

BAB IV

PROSEDUR KERJA

IV.1 Pemeriksaan Mikroskopik Simplisia

Simplisia yang digunakan pada penelitian ini dipastikan identitasnya dengan cara melakukan pemeriksaan mikroskopik masing-masing simplisia menggunakan mikroskop. Fragmen-fragmen penanda masing-masing simplisia dibandingkan dengan fragmen penanda yang diperoleh dari Farmakope Herbal Indonesia tahun 2008 dan 2010. Reagen yang digunakan untuk melihat fragmen-fragmen penanda adalah kloral hidrat. Kloral hidrat berfungsi untuk melihat kalsium oksalat, serta fragmen lain pada beberapa simplisia jamu simulasi kencing manis. Dengan meneteskan 2-3 reagen pada kaca objek dan tambahkan sampel simplisia lalu ditutup dengan kaca penutup, selanjutnya diamati menggunakan mikroskop.

IV.2 Pembuatan Jamu Simulasi Kencing Manis

Timbang masing-masing simplisia sebanyak 85 gram *Zingiberis officinalis rhizoma*; 85 gram *Curcumae domesticae rhizoma*; 165 gram *Piperis betle folium*; 165 gram *Andrographidis paniculatae herba*, dan tambahkan bahan kimia obat (glibenklamid) sebanyak 500 mg dicampur dan digerus di dalam mortar sehingga diperoleh campuran jamu simulasi yang homogen.

IV.3 Identifikasi Sampel Jamu Kencing Manis

IV.3.1 Uji Organoleptis Sampel Jamu Kencing Manis

Sampel jamu yang digunakan berupa serbuk, tablet, pil dan yang berada di dalam kapsul dibuka lalu dikeluarkan bagian isinya, lalu diamati secara organoleptis meliputi bentuk dan warna.

IV.3.2 Uji Kualitatif Sampel Jamu Kencing Manis dengan KLT

1. Preparasi Sampel Uji

Sampel jamu kencing manis yang didapat masing-masing di timbang sebanyak 500 mg. Jamu yang sudah di timbang lalu diekstraksi dengan pelarut butil asetat-kloroform-asam formiat (60:40:0,4); etil asetat-toluen-metanol (45:55:1); butil asetat-toluen-asam format (50:50:0,4) sebanyak 10 mL dan dikocok dengan menggunakan *shaker 3D* selama 30 menit dan sampel jamu kencing manis siap ditotolkan pada plat KLT.

2. Persiapan Larutan Stok Pembanding

Baku pembanding yang digunakan sebagai larutan stok pembanding adalah glibenklamid. Glibenklamid ditimbang sebanyak 10 mg, masukan ke dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan masing-masing pada labu yang berbeda butil asetat-kloroform-asam formiat (60:40:0,4); etil asetat-toluen-metanol (45:55:1); dan butil asetat-toluen-asam format (50:50:0,4) hingga tanda batas. Kocok larutan tersebut hingga homogen. Larutan stok pembanding siap ditotolkan pada plat KLT.

3. **Persiapan Plat KLT**

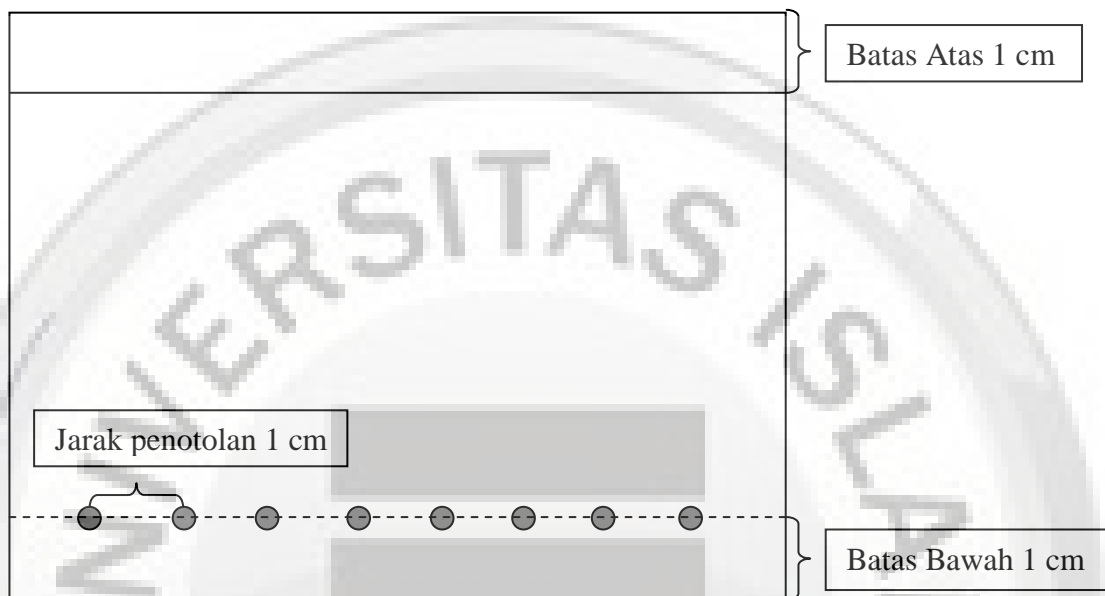
Plat KLT dicuci dengan metanol pro analisis, selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 120°C selama 15 menit. Setelah plat KLT diaktifkan maka plat tersebut siap untuk digunakan.

4. **Persiapan Elusi Plat KLT**

Plat KLT berukuran 10 x 15 cm ditandai batas atas dan batas bawah masing-masing 1 cm dan jarak antara penotolan 1 cm menggunakan penggaris. Fase gerak yang digunakan terdiri dari tiga kombinasi pelarut yang berbeda yaitu butil asetat-kloroform-asam formiat (60:40:0,4), etil asetat-toluen-metanol (45:55:1) dan butil asetat-toluen-asam formiat (50:50:0,4) disiapkan dan dimasukkan ke dalam masing-masing chamber KLT. Chamber KLT dijenuhkan menggunakan tiga kombinasi pelarut butil asetat-kloroform-asam formiat (60:40:0,4), etil asetat-toluen-metanol (45:55:1) dan butil asetat-toluen-asam formiat (50:50:0,4) pro analisis dengan cara menempatkan kertas saring di dalam chamber hingga jenuh.

Larutan stok baku pembanding, larutan jamu simulasi kencing manis dan larutan sampel jamu kencing manis ditotolkan pada pelat KLT menggunakan pipa kapiler seukuran 5 μ L, kemudian pelat KLT dimasukan ke dalam chamber dan elusi hingga eluen mencapai batas atas pelat. Selanjutnya, pelat KLT dikeringkan dan diamati secara visual dibawah sinar UV 254 nm, kemudiam dilanjutkan dengan menggunakan penampak bercak H₂SO₄ pekat 10% dalam metanol. Spot yang terbentuk siap untuk diamati. Setelah diamati dibandingkan faktor retensi (Rf) pada pelat KLT antara bercak baku pembanding, bercak jamu simulasi

kencing manis dan bercak sampel jamu kencing manis. Pada pengujian analisis ini dilakukan triplo untuk meminimalisir kesalahan.



Gambar IV.1. Penotolan pada plat KLT


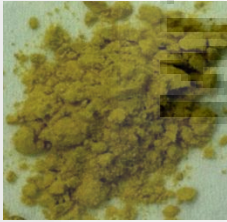



BAB IV







HASIL DAN PENGAMATAN


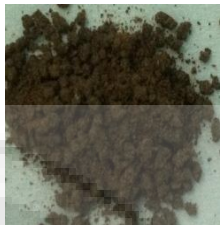


IV.1. Uji Organoleptis Sampel Jamu Kencing Manis

Sampel jamu kencing manis yang ada di perdagangan berupa tablet, kapsul, pil serta serbuk. Hasil pengamatan uji organoleptis sampel jamu kencing dapat dilihat pada **Tabel IV.1.**

Tabel IV.1. Uji Organoleptis Sampel Jamu Kencing Manis

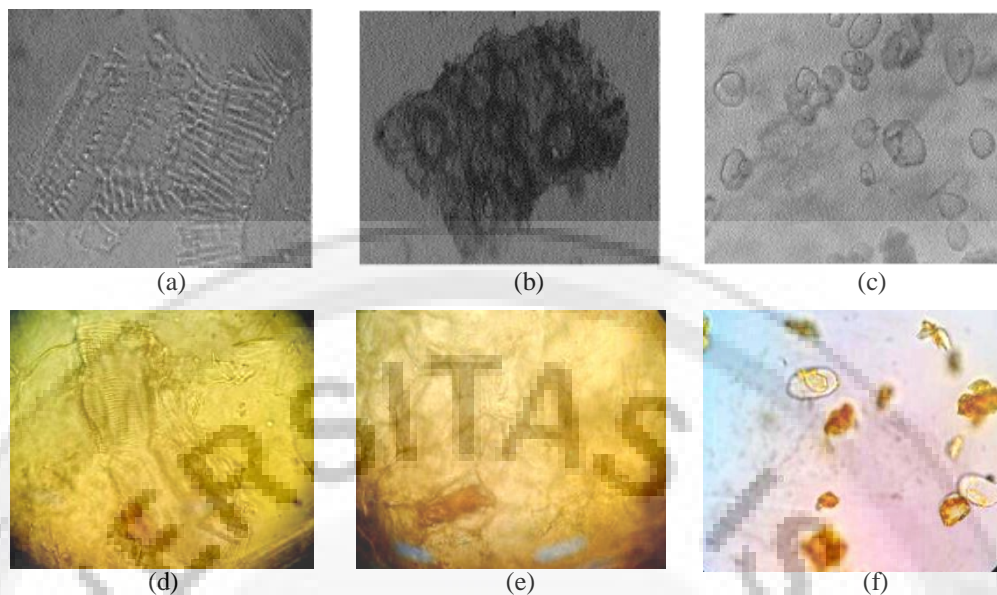
Sampel	Bentuk	Warna
A	Kapsul 	Kuning 
B	Serbuk 	Krem
C	Kapsul 	Jingga 

Sampel	Bentuk	Warna
D	Kapsul 	Coklat Muda 
E	Pil 	Coklat
F	Pil 	Coklat tua
G	Pil 	Hitam
H	Tablet 	Putih

Sampel	Bentuk	Warna
I	Kapsul 	Coklat tua 
J	Kapsul 	Abu-abu 

IV.2. Pemeriksaan Mikroskopik Siplisia

Informasi dari beberapa pemeriksaan komposisi yang terdapat pada kemasan merk jamu kencing manis, maka dalam penelitian ini menggunakan jamu simulasi yang terdiri dari simplisia *Zingiberis officinalis rhizoma*, *Curcumae domesticae rhizoma*, *Piperis betle folium*, dan *Andrographidis paniculatae herba*. Hasil dari pemeriksaan mikroskopik simplisia menunjukkan fragmen-fragmen penanda pada masing-masing simplisia seperti yang terdapat pada **Gambar IV.1**.



Gambar IV.1. Pemeriksaan mikroskopik simplisia *Zingiberis officinalis rhizoma*

Keterangan :

(a), (b), dan (c) sumber FHI 2008

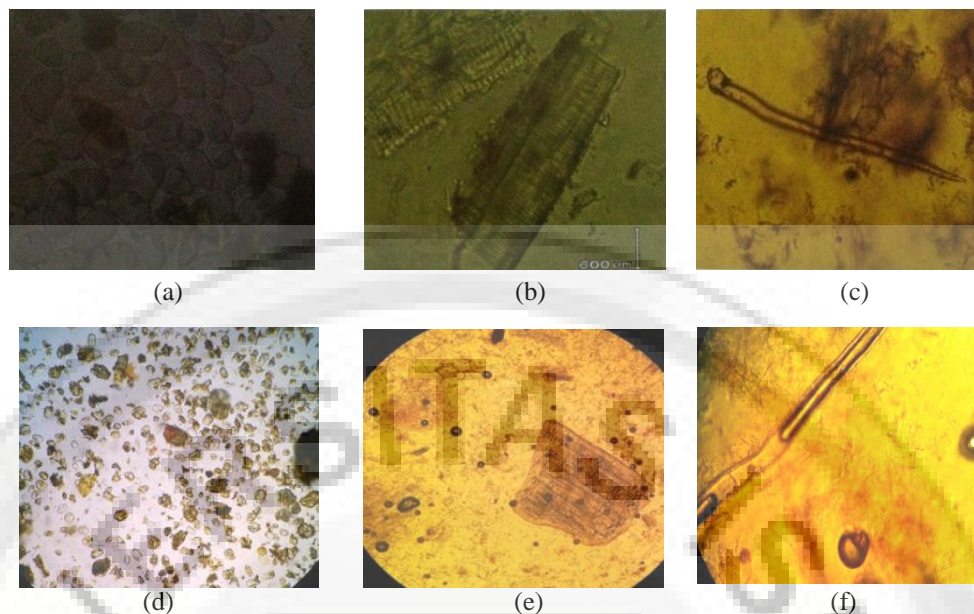
(d), (e), dan (f) hasil uji mikroskopik dengan

(a) dan (d) pembuluh kayu perbesaran 400x dengan menggunakan kloral hidrat

(b) dan (e) jaringan gabus tangensial perbesaran 400x dengan menggunakan kloral hidrat

(c) dan (f) amilum perbesaran 400x dengan menggunakan kloral hidrat

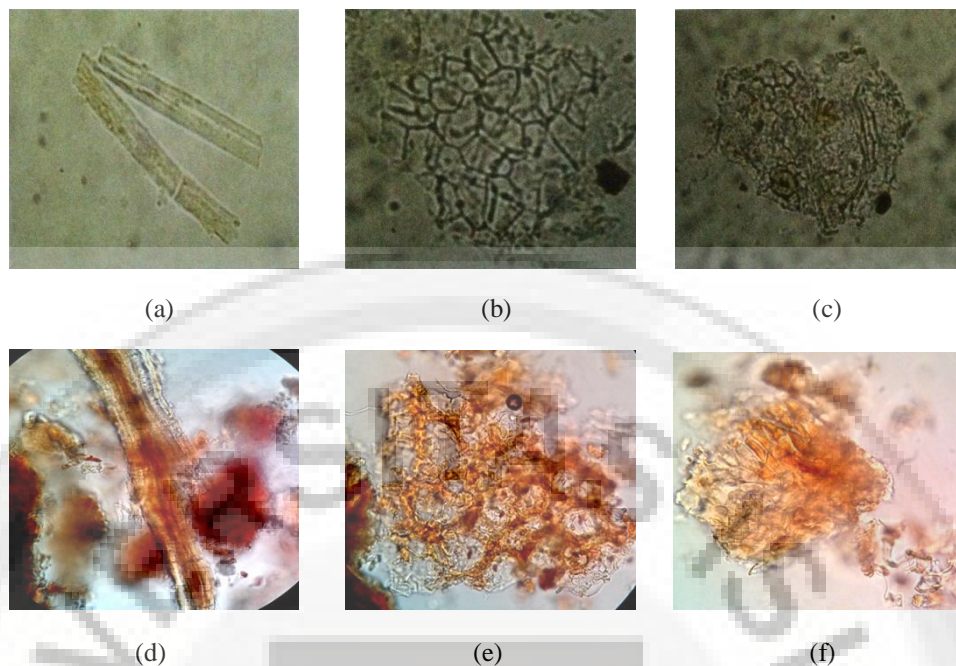
Pada gambar IV.1. (d) menunjukkan penanda untuk *Zingiberis officinalis rhizoma* yaitu adanya pembuluh kayu dengan menggunakan reagen kloral hidrat dan perbesaran 400x. Gambar IV.1. (e) menunjukkan adanya jaringan gabus tangensial dengan menggunakan reagen kloral hidrat dan perbesaran 400x. Gambar IV.1. (f) menunjukkan adanya amilum dengan menggunakan reagen kloral hidrat dan perbesaran 400x. Hasil dari pemeriksaan mikroskopik simplisia dibandingkan dengan fragmen-fragmen penanda yang diperoleh dari Farmakope Herbal Indonesia (FHI) Edisi I 2008.



Gambar IV.2. Pemeriksaan mikroskopik simplisia *Curcuma domesticae rhizome*
Keterangan :

- (a), (b), dan (c) sumber FHI 2008
- (d), (e) dan (f) hasil uji mikroskopik dengan
- (a) dan (d) butir amilum perbesaran 400x dengan menggunakan kloral hidrat
- (b) dan (e) berkas pengangkut perbesaran 200x dengan menggunakan kloral hidrat
- (c) dan (f) trikoma perbesaran 400x dengan menggunakan kloral hidrat

Pada gambar IV.2. (d) menunjukkan penanda untuk *Curcuma domesticae rhizoma* yaitu adanya butir amilum dengan menggunakan reagen kloral hidrat dan perbesaran 400x. Gambar IV.2. (e) menunjukkan adanya berkas pengangkut dengan menggunakan reagen kloral hidrat dan perbesaran 100x. Gambar IV.2. (f) menunjukkan adanya trikoma dengan menggunakan reagen kloral hidrat dan perbesaran 400x. Hasil dari pemeriksaan mikroskopik simplisia dibandingkan dengan fragmen-fragmen petanda yang diperoleh dari FHI Edisi I 2008.



Gambar IV.3. Pemeriksaan mikroskopik simplisia *Piperis betle*

Keterangan :

(a), (b), dan (c) sumber FHI 2010

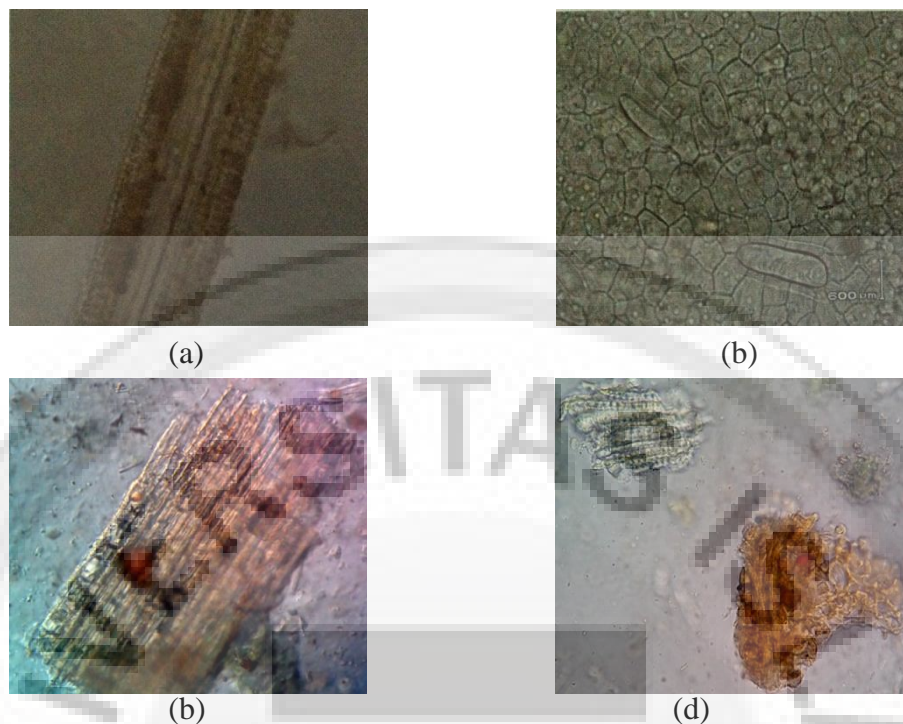
(d), (e), dan (f) hasil uji mikroskopik dengan

(a) dan (d) berkas pengangkut dengan penebalan berbentuk tangga perbesaran 400x dengan menggunakan kloral hidrat

(b) dan (e) epidermis atas perbesaran 400x dengan menggunakan kloral hidrat

(c) dan (f) epidermis bawah dengan sel minyak perbesaran 100x dengan menggunakan kloral hidrat.

Pada gambar IV.3. (d) menunjukkan penanda untuk *Piperis betle folium* yaitu adanya berkas pengangkut dengan penebalan berbentuk tangga dengan menggunakan reagen kloral hidrat dan perbesaran 400x. Gambar IV.3. (e) menunjukkan adanya epidermis atas dengan menggunakan reagen kloral hidrat dan perbesaran 400x. Gambar IV.3. (f) menunjukkan adanya epidermis bawah dengan sel minyak dengan menggunakan reagen kloral hidrat dan perbesaran 100x. Hasil dari pemeriksaan mikroskopik simplisia dibandingkan dengan fragmen-fragmen penanda yang diperoleh dari FHI 2010.



Gambar IV.4. Pemeriksaan mikroskopik simplisia *Andrographidis paniculata herba*

Keterangan :

(a) dan (c) sumber FHI 2008

(b) dan (d) hasil uji mikroskopik dengan

(a) dan (c) berkas pengangkut perbesaran 400x dengan menggunakan kloral hidrat

(b) dan (d) epidermis atas perbesaran 100x dengan menggunakan kloral hidrat.

Pada gambar IV.4. (c) menunjukkan penanda untuk *Andrographidis paniculata herba* yaitu adanya berkas pengangkut dengan menggunakan reagen kloral hidrat dan perbesaran 400x. Gambar IV.4. (d) menunjukkan adanya epidermis atas dengan menggunakan reagen kloral hidrat dan perbesaran 100x. Hasil dari pemeriksaan mikroskopik simplisia dibandingkan dengan fragmen-fragmen petanda yang diperoleh dari FHI 2008.

IV.2 Hasil Analisis Kualitatif Sampel Jamu Kencing Manis

Analisis bahan kimia obat (BKO) di dalam sediaan jamu dapat menggunakan salah satunya teknik Kromatografi Lapis Tipis (KLT). KLT merupakan salah satu metode untuk mencapai hasil kualitatif. Pada pelat KLT ini adanya fase diam yang dipilih dengan silika gel GF₂₅₄ dimana pada saat disinari di bawah lampu UV λ 254 nm akan menunjukkan permukaan pelat yang berwarna hijau, karena di dalam fase diam tersebut adanya indikator fluoresensi. Senyawa kimia yang dapat menyebabkan pelat berfluoresensi ditambahkan penyerap yang menghasilkan fluoresensi kuat di daerah UV pada panjang gelombang pendek (254 nm), misalnya seng kadmium sulfat (Stahl, 1985). Pada semua senyawa yang memiliki gugus kromofor atau ikatan rangkap terkonjugasi, akan menampakkan bercak yang berwarna gelap dengan latar belakang (silika gel GF₂₅₄) berwarna hijau pada saat disinari di bawah lampu UV 254 nm (Gritter, 1991). Senyawa dapat dideteksi pada lapisan berfluoresensi dengan cara memadamkan fluoresensi, maka senyawa tampak sebagai bercak gelap pada latar belakang yang berfluoresensi kuning-hijau (Stahl, 1985).

Fase gerak atau campuran pelarut pengembang yang digunakan merupakan variasi kepolaran dan kekuatan pelarut. Fase gerak yang digunakan yaitu terdiri dari beberapa pelarut yang sesuai untuk menarik BKO glibenklamid pada sampel yang dianalisis. Fase gerak yang digunakan terdiri dari 3 kombinasi pelarut yaitu butil asetat (non polar)-kloroform (semipolar)-asam formiat (polar) (60:40:0,4); etil asetat (semipolar)-toluen (non polar)-metanol (polar) (45:55:1);

butil asetat (non polar)-toluen (non polar) -asam format (polar) (50:50:0,4) (BPOM, 2012).

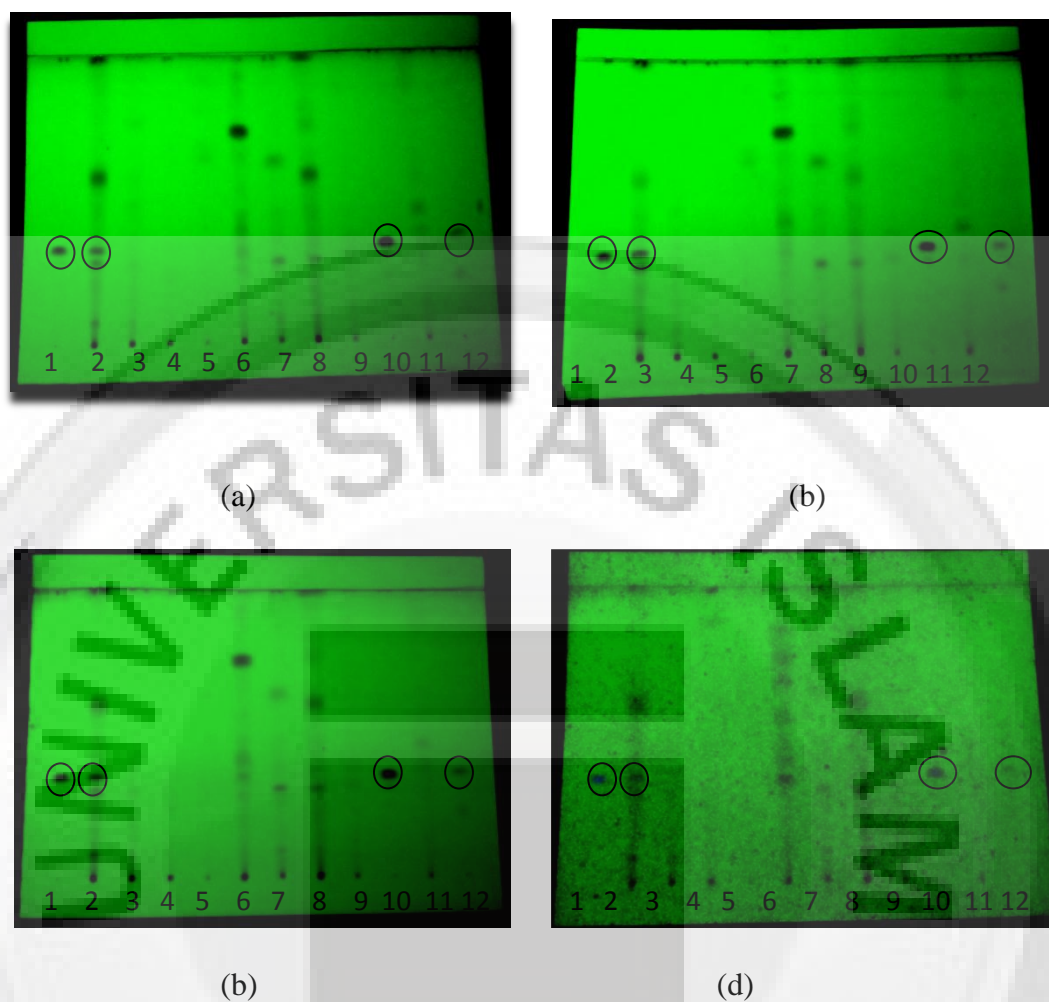
KLT yang digunakan untuk menganalisis BKO pada sampel yang telah diambil dari pasaran, sebelumnya akan dilakukan pencucian aktivasi pelat menggunakan metanol pro analisis dan diaktivasi pada suhu 120°C. Tujuan dari pencucian ini karena dikhawatirkan pada pelat yang digunakan terdapat cemaran yang dapat menimbulkan masalah atau mungkin juga tidak (Gritter,1991). Jarak antara penotolan dan penotolan baku pembanding, jamu simulasi dan sampel sebaiknya memiliki ukuran bercak yang sekecil mungkin dan sesempit mungkin, karena jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi. Penotolan dilakukan dengan jarak 1 cm antara sampel maupun baku pembanding, dengan susunan penotolan dari kiri ke kanan adalah baku pembanding glibenklamid, jamu simulasi dan sampel.

Sebelum dilakukannya elusi, *chamber* yang akan digunakan terlebih dahulu dijenuhkan menggunakan eluen. Eluen yang digunakannya yaitu butil asetat-kloroform-asam formiat (60:40:0,4), etil asetat-toluen-metanol (45:55:1) dan butil asetat-toluen-asam formiat (50:50:0,4). Tujuan dari penjenuhan *chamber* yang dilakukan adalah untuk mengoptimalkan proses pengembangan fase gerak, memperkecil penguapan pelarut dan menghasilkan bercak lebih bundar dan lebih baik (Gritter, 1991). Penjenuhan *chamber* yang dilakukan dengan menambahkan eluen ke dalam *chamber* dan meletakkan kertas saring di dalam *chamber* yang harus terbasahi oleh semua eluen (Gritter,1991). Pada saat dilakukannya

penjenuhan sebaiknya *chamber* disimpan di tempat yang aman dan tidak mudah tergeser-geser sehingga dapat mencegah terjadinya ketidak jenuhan pelarut.

Pada penelitian kali ini dibuatnya jamu simulasi yang sengaja ditambahkan BKO glibenklamid yang bertujuan untuk melihat bercak yang sejajar dengan BKO yang terdapat di dalam jamu simulasi dan sampel yang mengandung BKO. Simplisia yang digunakan untuk pembuatan jamu simulasi adalah simplisia yang biasa digunakan dari beberapa merk jamu diabetes yang beredar. Perbandingan BKO yang terdapat di dalam sampel tidak hanya dibandingkan dengan jamu simulasi, tetapi dibandingkan dengan baku pembanding yang sengaja dibuat larutan stok pembanding.

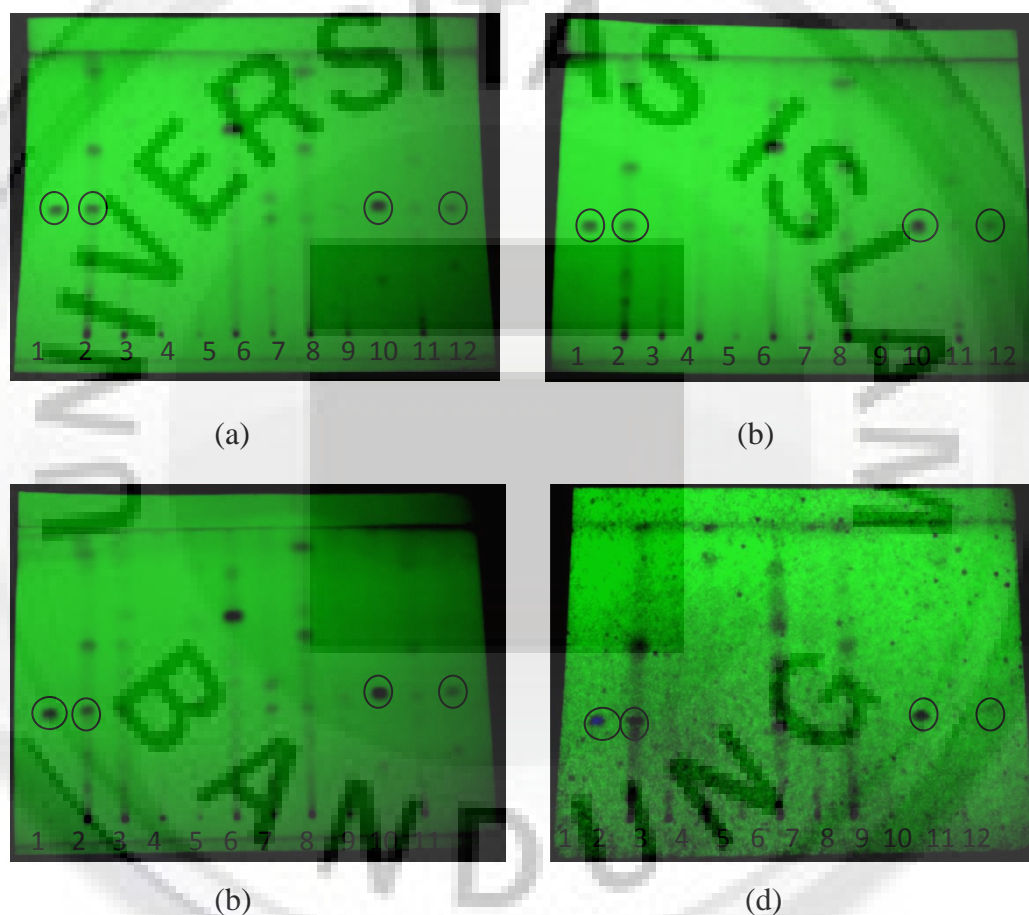
Hasil analisis diantara sampel jamu A sampai sampel jamu J, jamu yang mengandung Bahan Kimia Obat (BKO) glibenklamid adalah pada sampel jamu H dan J yang memiliki nilai R_f sebesar 0,5 pada kombinasi pelarut yang pertama. Untuk memastikan persamaan bercak yang sejajar dengan baku pembanding pada sampel H dan J bahwa posotif mengandung BKO glibenklamid, dilakukannya penyemprotan penampak bercak H_2SO_4 pekat 10% dalam metanol. Setelah penyemprotan selesai maka plat tersebut dipanaskan dalam oven pada suhu $100^\circ C$ selama 5 menit (Gritter, 1991). Lalu pelat KLT disinari kembali di bawah lampu UV 254 nm, dengan hasil bercak yang bewarna ungu.



Gambar IV.5. Kromatogram lapis tipis kombinasi pelarut pertama

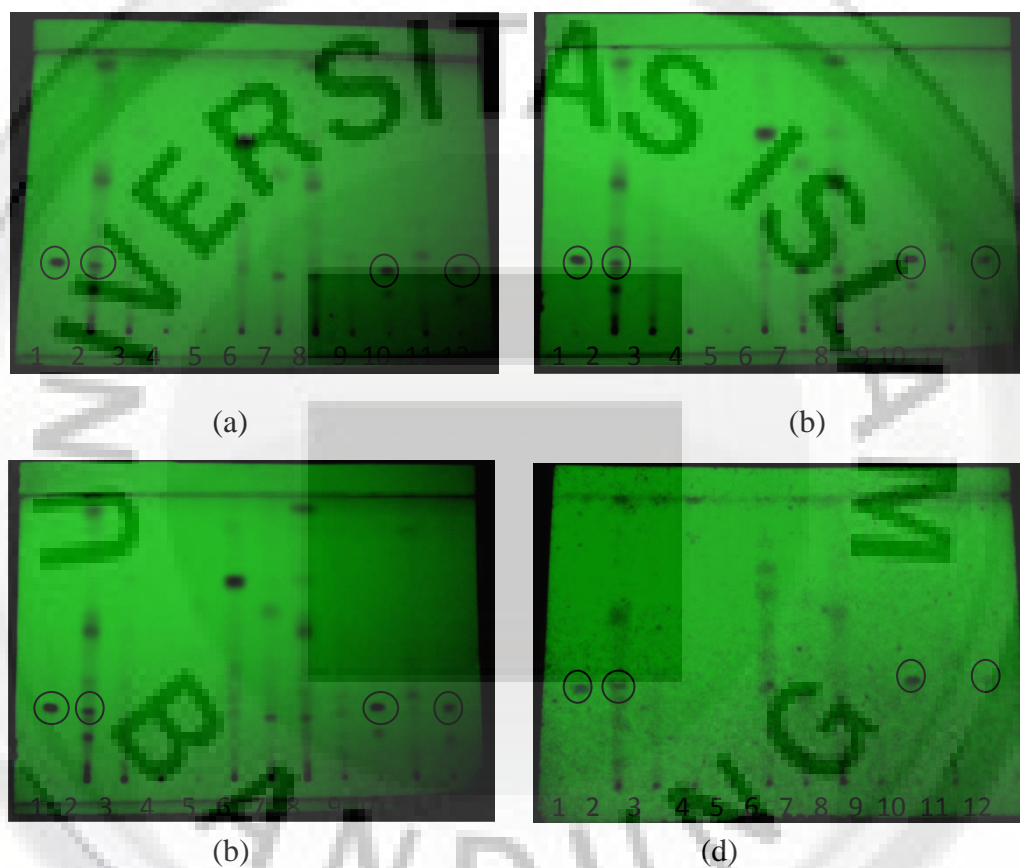
Keterangan : fase diam silika gel GF₂₅₄, fase gerak (a), (b), (c) dan (d) butil asetat-kloroform-asam formiat (60:40:0,4), (1) glibenklamid, (2) jamu simulasi, (3) - (12) sampel A – J, (d) Kromatografi lapis tipis dengan penampak bercak H₂SO₄ pekat 10% dalam metanol.

Pada kombinasi pelarut yang kedua memiliki bercak yang sama dengan baku pembanding glibenklamid pada sampel jamu H dan J dengan nilai R_f adalah 0,6 pada baku pembanding, jamu simulasi dan sampel jamu yang mengandung BKO glibenklamid pada sampel jamu H dan J seperti yang terlihat pada gambar IV.6.



Gambar IV.6. Kromatogram lapis tipis kombinasi pelarut kedua
Keterangan : fase diam silika gel GF₂₅₄, fase gerak (a), (b), (c) dan (d) etil asetat-toluen-metanol (45:55:1), (1) glibenklamid, (2) jamu simulasi, (3) – (12) sampel A–J, (d) Kromatografi lapis tipis dengan penampak bercak H₂SO₄ pekat 10% dalam metanol.

Pada kombinasi pelarut yang ketiga memiliki bercak yang sama dengan baku pembanding glibenklamid pada sampel H dan J dengan nilai R_f adalah 0,2 pada baku pembanding, jamu simulasi dan sampel jamu yang mengandung BKO glibenklamid pada sampel jamu H dan J seperti yang terlihat pada gambar IV.7.



Gambar IV.7. Kromatogram lapis tipis kombinasi pelarut ketiga
Keterangan : fase diam silika gel GF₂₅₄, fase gerak (a), (b), (c) dan (d) etil asetat-toluen-metanol (45:55:1), (1) glibenklamid, (2) jamu simulasi, (3) – (12) sampel A–J, (d) Kromatografi lapis tipis dengan penampak bercak H₂SO₄ pekat 10% dalam metanol.