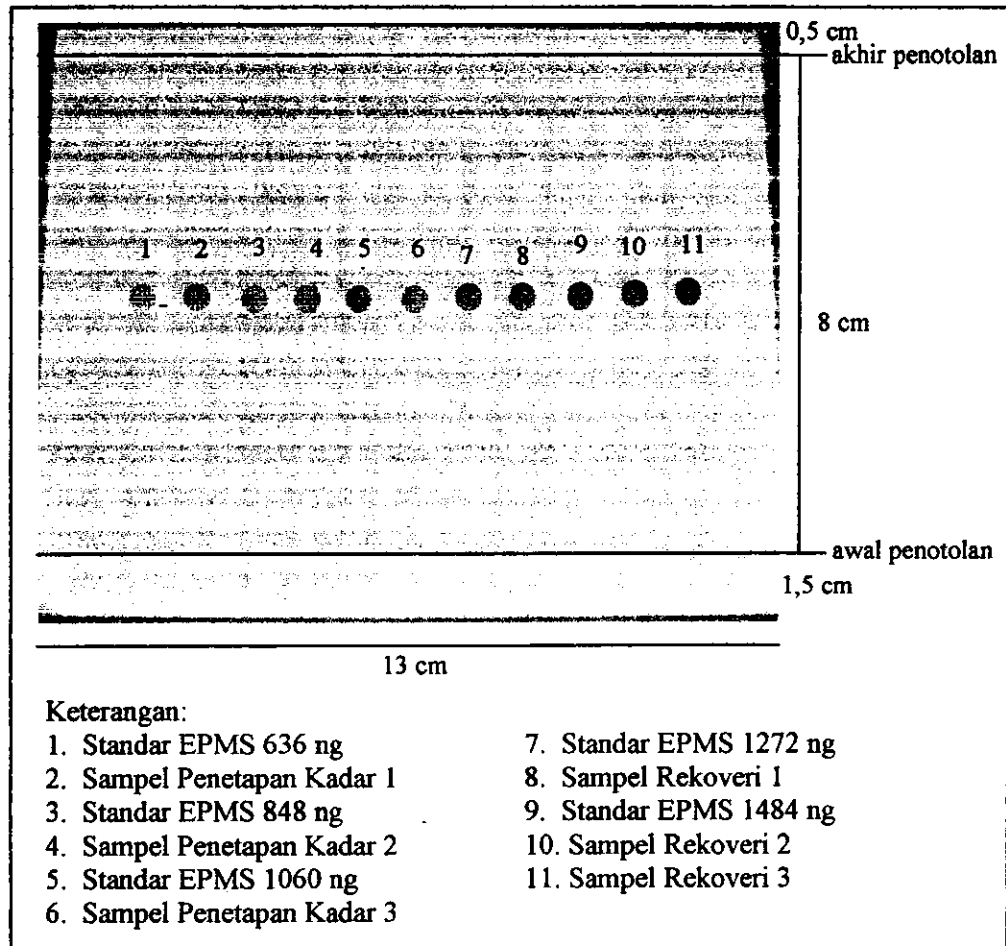


Gambar 5.15 Profil spektra standar EPMS untuk penentuan panjang gelombang maksimum

Dari hasil tersebut, panjang gelombang terpilih untuk analisis EPMS dengan menggunakan KLT-densitometer selanjutnya adalah 308 nm.

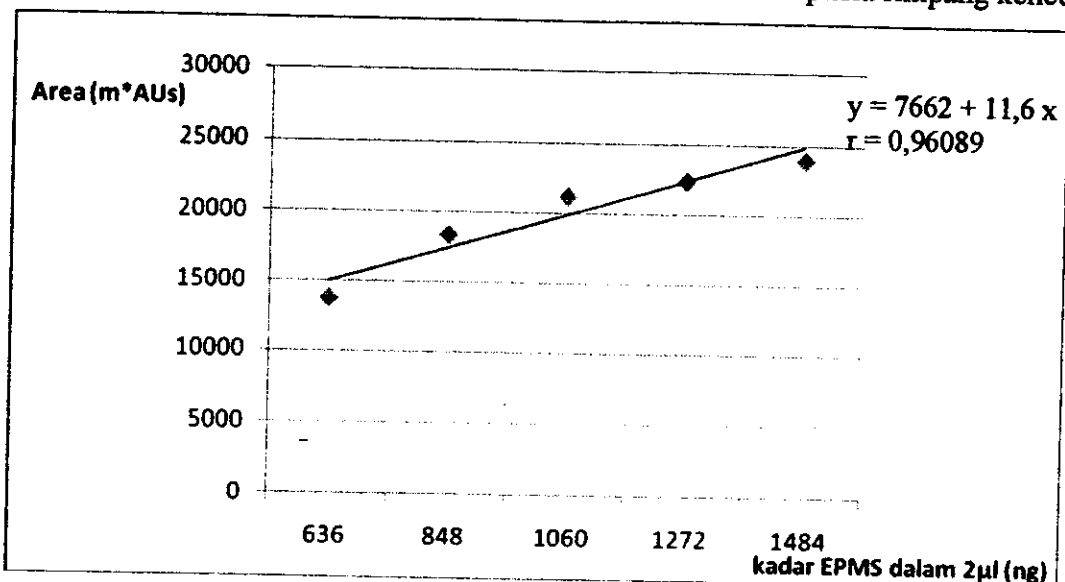
5.1.7.2 Linieritas

Berikut ini merupakan hasil KLT yang didapatkan dari penotolan lima standar EPMS, tiga larutan sampel untuk penetapan kadar dan tiga larutan sampel untuk rekoverti (uji akurasi):



Gambar 5.16 Plat KLT yang dipayar pada lampu UV yang sebelumnya telah ditotol beberapa larutan, dieluasi dengan eluen heksan:etil asetat: asam formiat = 9 : 1 : 2 tetes (2 tetes untuk 10 mL), noda yang tampak merupakan senyawa EPMS

Berikut ini adalah hasil uji linieritas dari serbuk simplisia rimpang kencur:



Gambar 5.17 Kurva linieritas area vs kadar EPMS dalam 2 µL (ng) pada λ 308 nm dengan metode KLT-densitometri

Berikut ini merupakan hasil penentuan panjang gelombang maksimum dari standar EPMS yang diekstraksi menggunakan eluen heksan:etil asetat:

Tabel 5.7 Hasil uji linieritas pada beberapa kadar

Kadar dalam 2 µL (ng)	Area
636	13720,23
848	18387,06
1060	21266,36
1272	22445,72
1484	23990,79

$$y = 7662 + 11,6 x$$

$$r = 0,96089$$

$p = 0,037$ ($p < 0,05$), maka $\alpha = 0,05$ sehingga untuk $n = 5$ nilai $r_{tabel} = 0,7545$

Karena $r > r_{tabel}$, maka artinya terdapat korelasi yang linier antara kadar (x) dan area (y).

5.1.7.3 Presisi

Berikut ini adalah hasil uji presisi dari serbuk simplisia rimpang kencur:

Tabel 5.8 Hasil uji presisi penotolan larutan baku induk 1000 ppm

Sampel	Rf	Area
1	0,60	28447,68
2	0,58	28070,69
3	0,58	28160,60
4	0,57	27781,19
5	0,57	27717,16
6	0,57	28240,54
7	0,57	28397,46
8	0,57	29312,10
9	0,59	31396,47
10	0,59	28398,27

Area rata-rata = 28592,216

SD = 1079,30

KV = 3,77%

5.1.7.4 Akurasi

Berikut ini adalah hasil uji akurasi dari serbuk simplisia rimpang kencur:

Tabel 5.9 Hasil uji akurasi

Replikasi ke-	Berat simplisia (g)	% recovery
1	0,5054	103,16
2	0,5096	99,20
3	0,5019	92,56
Rata-rata		98,31
Standar deviasi (SD)		5,36
Koefisien variasi (KV)		5,45

5.1.8 Penetapan Kadar EPMS dalam Rimpang Kencur

Berikut ini adalah hasil penetapan kadar EPMS dari serbuk simplisia rimpang kencur:

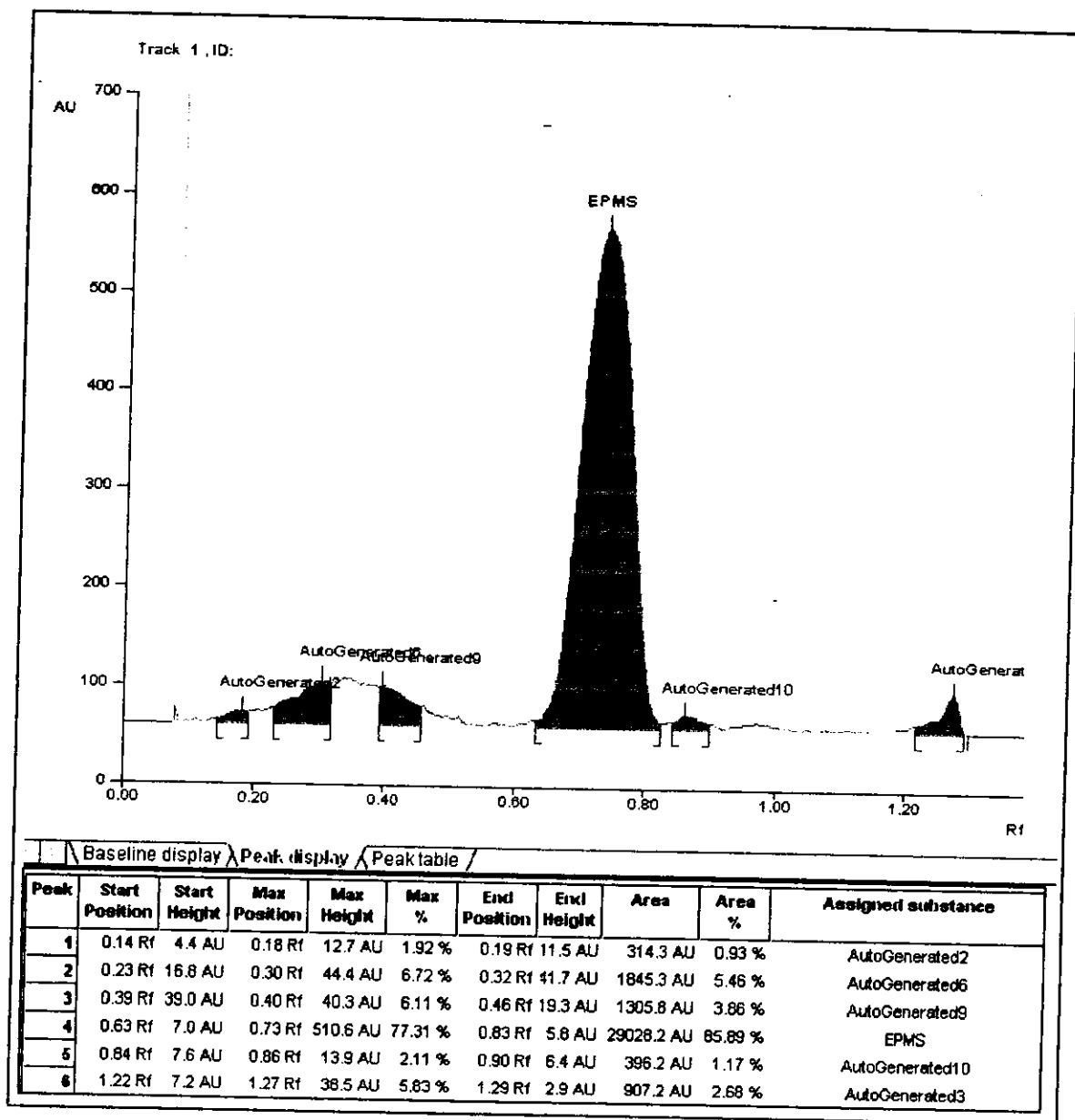
Tabel 5.10 Hasil penetapan kadar EPMS dalam rimpang kencur

Replikasi ke-	Berat simplisia (g)	Kadar EPMS (%b/b)
1	0,5026	8,33
2	0,5095	8,53
3	0,5060	8,73
Rata-rata		8,53
Standar deviasi (SD)		0,2
Koefisien variasi (KV)		2,34

5.1.9 Penetapan Sidik Jari (*Fingerprint*) Simplisia Rimpang Kencur

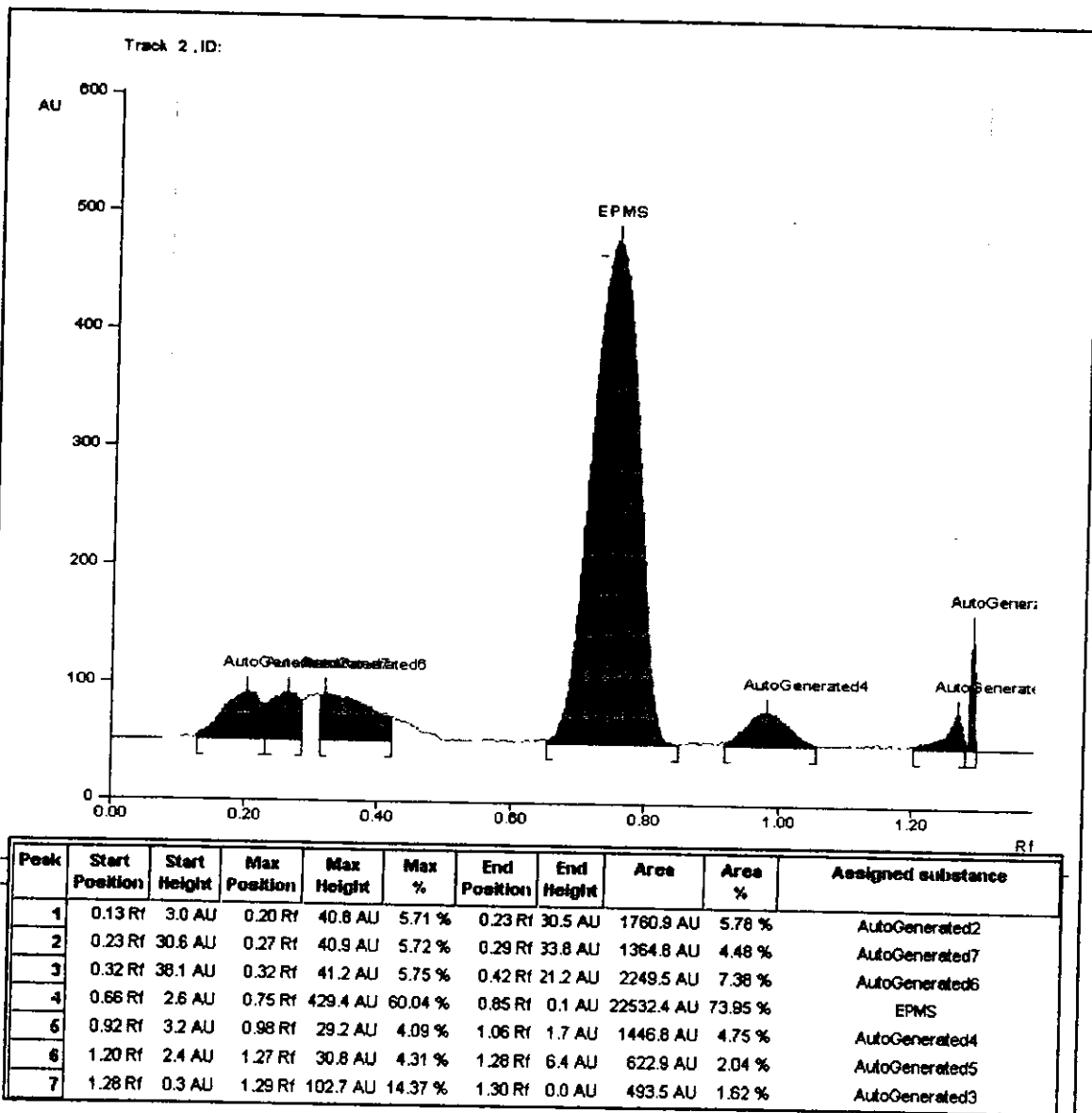
5.1.9.1 Penetapan Sidik Jari Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

Berikut ini adalah kromatogram yang dihasilkan dari pemayaran plat KLT yang telah ditotol dengan standar EPMS dan diekusi dengan heksan:etil asetat:asam formiat= 9:1:2 tetes (2 tetes untuk 10 mL):



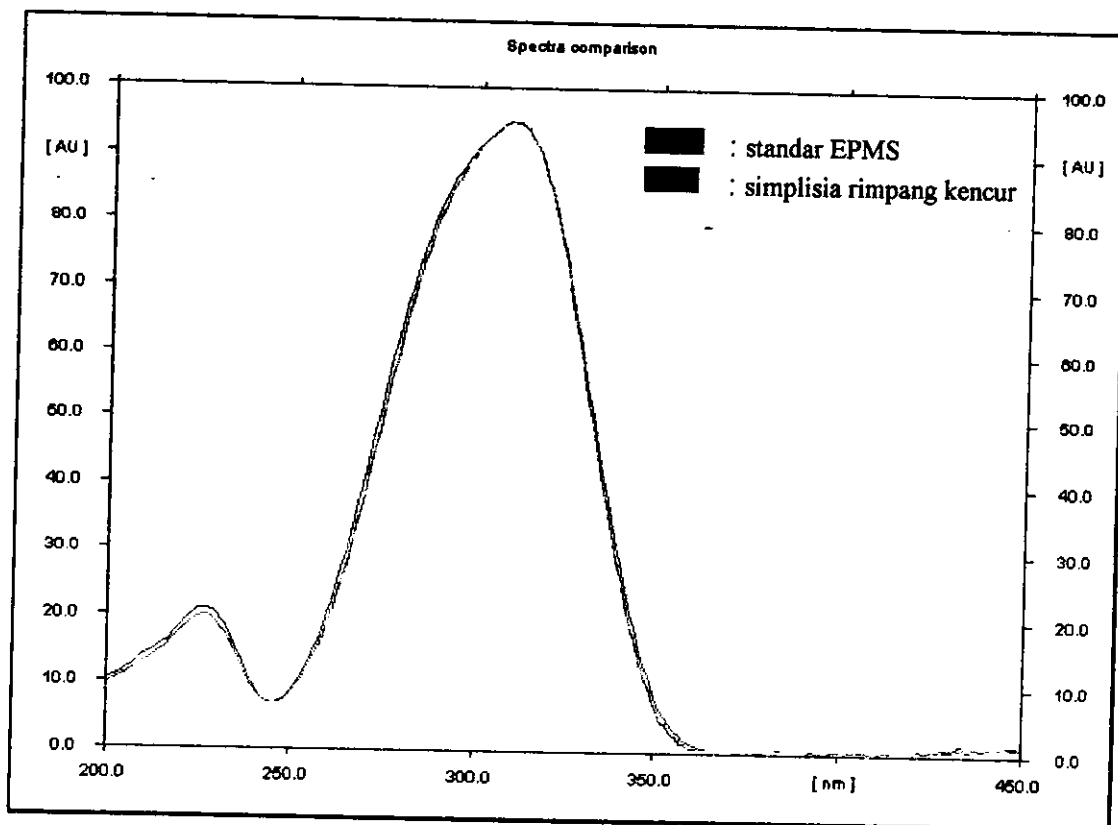
Gambar 5.18 Kromatogram dua dimensi hasil penetapan sidik jari standar EPMS dengan menggunakan KLT-densitometri

Dari kromatogram Gambar 5.18 tersebut simplisia rimpang kencur yang diperiksa menghasilkan *peak* pada Rf 0,18; 0,30; 0,40; 0,73; 0,86 dan 1,27. Berikut ini adalah kromatogram simplisia rimpang kencur yang dihasilkan dari eluasi dengan heksan:etil asetat:asam formiat= 9:1:2 tetes (2 tetes untuk 10 mL):



Gambar 5.19 Kromatogram dua dimensi hasil penetapan sidik jari simplisia rimpang kencur dengan menggunakan KLT-densitometri

Dari kromatogram 5.18 dan 5.19 diatas didapatkan untuk masing-masing sampel yang diperiksa yakni standar EPMS dan simplisia rimpang kencur didapatkan area terbesar pada keduanya masing-masing 29028,2 AU dan 22532,4 AU pada Rf 0,73 dan 0,75. Area tersebut merupakan area senyawa EPMS. Untuk memastikannya dilakukan *overlay* spektra kedua sampel tersebut. Berikut ini merupakan *overlay* spektra keduanya:



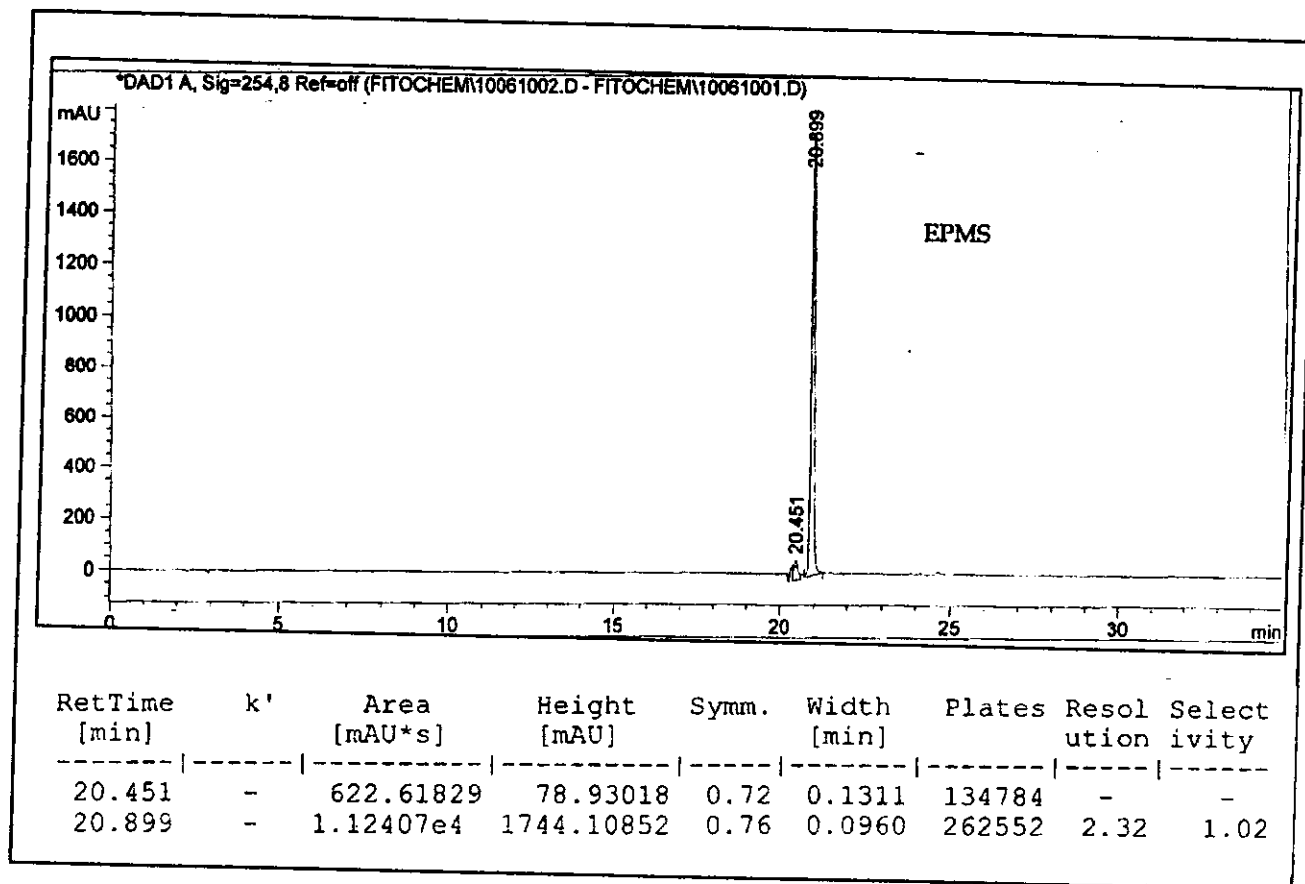
Gambar 5.20 *Overlay* spektra standar EPMS dan simplisia rimpang kencur dengan menggunakan KLT-densitometri

Dari spektra diatas, terlihat bahwa bentuk spektra simplisia rimpang kencur (pada Rf 0,75) pada panjang gelombang 200 nm sampai 450 nm mirip dengan standar EPMS (pada Rf 0,73), jadi dapat dipastikan bahwa senyawa pada Rf 0,75 adalah EPMS.

5.1.9.3 Penetapan Sidik Jari Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

5.1.9.3.1 Sidik Jari Standar EPMS

Berikut ini adalah hasil penetapan sidik jari dari standar EPMS dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi:



Gambar 5.21 Kromatogram hasil penetapan sidik jari standar EPMS dengan menggunakan KCKT

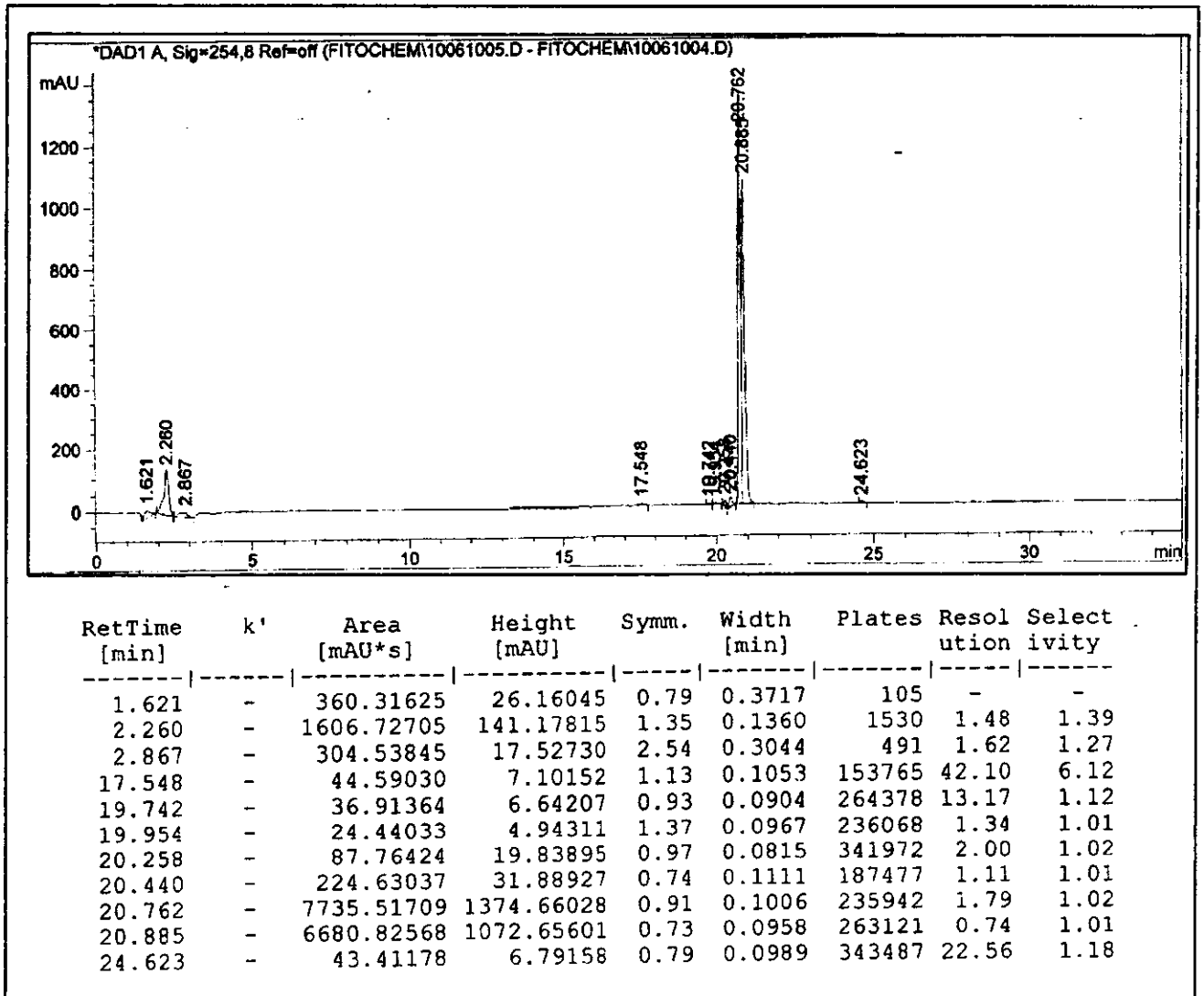
Kondisi KCKT:

- Kolom: Lichrosphere 100 RP 18, 5 μ m, 4,6x250 mm
- Eluen: aqua bidestilata:metanol pro KCKT = 90:10, dengan eluasi gradien
- Kecepatan aliran eluen: 1 mL/menit
- Suhu: 30°C
- Volume yang diinjeksikan: 20 μ L

Dari kromatogram yang dihasilkan, terlihat standar EPMS memiliki *peak* pada waktu retensi 20,451 dan 20,899 menit.

5.1.9.3.2 Sidik Jari Simplisia Rimpang Kencur

Berikut ini adalah hasil penetapan sidik jari dari standar EPMS dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi:



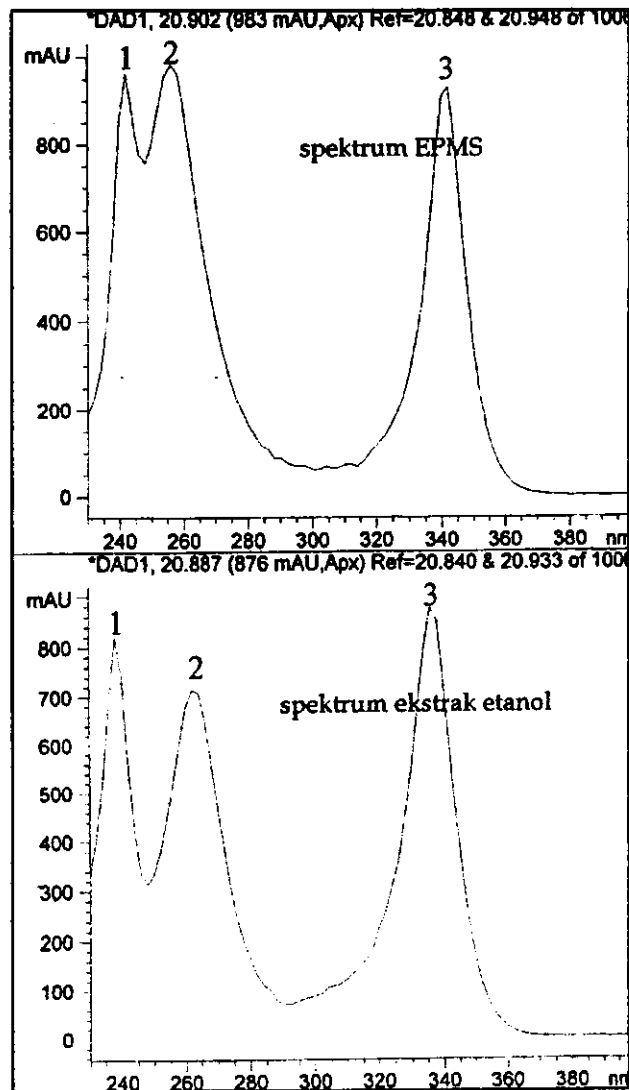
Gambar 5.22 Kromatogram hasil penetapan sidik jari serbuk simplisia rimpang kencur dengan menggunakan KCKT

Kondisi KCKT:

- Kolom: Lichrosphere 100 RP 18, 5 µm, 4,6x250 mm

- Eluen: aqua bidestilata:metanol pro KCKT = 90:10, dengan eluasi gradien
- Kecepatan aliran eluen: 1 mL/menit
- Suhu: 30°C
- Volume yang diinjekkan: 20 µL

Dari kromatogram simplisia kencur yang dihasilkan, terlihat adanya beberapa *peak* yang signifikan yakni pada yakni pada 2,260; 20,762 dan 20,885 menit. Dari kromatogram Gambar 5.21 dan 5.22 terlihat adanya *peak* yang dengan waktu retensi yang hampir sama, yakni pada waktu retensi pada standar EPMS waktu retensi 20,440 menit dan simplisia rimpang kencur 20,885 menit. Hal ini menunjukkan bahwa simplisia rimpang kencur yang diuji mengandung etil *p*-metoksisinamat (EPMS). Untuk memastikan apakah senyawa tersebut EPMS ataupun bukan, maka dilakukan pemeriksaan spektra. Berikut ini merupakan spektra standar EPMS (pada waktu retensi 20,440 menit) dan simplisia rimpang kencur (pada waktu retensi 20,885 menit):

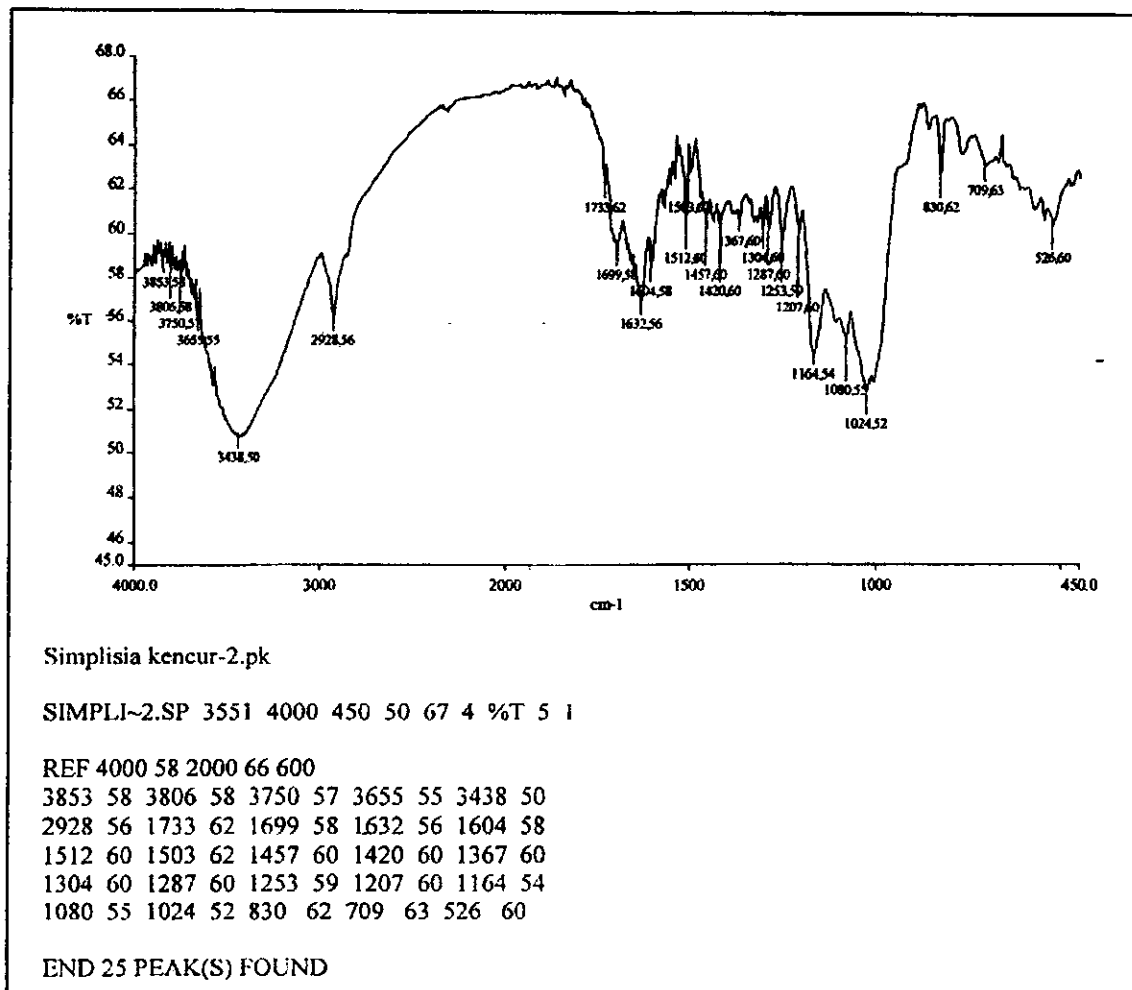


Gambar 5.23 Spektra standar EPMS (atas) dan simplisia rimpang kencur (bawah) dengan menggunakan KCKT

a sama-sama menghasilkan tiga *peak*, hanya saja terdapat sedikit perbedaan yakni pada *peak* 1 dan 2. Perbedaan ini dimungkinkan karena kompleksnya senyawa dalam simplisia rimpang kencur bila dibandingkan dengan standar EPMS yang cenderung lebih murni.

5.1.9.2 Penetapan Sidik Jari Menggunakan Spektrofotometer Inframerah

Berikut ini adalah hasil penetapan sidik jari dari serbuk simplisia rimpang kencur dengan menggunakan Spektrofotometer Inframerah:



Gambar 5.24 Spektra hasil penetapan sidik jari simplisia rimpang kencur dengan menggunakan spektrofotometri IR

5. Pembuatan Fraksi EMPS rimpang Kencur.

5.1 Identitas Fraksi EPMS

- Nama Fraksi : Fraksi EPMS Rimpang Kencur
 Nama Tanaman : *Kaempferia galanga* L.
 Nama Indonesia : Kencur
 Bagian Tanaman : Rimpang

5.2 Pembuatan Fraksi Minyak Kencur

Rimpang *Kaempferia galanga* L. diiris tipis-tipis, dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sampai diperoleh simplisia kering. Simplisia yang telah kering diserbuk hingga halus. Serbuk *Kaempferia galanga* L. sebanyak 500 gram diekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan empat kali dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 2 liter. Tiap maserasi dilakukan selama satu kali 24 jam. Setelah itu maserat dari serbuk *Kaempferia galanga* L. disaring menggunakan corong Buchner untuk mendapatkan cairan filtrat *Kaempferia galanga* L.

Filtrat dari empat kali maserasi dikumpulkan dan diuapkan hingga menjadi 2% dari jumlah semula menggunakan rotavapor dengan tekanan rendah. Ekstrak pekat yang didapat kemudian ditambah dengan aquades dengan perbandingan 3 : 1 selanjutnya dilakukan proses pendiaman selama tiga hari. Dari proses tersebut akan didapatkan dua fase yaitu fase alkohol pada lapisan atas dan fase minyak pada lapisan bawah. Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan menggunakan corong pisah untuk memperoleh fase minyak tersebut. Fase minyak yang didapat disebut sebagai fraksi minyak dari rimpang *Kaempferia galanga* L. yang akan digunakan sebagai bahan penelitian.

Tabel 5.1 dibawah ini menunjukkan jumlah bahan serta pelarut yang dibutuhkan untuk mendapatkan fraksi minyak kencur

Tabel 5.1 Hasil Pembuatan Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

No	Uraian bahan	Jumlah
1	Simplisia kering	1 kg
2	Etanol 96%	16 liter
3	Ekstrak yang telah dipekatkan	320 ml
4	Aquades	105 ml
5	Fraksi Minyak	270 ml

Dengan demikian maka 1 ml fraksi minyak kencur setara dengan 3,3 gram simplisia kering.



Gambar 5.1 Hasil Fraksinasi Minyak *Kaempferia galanga* L.

5.3 Hasil Pengamatan Organoleptik Fraksi

Fraksi minyak kencur diamati secara organoleptik, hasil pengamatan ditunjukkan pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Hasil Pengamatan Organoleptik Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

No.	Uraian	Hasil
1	Bentuk	Cair
2	Warna	Coklat tua
3	Rasa	Pahit
4	Bau	Aromatis

5.4 Hasil Penetapan Parameter Non Spesifik

5.4.1 Bobot Jenis Fraksi

Hasil penetapan bobot jenis fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) menggunakan piknometer dengan volume 24,798 cm³ pada suhu 20°C tercantum pada tabel 5.3

Tabel 5.3 Hasil Penetapan Bobot Jenis Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

No.	Berat piknometer kosong (gram)	Berat piknometer + zat (gram)	Berat zat (gram)	Berat jenis zat (gram/ml)
1	33,0975	57,6107	24,5132	0,9885
2	33,0977	57,6058	24,5091	0,9884
3	33,0975	57,6043	24,5068	0,9883
X (rata-rata)				0,9884
SD				0,0001
KV				0,0101 %

Bobot Jenis fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) sebesar $0,9884 \pm 0,0001$ g/ml dengan nilai koefisien variasi sebesar 0,0101 %.

5.4.2 Penetapan Susut Pengerinan

Hasil penetapan susut pengerinan fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) tercantum pada tabel 5.4

Tabel 5.4 Hasil Penetapan Susut Pengerinan Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

No.	Berat fraksi minyak (gram) A	Berat konstan (gram) B	Susut Pengerinan (%) $\frac{A-B}{A} \times 100\%$
1	1,9768	1,7731	10,3045 %
2	1,9768	1,7812	9,8948 %
3	1,9768	1,7783	10,0415 %

X (rata-rata)	10,0803 %
SD	0,2076
KV	2,0593 %

Susut pengeringan fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) sebesar $10,0803 \pm 0,2076$ % dengan nilai koefisien variasi 2,0593 %.

5.4.3 Penetapan Kadar Abu

Hasil penetapan kadar abu fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) tercantum pada tabel 5.5

Tabel 5.5 Hasil Penetapan Kadar Abu Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

No.	Berat Abu (gram) A	Berat Fraksi Minyak (gram) B	Kadar Abu (%)
			$\frac{A}{B} \times 100\%$
1	0,0005	1,9768	0,0253
2	0,0004	1,9768	0,0202
3	0,0005	1,9768	0,0253
X (rata-rata)			0,0236

Kadar abu yang didapat 0,0236% sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) ini tidak mengandung abu.

5.4.4 Penetapan Cemaran Logam Berat

Hasil penetapan kadar cemaran logam berat fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) tercantum pada tabel 5.6

Tabel 5.6 Hasil Penetapan Kandungan Logam Berat Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

No	Kandungan Logam Berat	Jumlah (ppm)
1	Cadmium (Cd)	0.012 ppm
2	Tembaga (Cu)	0.267 ppm
3	Merkuri (Hg)	0,000 ppm
4	Timbal (Pb)	0.048 ppm

Pemeriksaan kadar logam berat dalam Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.) ini dilakukan oleh Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

5.5 Hasil Penetapan Parameter Spesifik

5.5.1 Penetapan Kadar Senyawa Larut Air

Hasil penetapan kadar senyawa larut air fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) tercantum pada tabel 5.7

Tabel 5.7 Hasil Penetapan Kadar Senyawa Larut Air Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

No.	Berat fraksi minyak (gram)	Berat residu konstan (gram)	Kadar senyawa Larut Air (%)
	A	B	$\frac{B}{A} \times 100\%$
1	4,9419	0,0215	0,4351
2	4,9419	0,0210	0,4249
3	4,9419	0,0211	0,4270
X (rata-rata)			0,4290

SD	0,0054
KV	1,2555 %

Kadar senyawa larut air fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) sebesar $0,4290 \pm 0,0054$ % dengan koefisien variasi sebesar 1,2555 %.

5.5.2 Penetapan Kadar Senyawa Larut Etanol

Hasil penetapan kadar senyawa larut etanol fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) tercantum pada tabel 5.8

Tabel 5.8 Hasil Penetapan Kadar Senyawa Larut Etanol Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

No.	Berat fraksi minyak (gram) A	Berat residu konstan (gram) B	Kadar senyawa Larut Etanol (%)
			$\frac{B}{A} \times 100\%$
1	4,9419	3,3695	68,1823
2	4,9419	3,3693	68,1782
3	4,9419	3,3700	68,1924
X (rata-rata)			68,1843
SD			0,0073
KV			0,0107 %

Kadar senyawa larut etanol fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) sebesar $68,1843 \pm 0,0073$ % dengan koefisien variasi sebesar 0,0107 %.

5.5.3 Validasi Metode Penelitian

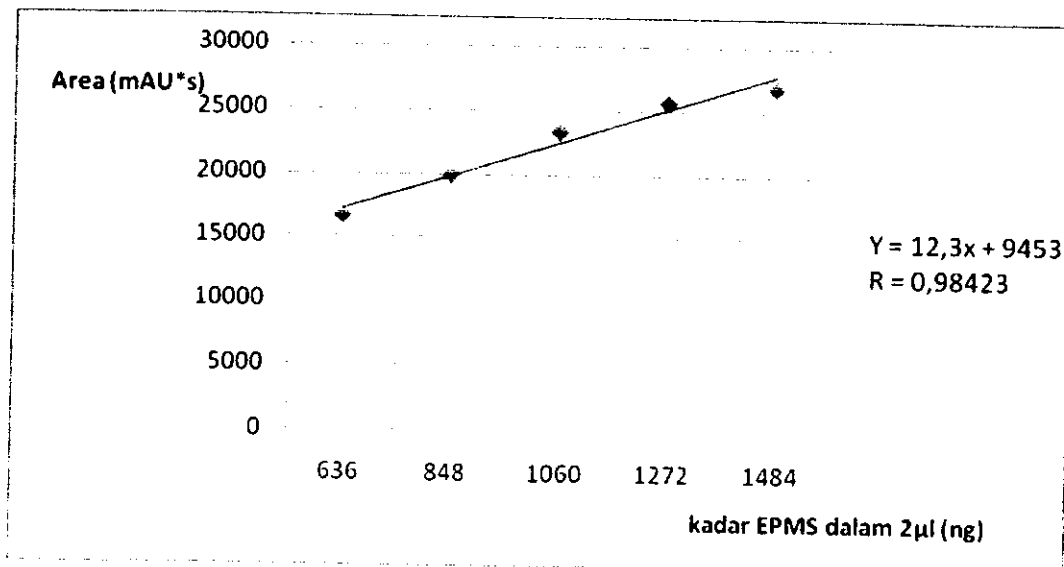
5.5.3.1 Linieritas

Hasil pengamatan area puncak terhadap lima macam kadar Etil *p*-Metoksi Sinamat dapat dilihat pada tabel 5.9.

Tabel 5.9 Data Hubungan Antara Kadar EPMS dalam 2 μ l (ng) dengan Area dari Baku Etil *p*-Metoksi Sinamat (mAU*s)

Kadar EPMS dalam 2 μ l (ng)	Area (mAU*s)
636	16667,65
848	19929,92
1060	23383,77
1272	25646,33
1484	26852,31

$Y = 9453 + 12.3 x$, $r_{hitung} = 0.98423$, $r_{tabel} = 0,7545$ ($n = 5$, $\alpha < 0,05$)



Gambar 5.2 Hubungan Antara Kadar EPMS dalam 2 μ l (ng) dengan Area dari Baku Etil *p*-Metoksi Sinamat (mAU*s)

Dari data linieritas larutan standar 300, 400, 500, 600, dan 700 ppm maka diperoleh persamaan regresi $Y = 9453 + 12,3 x$ dengan nilai r_{hitung} sebesar 0.98423, nilai r_{tabel} yang digunakan adalah 0,7545 ($\alpha < 0.05$). Dari data tersebut didapat $r_{hitung} > r_{tabel}$ sehingga data tersebut menunjukkan adanya hubungan yang linear antara konsentrasi standar etil *p*-metoksi sinamat dengan area puncak etil *p*-metoksi sinamat. Oleh karena itu persamaan linearitas tersebut dapat digunakan untuk penentuan kadar etil *p*-metoksi sinamat dalam sampel fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.).

5.5.3.2 Presisi

Dari presisi yang telah dilakukan diperoleh data area serta R_f dari penotolan standar 1000 ppm sebanyak 10 kali masing-masing sebanyak 2 μ l. Data yang diperoleh dicantumkan pada tabel 5.10

Tabel 5.10 Data Hasil Penentuan Presisi Etil *p*-Metoksi Sinamat dalam Etanol dengan Kadar 1000 μ g/mL

Penotolan	R_f	Area (mAU*s)
1	0,60	28447,68
2	0,58	28070,69
3	0,58	28160,60
4	0,57	27781,19
5	0,57	27717,16
6	0,57	28240,54
7	0,57	28397,46
8	0,57	29312,10

9	0,59	31396,47
10	0,59	28398,27
X (rata-rata)		28592,20
SD		1079,24
KV		3,77 %

Didapatkan standar deviasi sebesar 1079,24 dengan nilai koefisien variasi sebesar 3,77 %, memenuhi syarat validasi yaitu $KV < 5 \%$.

5.5.3.3 Akurasi

Hasil dari proses akurasi yang dilakukan maka didapat persamaan regresi $Y = 9453 + 12.3 x$ dengan nilai r sebesar 0.98423 serta tercantum pada tabel 5.11

Tabel 5.11 Persen (%) perolehan kembali Etil *p*-Metoksi Sinamat dalam Sampel Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

Replikasi	Kadar dalam 2 μ l	% Rekoveri
1	1,126 μ g	111,20 %
2	1,030 μ g	101,52 %
3	1,098 μ g	108,43 %
X (rata-rata)		107,05 %
SD		4,99
KV		4,66 %

Pada proses akurasi didapatkan rata-rata % rekoveri etil *p*-metoksi sinamat sebesar $107,05 \pm 4,99 \%$ dengan nilai koefisien variasi sebesar 4,66 %. Syarat untuk penentuan akurasi sampel

bahan alam sebesar 80 - 120 % (Indrayanto, 2004) sehingga penentuan akurasi etil *p*-metoksi sinamat telah memenuhi persyaratan validasi.

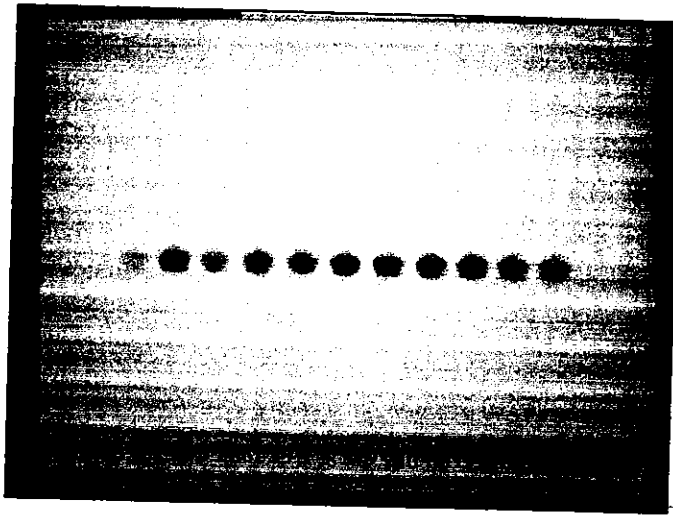
5.5.4 Penetapan Kadar

Hasil dari penetapan kadar yang dilakukan maka didapat persamaan regresi $Y = 9453 + 12.3 x$ dengan nilai r sebesar 0.98423 serta tercantum pada tabel 5.12. Penotolan dilakukan dengan batas bawah eluasi sebesar 1,5 cm, batas atas eluasi 0,5 cm, jarak totolan tepi kiri dan kanan plat 2,0 cm serta jarak antar totolan 1,0 cm.

Tabel 5.12 Hasil Penetapan Kadar Etil *p*-Metoksi Sinamat dalam Sampel Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

Replikasi	Kadar dalam 2 μ l	Kadar EPMS (b/v)
1	1,030 μ g	51,50 %
2	1,028 μ g	51,40 %
3	0,968 μ g	48,40 %
X (rata-rata)		50,43 %
SD		1,76
KV		3,49 %

Didapat rata-rata kadar etil *p*-metoksi sinamat dalam fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) sebesar $50,43 \pm 1,76$ % dengan nilai koefisien variasi sebesar 3,49 %.



Gambar 5.3 Hasil Penetapan Kadar Etil *p*-Metoksi Sinamat dalam Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.) Diamati Dibawah Lampu UV 254 nm

Keterangan gambar 5.3

1. Standar 300 ppm sebanyak 2 μ l
2. Sampel 1 (fraksi minyak kencur sebanyak 2 μ l)
3. Standar 400 ppm sebanyak 2 μ l
4. Sampel 2 (fraksi minyak kencur sebanyak 2 μ l)
5. Standar 500 ppm sebanyak 2 μ l
6. Sampel 3 (fraksi minyak kencur sebanyak 2 μ l)
7. Standar 600 ppm sebanyak 2 μ l
8. Recovery 1 (fraksi minyak kencur sebanyak 2 μ l)
9. Standar 700 ppm sebanyak 2 μ l
10. Recovery 2 (fraksi minyak kencur sebanyak 2 μ l)
11. Recovery 3 (fraksi minyak kencur sebanyak 2 μ l)

Dari gambar 5.3 dapat dilihat perbedaan dari penampakan noda yang dihasilkan dari standar etil *p*-metoksi sinamat dari beberapa macam konsentrasi dengan penampakan noda yang dihasilkan oleh sampel.

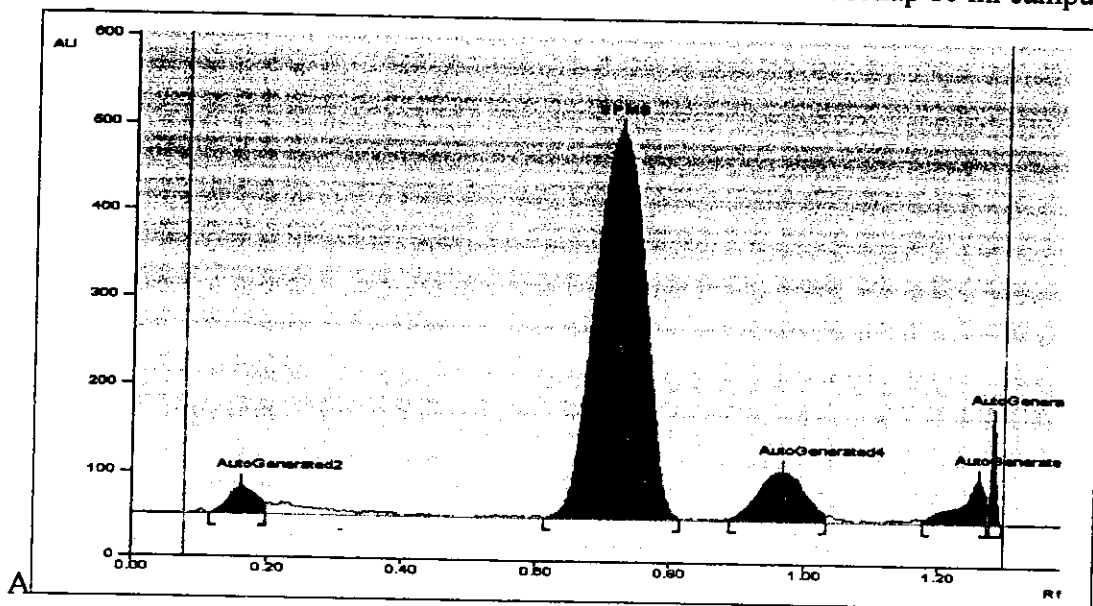
Penetapan kadar ini dilakukan menggunakan larutan baku dengan konsentrasi 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm dan 700 ppm. Eluen yang digunakan dalam proses eluasi

merupakan campuran *n*-hexana dan etil asetat dengan perbandingan 9 : 1 serta penambahan 2 tetes asam formiat setiap 10 ml campuran tersebut.

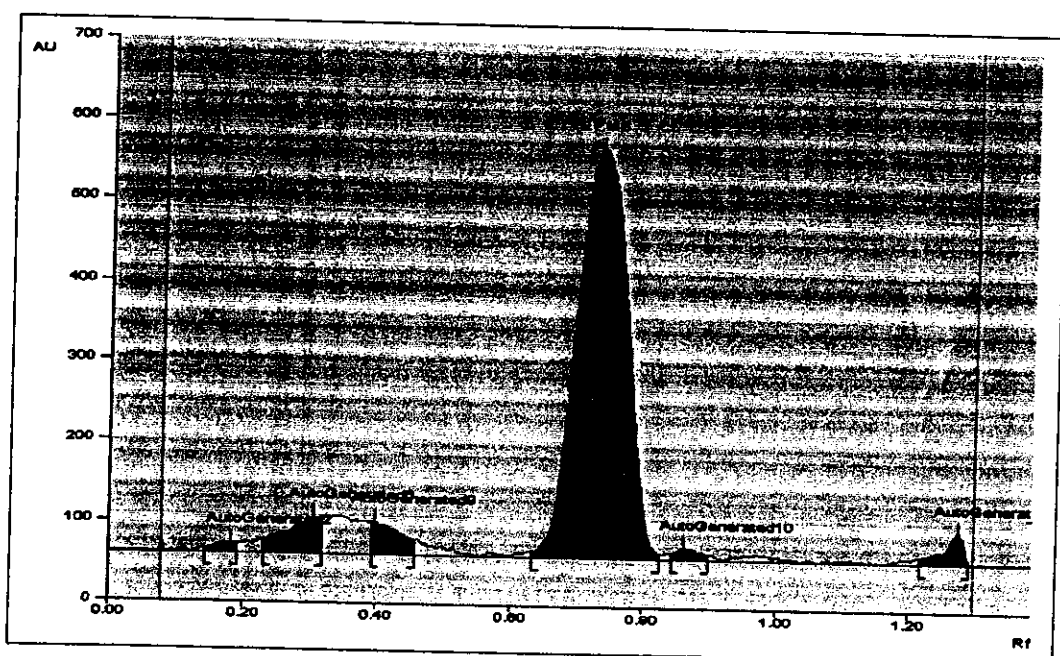
5.5.5 Pola Kromatogram

5.5.5.1 KLT-Densitometer

Kromatogram yang diperoleh dari standar etil *p*-metoksi sinamat, serta fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) menunjukkan *peak-peak* pada beberapa area Rf tertentu. Penetapan profil sidik jari ini dilakukan dengan *n*-hexana serta etil asetat sebagai eluen dengan perbandingan 9:1 dengan penambahan 2 tetes asam formiat setiap 10 ml campuran.



B



Gambar 5.4 Kromatogram Sidik Jari menggunakan KLT densitometri dengan eluen *n*-hexana : etil asetat (9:1) dengan penambahan 2 tetes asam formiat setiap 10 ml a) Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.) b) Standar Etil *p*-Metoksi Sinamat

Berdasarkan gambar 5.4 tersebut dapat dilihat bahwa fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) mempunyai lima *peak* pada area Rf yang berbeda, yang apabila dibandingkan dengan *peak-peak* yang terdapat pada standar etil *p*-metoksi sinamat kedua profil sidik jari tersebut sama-sama mempunyai *peak* dominan pada area Rf 0,72 dan 0,73. Keempat *peak* lain yang terdapat pada fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) menunjukkan adanya senyawa lain yang terdapat dalam fraksi tersebut.

Pada standar etil *p*-metoksi sinamat juga terdapat lebih dari satu *peak*, hal ini juga menunjukkan bahwa dalam standar yang digunakan masih terdapat pengotor.

Untuk keterangan tentang gambar 5.4 tersebut dapat dilihat pada tabel 5.13 serta tabel 5.14.

Tabel 5.13 Keterangan Hasil Penetapan Sidik Jari Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.) menggunakan KLT-densitometri

Peak	Rf	Area (AU)	Assigned Substance
1	0,16	1005,0	AutoGenerated2
2	0,72	24616,0	EPMS
3	0,97	3055,5	AutoGenerated4
4	1,26	1424,1	AutoGenerated5
5	1,28	621,2	AutoGenerated3

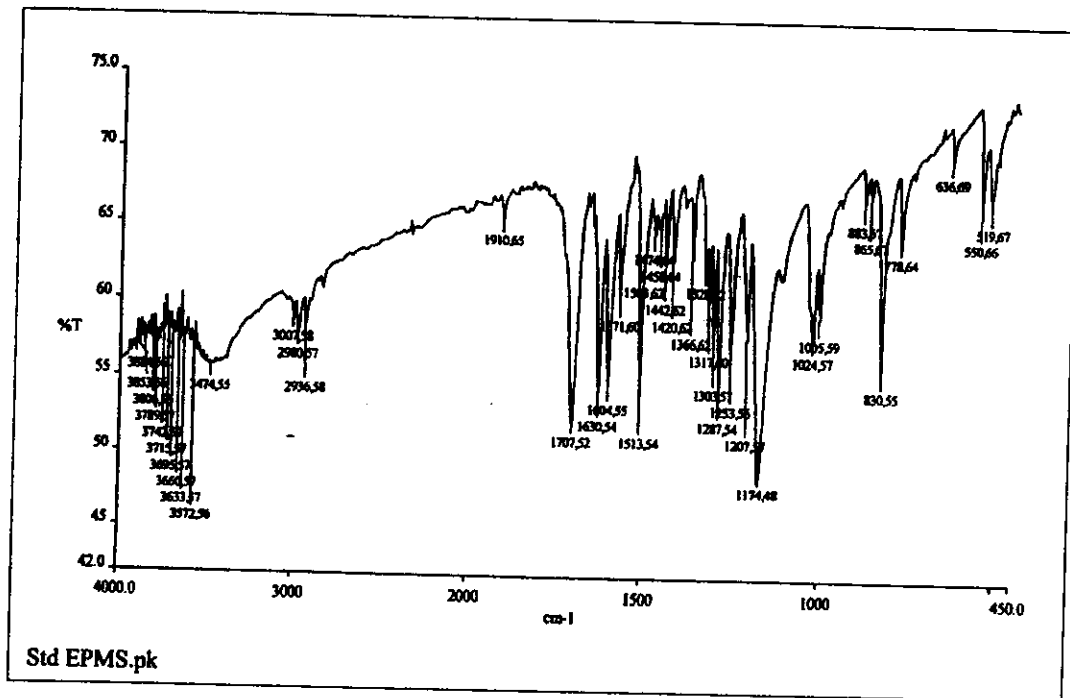
Tabel 5.14 Keterangan Hasil Penetapan Sidik Jari Standar Etil *p*-Metoksi Sinamat menggunakan KLT-densitometri

Peak	Rf	Area (AU)	Assigned Substance
1	0,18	314,3	AutoGenerated2
2	0,30	1845,3	AutoGenerated6
3	0,40	1305,8	AutoGenerated9
4	0,73	29028,2	EPMS
5	0,86	396,2	AutoGenerated10
6	1,27	907,2	AutoGenerated3

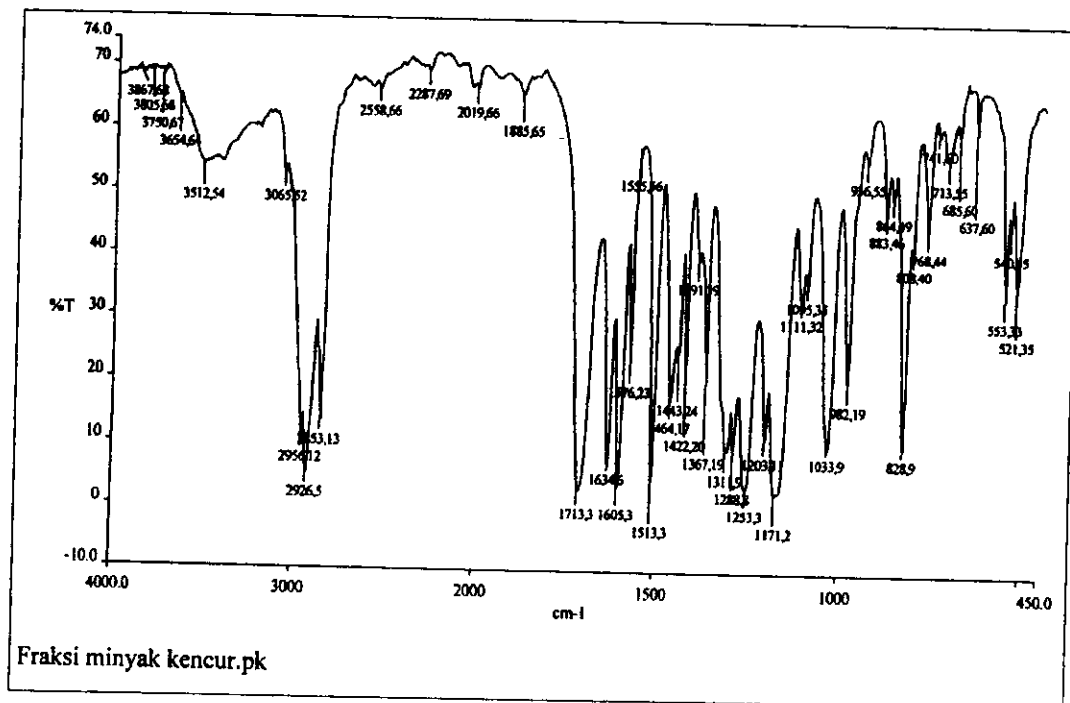
5.5.5.2 Spektrofotometer Infra Merah

Penentuan pola sidik jari standar etil *p*-metoksi sinamat serta fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) menggunakan Spektrofotometer Infra Merah ditunjukkan pada gambar 5.5. Berdasarkan spektra infra merah tersebut dapat diketahui gugus-gugus fungsi yang terdapat pada fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.), yang kemudian dibandingkan dengan spektra standar etil *p*-metoksi sinamat

A



B



Gambar 5.5 Hasil Penetapan Sidik Jari menggunakan Spektrofotometer Infra Merah
 a) Standar Etil *p*-Metoksi Sinamat b) Fraksi Minyak Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

4.6.1. Hasil Uji Aktivitas Antikanker Campuran Fraksi Diterpen Lakton – Fraksi EPMS

Hasil uji aktivitas antikanker dari campuran fraksi diterpen lakton dan fraksi EPMS terhadap sel kanker Widr seperti dalam tabel dibawah ini :

Tabel 4.1. Aktivitas aktivitas antikanker dari campuran fraksi diterpen lakton dan fraksi EPMS terhadap sel kanker Widr dengan inkubasi 24 jam

Konsentrasi $\mu\text{g/ml}$	Komposisi Campuran Fraksi Diterpen lakton- Fraksi EPMS		
	1:1	1:2	2:1
1000	66.18	59.43	76.62
500	64.13	63.52	73.65
250	73.44	86.09	85.59
125	88.77	88.16	83.64
62.5	93.44	91.3	90.18
31.25	96.27	90.47	94.35
15.625	99.98	90.71	95.79

Tabel 4.2. Aktivitas aktivitas antikanker dari campuran fraksi diterpen lakton dan fraksi EPMS terhadap sel kanker Widr dengan inkubasi 48 jam

Konsentrasi $\mu\text{g/ml}$	Komposisi Campuran Fraksi Diterpen lakton- Fraksi EPMS		
	1:1	1:2	2:1
1000	1.75	1.35	1.12
500	1.22	0.53	1.48
250	11.15	26.29	17.18
125	53.17	62.3	43.11
62.5	66.53	71.51	63.56
31.25	54.32	90.21	72.33
15.625	87.37	93.11	8.33

BAB V. KESIMPULAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Sampel simplisia herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan rimpang kencur (*Kaempferia pandurata* Roxb) berdasarkan penentuan parameter spesifik dan non spesifik maka kedua sampel simplisia memenuhi syarat Materia Medika Indonesia.
2. Fraksinasi diterpen lakton dan fraksi EPMS telah ditemukan metode terpilih , dengan kadar andrografolid 89% dari fraksi diterpen lakton dan kadar EPMS 24% dari fraksi EPMS .
3. Campuran 1:1 antara fraksi diterpen lakton dan fraksi EPMS memiliki aktivitas antikanker secara in vitro terhadap Widr yang diinkubasi 48 jam.

5.2. Saran-saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap campuran fraksi diterpen lakton dan fraksi EPMS terhadap studi formulasi dan uji bioavailabilitas.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap campuran fraksi diterpen lakton dan fraksi EPMS terhadap uji toksisitas akut dan subakut.

BAB VI**DAFTAR PUSTAKA**

- Backer, C. A., R. C. B. Van der Brink Jr., 1963. **Flora of Java vol. II**, The Auspices of The Rujksher Barius, Leyden
- Badan POM RI, 2005. **Kriteria dan Tata Laksana Pendaftaran Obat Tradisional, Obat Herbal Terstandar dan Fitofarmaka**, BPOM RI, Jakarta
- Chang, 1965, **Pharmacological and Application of Chinese Materia Medica, World Scientific Vol. 2**, Hongkong
- Departemen Kesehatan RI, 1979. **Materia Medika Indonesia, jilid III**, Jakarta
- Departemen Kesehatan RI, 1985. **Cara Pembuatan Simplisia**. Jakarta
- Departemen Kesehatan RI, 1995. **Farmakope Indonesia, edisi IV**, Jakarta
- Departemen Kesehatan RI, 2000. **Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat**, cetakan pertama. Jakarta
- Ekasari, Wiwied. 1998. **Penetapan Kadar Andrografolid Dalam Simplisia Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan Produk Obat Tradisionalnya Untuk Data Standarisasi**. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Gupta S et al. 1990. Antidiarrhoeal activity of diterpenes of *Andrographis paniculata* (kalmegh) against *Escherichia coli* enterotoxin in in vivo models. **International Journal of Crude Drug Research**.
- Handayani, Lestari, dan Suharmiati. 2002. Meracik Obat Tradisional secara Rasional. Pusat Penelitian & Pengembangan Pelayanan & Teknologi Kesehatan. dari www.tempo.co.id diakses November 2006
- Heyne K, 1987. **Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid III**, Diterjemhkan oleh Badan Litbang Kehutanan, Jakarta
- Indrayanto, G., 1994. Metode Validasi pada Analisis Kimia. Prosiding Pendidikan Berkelanjutan Apoteker. PBA 8. FFUA. ISFI. Surabaya
- Kusumawardhani, Dwi. 2005. Uji Antimalaria In Vivo Ekstrak Sambiloto Terstandar (Parameter Kadar Andrografolida) pada Mencit. **Skripsi**. Fakultas Farmasi UNAIR. Surabaya

- Madav S *et al*, 1995. Analgesic and antiulcerogenic effects of andrographolide. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*
- Markham, K. R., 1988. **Pemanfaatan Tanaman Obat. Edisi Ketiga.** Departemen Kesehatan RI, Jakarta
- Matsuda, T., 1994. Cell Differentiation-Inducing Diterpen from *Andrographis Paniculata* Nees., *Chem. Phar. Bull*, 42 (6)
- Midian, Sirait, dkk, 1987. **Analisis Obat Tradisional**, Departemen Kesehatan RI, Jakarta
- Mulya, M., dan Suharman, 1995. **Analisis Instrumental**, Airlangga University Press, Surabaya
- Panitia Pelaksanaan Rapat Kerja Penyusunan Parameter Standar Umum Ekstrak Tanaman Obat**, 1999. Fakultas Farmasi UNAIR, Surabaya
- Puri, A. *et al*, 1993. Immunostimulant Agents From *Andrographis paniculata*. *Journal of Natural Product* 56(7)
- Rajagopal S., et al., 2003. **Andrographolide, A Potential Cancer Therapeutic Agent Isolated from *Andrographis paniculata*.** dalam www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/utills. diakses bulan November 2006
- Sambiloto Untuk Disentri dan Radang Lambung. **Artikel.** dalam www.republika.co.id, 2003 diakses bulan November 2006
- Sharma A., Lal K. and Handa SS., 1992. Standardization of The Indian Crude Drug Kalmegh by High-Pressure Liquid Chromatographic Determination of Andrographolide. **Phytochemical Analysis** 3
- Shen, Y. C, C. F. and Chiou, W. F., 2002. Andrographolide prevents Oxygen Radical Production by Human Neutrophils Possible Mechanism Involved in its Anti-inflammatory Effect. **British Journal Pharmacology.** 135(2)
- Sherma, Joseph et al., 2003. **Handbook of Thin Layer Chromatography**, 3rd ed, Revised and Expanded, Marcell Dekker INC, USA
- Skoog, Douglas. A. 1985. **Principles Of Instrumental Analysis.** CBS College Pulishing, Japan
- Stahl, E., 1969. **Thin Layer Chromatography.** Spring-Verlag, Berlin
- Standard of ASEAN Herbal Medicine, Volume I**, 1993. ASEAN Country
- Sukardiman, 1997. **Studi Pemiakan Kultur Sel Kanker untuk Uji Sitotoksisitas Isolat Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.),** Laporan Penelitian Dosen Muda. Fakultas Farmasi UNAIR, Surabaya

- Sukardiman, 2002. **Uji Antikanker Beberapa Tanaman Obat Indonesia Terhadap Kultur Sel Kanker Mieloma**. Laporan Penelitian Project Grand. Fakultas Farmasi UNAIR, Surabaya
- Sutarjadi, Noor Choolis, 1992. **Penelitian Obat Tradisional dan Bahan Nabati dari Universitas Airlangga**, Prosiding Simposium Pengembangan dan Penelitian Obat Tradisional dan Fitofarmaka, Surabaya
- Suyanto, 1995. **Uji Aktivitas Anti Malaria Secara In Vitro Isolat Herba *Andrographis paniculata***. Skripsi. Fakultas Farmasi UNAIR. Surabaya
- Tjitrosoepomo, G., 1988. **Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)**, Gajah Mada University Press, Yogyakarta
- Touchstone Joseph C. Dobbins Murrel F., 1983. **Practice of Thin Layer Chromatography**, United States, John and Willey Sons Inc.
- Walpole, Ronald E., 1995. **Pengantar Statistika Edisi ke-3**, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- WHO, 1998. **Quality Control Methods for Medicinal Plants Materials**. Geneva
- WHO, 1999. **WHO Monograph on Selected Medicinal Plants Vol. 2nd**. Geneva
- WHO, 2005. **Quality Control Methods For Medicinal Plant Materials Revised Draft UpDate**. Geneva
- www.altcancer.silvermedicine.com diakses bulan November 2006
- Yusron, M, dkk. 2005. **Sirkuler No. 11**, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Balai Penelitian Tanaman dan Aromatika, Bogor