

**ANALISIS KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PADA TANAMAN  
ANTING – ANTING (*Acalypha indica* L.) BERDASARKAN  
PERBEDAAN VARIASI PELARUT DAN PENGENALAN POLA  
SECARA KEMOMETRIK**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
SOY VIRANDA KUSUMA  
NIM. 17630069**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2023**

**ANALISIS KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PADA TANAMAN  
ANTING – ANTING (*Acalypha indica* L.) BERDASARKAN  
PERBEDAAN VARIASI PELARUT DAN PENGENALAN POLA  
SECARA KEMOMETRIK**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
SOY VIRANDA KUSUMA  
NIM. 17630069**

**Diajukan Kepada :  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Proposal Penelitian**

**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2023**

ANALISIS KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PADA TANAMAN ANTING-  
ANTING (*Acalypha indica* L) BERDASARKAN PERBEDAAN VARIASI  
PELARUT DAN PENGENALAN POLA SECARA KEMOMETRIK

SKRIPSI

Oleh:  
SOY VIRANDA KUSUMA  
NIM. 17630069

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal : 22 Desember 2023

Pembimbing I

Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002

Pembimbing II

Ahmad Hanapi, S.Si., M.Sc  
NIDT. 19851225 20160801 1 069

Mengetahui,  
Ketua Program Studi

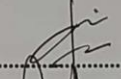
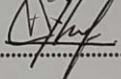
Rachmawati Ningsih, M.Si.  
NIP. 19810811 200801 2 010

ANALISIS KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PADA TANAMAN ANTING-  
ANTING (*Acalypha indica* L) BERDASARKAN PERBEDAAN VARIASI  
PELARUT DAN PENGENALAN POLA SECARA KEMOMETRIK


SKRIPSI

Oleh:  
SOY VIRANDA KUSUMA  
NIM. 17630069

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 22 Desember 2023

Penguji Utama	: Diana Candra Dewi, M.Si NIP. 19770720 200312 2 001	(.....  )
Ketua Penguji	: Susi Nurul Khalifah, M.Si NIP. 19851020 201903 2 012	(.....  )
Sekretaris Penguji	: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(.....  )
Anggota Penguji	: Ahmad Hanapi, S.Si, M.Si NIDT. 19851225 20160801 1 069	(.....  )

Mengetahui,  
Ketua Program Studi



Rachmawati Singih, M.Si.  
NIP. 19810611 200801 2 010

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Soy Viranda Kusuma  
NIM : 17630069  
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia  
Judul Penelitian : Analisis Kromatografi Lapis Tipis Pada Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.) Berdasarkan Perbedaan Variasi Pelarut dan Pengenalan Pola Secara Kemometrik

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar Pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 20 Desember 2023  
Yang membuat Pernyataan,



Soy Viranda Kusuma  
NIM.17630069

## HALAMAN PERSEMBAHAN

Puji Syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan nikmat sehat kepada penulis sehingga bisa mengerjakan tugas akhir ini dengan keadaan sehat wal afiat. Penulis persembahkan skripsi ini kepada:

Kedua orang tua penulis, (Alm) Bapak H. Abdul Karim ZN dan Ibu Nur Habibah yang senantiasa memberikan doa, motivasi, nasihat, materi, kasih sayang, dan dukungan mulai dari awal masuk kuliah hingga penulis dapat menyelesaikan tulisan ini.

Saudara kandung dan Saudari ipar penulis, Firdaus Fauqi, Sonny Sultoni, (Alm) Megawati Desi, dan Desita Ika yang selalu menghibur, menjaga dan memberi dukungan. Terutama saudari ipar penulis (Alm) Megawati Desi yang selalu ada untuk menemani, memantau, menasehati, dan menyemangati penulis dalam proses mengerjakan tugas akhir ini semasa hidupnya.

Kepada Bapak dan Ibu dosen kimia, terkhususnya Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, Bapak Ahmad Hanapi, S.Si., M.Sc, Ibu Diana Candra Dewi, M.Si, dan Ibu Susi Nurul Khalifah, M.Si yang telah memberikan bimbingan, motivasi, masukan selama masa pengerjaan tugas akhir ini. Semoga amal baik Bapak dan Ibu dibalas oleh Allah SWT dengan balasan yang setimpal.

Teman-teman satu penelitian yang selalu berbagi ilmu terkait dengan proses penelitian. Dan teman-teman terdekat saya yang selalu memberikan motivasi dan dukungan kepada penulis.

## **MOTTO**

“Tidak masalah seberapa lambat kamu berjalan, asalkan kamu tidak berhenti.”

## KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Assalmualaikum wa Rahmatullahi wa Barokatuh

Puji dan syukur ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi ini dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa tecurahkan kepada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing kita ke jalan yang benar, yaitu jalan yang diridhoi oleh Allah SWT. Penulisan laporan ini tidak luput dari bantuan semua pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung.. Ucapan terimakasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Orang tua penulis, (Alm) Bapak H. Abdul Karim ZN dan ibu Nur Habibah serta kakak kandung saya Firdaus Fauqi dan Sonny Sultoni dan kakak ipar saya (Alm) Megawati Desi dan kakak ipar saya Desita Ika yang telah banyak memberikan perhatian, nasihat, doa, dan dukungan baik moral maupun material.
2. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA. selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Rachmawati Ningsih, M.Si selaku Ketua program studi Kimia Fakultas Sains dan teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang serta dosen pembimbing saya yang telah memberikan bimbingan dan arahnya.
5. Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku dosen pembimbing kimia yang telah memberikan bimbingan dan motivasi serta arahan kepada penulis dalam penyelesaian penulisan skripsi.
6. Ahmad Hanapi, S.Si., M.Sc selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan bimbingan dan motivasi serta arahan kepada penulis dalam penyelesaian penulisan skripsi.
7. Teman-teman jurusan Kimia angkatan 2017 Khususnya Kimia B dan semua



mahasiswa Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan motivasi, informasi, dan masukannya kepada penulis.

8. Teman-teman dalam satu bimbingan yang telah memberikan semangat, motivasi, dan bantuan dalam menyelesaikan skripsi.
9. Teman – teman dekat saya Salma, Siti, Septi, Habib, Adit, Wildan atas segala dukungan kepada penulis.

Semoga amal perbuatan Bapak/Ibu serta semua pihak yang membantu dalam proses penyelesaian proposal skripsi ini di ridhoi oleh Allah SWT dan dicatat sebagai amal soleh Bapak/Ibu/Saudara sekalian. Penulis menyadari bahwa proposal ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik serta saran atas kekurangan proposal ini akan diterima dengan senang hati.

Wassalamualaikum wa Rahmatullahi wa Barokatuh

Malang, 20 Desember 2023

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>LEMBAR PERSETUJUAN</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN</b> ..	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	v
<b>MOTTO</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>ABSTRAK</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Batasan Masalah .....	6
1.5 Manfaat .....	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	8
2.1 Tanaman Anting-Anting .....	8
2.2 Ekstraksi Ultrasonik.....	10
2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	13
2.4 Analisis ImageJ.....	17
2.5 Analisis PCA (Principal Component Analysis).....	19
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	22
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan .....	22
3.2 Alat dan Bahan .....	22
3.2.1 Alat.....	22
3.2.2 Bahan.....	22
3.3 Rancangan Penelitian.....	22
3.4 Tahap Penelitian .....	23
3.5 Cara Kerja .....	23
3.5.1 Preparasi Sampel .....	23
3.5.2 Ekstraksi dengan Ultrasonik.....	24
3.5.3 Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis .....	24
3.5.3.1 Persiapan Plat KLT .....	24
3.5.3.2 Persiapan Fase Gerak (Eluen) .....	25
3.5.3.3 Proses Elusi .....	25
3.5.4 Pengolahan Plat KLT dengan Image J .....	26

3.5.5	Klasifikasi Sampel Tanaman Anting – Anting dengan PCA .....	26
3.6	Analisis Data.....	27
<b>BAB IV</b>	<b>PEMBAHASAN</b> .....	28
4.1	Preparasi Sampel .....	28
4.2	Ekstraksi dengan Ultrasonik .....	29
4.3	Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	30
4.4	Pengolahan Plat KLT dengan Image J dan Orange .....	35
4.5	Data Hasil Penelitian PCA.....	38
4.6	Integrasi Hasil Penelitian Berdasarkan Prespektif Islam .....	41
<b>BAB V</b>	<b>KESIMPULAN</b> .....	45
5.1	Kesimpulan.....	45
5.2	Saran .....	46
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	.....	47
<b>LAMPIRAN</b>	.....	52

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Tanaman Anting-Anting ( <i>Acalypha indica</i> L) .....	9
Gambar 2. 2 Hasil KLT ekstrak kasar dengan pelarut etanol .....	15
Gambar 2. 3 Hasil KLT ekstrak kasar dengan pelarut metanol .....	16
Gambar 2. 4 Hasil KLT ekstrak kasar dengan pelarut etil asetat.....	16
Gambar 2. 5 Program Image J .....	18
Gambar 2. 6 Plat KLT 366 nm dan interpretasi dengan image J (--) usia 1 bulan, (--) usia 2 bulan, (--) usia 3 bulan (Putri et al.,2018) .....	18
Gambar 2. 7 Score plot dua PC pertama dari nilai AUC temulawak, kunyit dan bangle .....	20
Gambar 4. 1 (a) sampel ekstraksi etanol 96% (b) sampel ekstraksi etanol 70% (c) sampel ekstraksi kloroform (d) sampel ekstraksi etil asetat (e) sampel ekstraksi n-heksan.....	30
Gambar 4. 2 Hasil KLT dengan 5 variasi pelarut (a) Etanol 96%, (b) Etanol 70%, (c) Kloroform, (d) Etil Asetat, (e) N-heksan.....	31
Gambar 4. 3 Sebelum Prepossessing .....	35
Gambar 4. 4 Setelah Prepossessing .....	36
Gambar 4. 5 Score Plot Data PCA Menggunakan MetaboAnalyst 5.0 .....	38
Gambar 4. 6 Heatmap Hasil PCA Data AUC .....	40

## DAFTAR TABEL

Tabel 4. 1 Nilai Rf pada tanaman anting – anting dari 5 variasi pelarut.....	34
Tabel 4. 2 Hasil analisis rata-rata nilai AUC tumbuhan anting-anting .....	37

## ABSTRAK

Kusuma, S. V. 2023. **Analisis Kromatografi Lapis Tipis Pada Tanaman Anting–Anting (*Acalypha indica* L.) Berdasarkan Perbedaan Variasi Pelarut Dan Pengenalan Pola secara Kemometrik**. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I : Elok Kamilah Hayati, M.Si, Pembimbing II : Ahmad Hanapi, S.Si., M.Sc

---

---

**Kata Kunci** : Tanaman Anting - Anting, Ultrasonik, KLT, ImageJ, PCA

Tanaman anting – anting (*Acalypha indica* L.) merupakan salah satu tanaman yang memiliki khasiat sebagai obat. Karena di dalamnya mengandung senyawa aktif flavonoid, tanin, alkaloid, triperpenoid dan steroid. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui profil kromatografi lapis tipis senyawa aktif dalam tanaman anting – anting dengan variasi pelarut.

Proses ekstraksi pada tanaman anting – anting (*Acalypha indica* L.) dilakukan dengan ekstraksi ultrasonic waterbath frekuensi 42kHz selama 20 menit. Menggunakan lima variasi pelarut yakni etanol 96%, etanol 70%, etil asetat, kloroform, dan n-heksan. Pemisahan dilakukan dengan menggunakan plat KLT G<sub>60</sub>F<sub>254</sub> dengan menggunakan eluen sikloheksana : toluene : dietilamina (75:15:10). Kemudian plat divisualisasikan menggunakan lampu UV 366 nm dan dilanjutkan dengan pengolahan data menggunakan Image J dan analisis multivariat PCA.

Pemisahan KLT menggunakan lima variasi pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda, menghasilkan intensitas warna yang berbeda, serta memunculkan 8 spot noda pada etanol 70%, 9 spot noda pada etanol 96%, 10 spot noda pada etil asetat, 9 spot noda pada kloroform, dan 7 spot noda pada n-heksan. Pada analisis multivariat dengan menggunakan PCA menunjukkan adanya pengelompokan terhadap masing-masing sampel dengan menunjukkan variasi total sebesar 90,5% (PC1=69,4%, PC2=21,1%). Pada heatmap menunjukkan jika etanol 70% memiliki kelimpahan senyawa aktif yang paling tinggi dibandingkan dengan pelarut yang lain, dengan ditandai adanya kadar yang berwarna merah paling banyak.

## ABSTRACT

Kusuma, S. V. 2023. **Thin Layer Chromatography Analysis of Anting–Anting (*Acalypha indica L.*) Based On Differences In Solvent Variation and Chemometric Pattern Recognition.** Thesis. Chemistry Department. Faculty of Science and Technology. Maulana Malik Ibrahim State Islamic University, Malang. Supervisor I : Elok Kamilah Hayati, M.Si, Supervisor II : Ahmad Hanapi, S.Si., M.Sc

---

---

**Keywords:** Anting – anting, Ultrasonic, TLC, ImageJ, PCA

The anting - anting plant (*Acalypha indica L.*) is a plant that has medicinal properties. Because it contains active compounds of flavonoids, tannins, alkaloids, triperpenoids and steroids. The aim of this research is to determine the thin layer chromatography profile of active compounds in anting plants with a variety of solvents.

The extraction process for the anting - anting plant (*Acalypha indica L.*) was carried out using ultrasonic water bath extraction with a frequency of 42 kHz for 20 minutes. Using five variations of solvent, namely 96% ethanol, 70% ethanol, chloroform, ethyl acetate, and n-hexane. Separation was carried out using a G60F254 TLC plate using the eluent cyclohexane: toluene: diethylamine (75:15:10). Then the plate was visualized using a 366 nm UV lamp and continued with data processing using Image J and multivariate PCA analysis.

TLC separation uses five variations of solvents with different polarity levels, producing different color intensities, and giving rise to 8 stain spots in 70% ethanol, 9 stain spots in 96% ethanol, 10 stain spots in ethyl acetate, 9 stain spots in chloroform, and 7 stain spots on n-hexane. Multivariate analysis using PCA shows that there is a grouping of each sample showing a total variation of 90.5% (PC1=69.4%, PC2=21.1%). The heat map shows that 70% ethanol has the highest abundance of active compounds compared to other solvents, marked by the highest levels of red.

## ملخص البحث

كوسوما، صويا فيراندا. ٣٢٠٢. تحليل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة في النباتات القرط (*Acalypha indica* L.) بناءً على الاختلافات في اختلافات المذيبات والتعرف على الأنماط الكيميائية. مقال. تخصص كيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الحكومية الإسلامية، مالانج. المشرفة الأولى: الوك كاملة حياتي، الماجستير فالعلوم؛ المستشار الثاني: أحمد حنفي، الماجستير فالعلوم.

**الكلمات المفتاحية:** النباتات القرط، بالموجات فوق الصوتية، PCA, ImageJ, KLT

النباتات القرط (*Acalypha indica* L.) هي نبات لها خصائص طبية. لاحتوائها على مركبات الفلافونويد النشطة، التانين، قلويدات، تريبيرينويدس والمنشطات. الهدف من هذا البحث هو تحديد المظهر اللوني للطبقة الرقيقة للمركبات النشطة في نباتات النمل مع مجموعة متنوعة من المذيبات.

عملية الاستخراج على النباتات القرط (*Acalypha indica* L.) نفذت مع استخراج حمام الماء بالموجات فوق الصوتية التردد ٤٢ kHz خلال ٢٠ دقيقة. باستخدام خمسة أنواع من المذيبات وهي الإيثانول ٩٦%، الإيثانول ٧٠%، الكلوروفورم، إيثيل الأسيتات، و ن-الهكسان. ويتم الفصل باستخدام لوحة KLT G<sub>60</sub>F<sub>254</sub> باستخدام شاطئ الهكسان الحلقي : التولوين : ثنائي إيثيل أمين (١٥:١٠:٧٥). ثم يتم تصور اللوحة باستخدام الضوء UV ٣٦٦ nm واستمر في معالجة البيانات باستخدام ImageJ والتحليل متعدد المتغيرات PCA.

انفصال KLT باستخدام خمسة أنواع من المذيبات ذات مستويات قطبية مختلفة، إنتاج شدة الألوان المختلفة، وإحضار ٨ بقعة وصمة عار على الإيثانول ٧٠%، ٩ بقعة وصمة عار على الإيثانول ٩٦%، بقعة وصمة عار على خلاص الإيثيل، ٩ بقعة وصمة عار على الكلوروفورم، و ٧ بقعة وصمة عار على ن-الهكسان. في التحليل متعدد المتغيرات باستخدام PCA يدل على أن هناك مجموعة كل عينة من خلال إظهار التباين الكلي ل ٩٠,٥% (PC=٤,٦٩%، PC=١,٦١%). تظهر الخريطة الحرارية ما إذا كان الإيثانول ٧٠% يحتوي على أعلى وفرة من المركبات النشطة مقارنة بالمذيبات الأخرى، ويتميز بأعلى مستويات اللون الأحمر.



# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Tanaman herbal merupakan tumbuhan yang memiliki fungsi dalam pengobatan. Salah satu tanaman yang memiliki khasiat sebagai obat, yakni tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.). Secara tradisional tanaman ini dimanfaatkan sebagai obat disentri, malnutrisi, mimisan, muntah darah, berak darah, kencing darah dan malaria (Pambudi, dkk, 2014). Tanaman anting-anting merupakan sejenis gulma yang mudah di temui dan melimpah (Laily, 2016). Pada uji fitokimia ekstrak, tanaman anting-anting mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder yakni flavonoid, tanin, alkaloid, triterpenoid, dan steroid (Sriwahyuni, 2010).

Dengan adanya tanaman anting-anting yang tumbuh berlimpah di Indonesia, itu merupakan salah satu bukti nikmat Allah yang ada di bumi. Dengan begitu kita harus lebih bersyukur dan bisa memanfaatkan dengan baik nikmat yang telah Allah SWT berikan kepada kita. Sebagaimana firman Allah dalam Al-Qur'an surat Asy Syu'araa ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (QS. Asy Syu'araa : 7).

Allah SWT menumbuhkan dari berbagai macam tumbuhan yang baik, yaitu subur dan bermanfaat. Zaujin memiliki makna pasangan (pasangan tumbuh-tumbuhan) karena tumbuhan muncul diantara celah-celah tanah yang terhampar di

bumi. Sedangkan Karim bermakna baik, Allah menumbuhkan berbagai macam jenis tumbuhan yang baik (Karim) di bumi ini dengan berbagai manfaat dan kegunaan yang terkandung didalamnya yang dapat digunakan untuk kemaslahatan manusia (Shihab, 2002).

Tanaman anting-anting sudah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat luas dalam pengobatan tradisional. Dimana pada umumnya tanaman tersebut dijadikan obat herbal dalam bentuk tradisional yakni dalam bentuk jamu. Dengan manfaat sebagai obat disentri, diare, gangguan pencernaan, muntah darah, berak darah dan kencing darah, khusus pada daun berkhasiat untuk mengobati mimisan (Amellia, 2018). Selain itu ketika tanaman anting-anting berfungsi sebagai obat herbal, tanaman yang mengandung senyawa aktif ini akan memberikan khasiat obat, yang mana dia bersifat sebagai antibakteri (Batubara, dkk., 2016; Pratiwi, 2009), antidiare, antidiabetes, dan antimalaria (wink, 2008), antioksidan (Narwade, dkk., 2011), untuk menurunkan kadar gula darah (Kawatu, dkk., 2013), dan antimalaria (Hayati, 2012).

Ketika senyawa aktif dan khasiat obat saling berhubungan, senyawa aktif akan mempengaruhi pada aktifitas khasiatnya. Dalam menghasilkan senyawa aktif kandungannya akan di pengaruhi oleh beberapa faktor yakni ada faktor lingkungan, ada faktor pengeringan, ada faktor pelarut, ada faktor panen, ada faktor usia, dan lain-lain. Pada penelitian ini kajian yang akan dilakukan adalah faktor pelarut. Pelarut yang akan di gunakan adalah pelarut etanol 70%, etanol 96%, etil asetat, kloroform dan n-heksan. Dimana pada lima pelarut itu akan mempengaruhi jenis kandungan senyawa aktif yang akan diekstrak nanti.

Kandungan senyawa aktif tersebut akan berpengaruh pada khasiat obat itu sendiri. Bahan-bahan obat herbal khususnya pada tanaman herbal tanaman anting-anting belum terstandarisasi. Pada penelitian (Hidayah, dkk. 2016), proses ekstraksi menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda, yakni n-heksana (nonpolar), etil asetat (semipolar) dan etanol/methanol (polar). Perbedaan pelarut dalam ekstraksi dapat mempengaruhi kandungan senyawa bioaktif (Santoso *et al.*, 2012). Hal ini disebabkan karena perbedaan polaritas dari pelarut (Megha *et al.*, 2014).

Oleh karena itu, diperlukan standarisasi bahan baku dengan variasi pelarut pengestrak. Karena kandungan senyawanya belum terstandarkan, yakni belum sama. Metode standarisasi bahan baku bisa dilakukan dengan pendekatan metabolomik. Metabolomik sendiri memiliki arti bisa mengetahui secara keseluruhan senyawa aktif, yang mana dia bisa secara konprehensif. Metabolomik dilakukan dengan cara kromatografi, yang mana dengan pendekatan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pernyataan Vermaak dkk. (2009) yakni penggunaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sendiri memiliki keunggulan seperti sederhana, biaya rendah, kapasitas sampel yang besar, hasil yang cepat dan memberikan resolusi pemisahan yang baik.

Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa yang diinginkan dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Mukhriani, 2014). Ekstraksi sendiri memiliki factor-faktor yang mempengaruhi antara lain suhu, lama ekstraksi, jenis pelarut, ukuran partikel, pH media ekstraksi, jumlah ekstraksi dan degradasi senyawa selama ekstraksi (Savova, dkk, 2007). Syarat pelarut yang baik digunakan untuk ekstraksi yaitu pelarut yang dapat melarutkan zat yang ingin diesktrak, memiliki

titik didih yang lebih rendah sehingga pelarut mudah diuapkan tanpa menggunakan suhu tinggi, pelarut tidak larut dalam air, bersifat inert, tidak mudah terbakar, dan harganya murah (Guenther, 1987).

Pada penelitian Febrianto (2020), dilakukan ekstraksi dengan metode ultrasonik dengan pelarut etanol dan lama ekstraksi selama 10 menit, kemudian proses Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan eluen n-heksana : etil asetat (7,5 : 2,5) yang diderivatisasi melalui penyemprotan reagen vanilin-sulfat dan dilakukan variasi lama penotolan serta pengamatan dibawah lampu UV selama 60 menit. Didapatkan stabilitas analit selama kromatografi kurang stabil sedangkan stabilitas hasil derivatisasi (visualisasi) pada penelitian Safitri (2018), dengan variasi pelarut dan variasi lama dengan metode ultrasonik, dan menggunakan eluen etanol, metanol dan etil asetat. Dihasilkan pada variasi pelarut yakni etanol menghasilkan 3 spot, metanol menghasilkan 3 spot dan etil asetat menghasilkan 4 spot, sedangkan pada variasi lama ekstraksi tidak mempengaruhi jumlah noda yang terbentuk.

Pada hasil uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) nanti divisualkan dalam bentuk kromatogram dengan menggunakan Image J. Image J sendiri merupakan salah satu piranti lunak yang digunakan untuk mengubah respon Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menjadi lebih terkuantifikasi dengan memanfaatkan gambar hasil dokumentasi pelat Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada penelitian Fitrianti (2011), peranti lunak Image J yang dikombinasikan dengan teknik pengenalan pola telah berhasil mendiferensiasikan ketiga tanaman obat, yakni temulawak,

kunyit, dan bangle berdasarkan intensitas warna pita komponen yang penciri, yakni kurkumin, demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin.

Pada hasil yang didapatkan dari kromatogram kemudian dianalisis dengan menggunakan Principal Component Analysis (PCA). Penelitian secara metabolomik kemometrik dengan menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Antara lain berdasarkan interpretasi kromatografi lapis tipis yakni pada tanaman temulawak, kunyit, dan bangle yang diteliti oleh Fitrianti (2011). Berdasarkan pada letak geografis yakni Pada penelitian Muttaqin (2018), dengan ekstrak tanaman temulawak dari kota Cianjur, Semarang dan Nusa Tenggara Timur. Dan baku temu hitam dan kunyit dari kota Jawa barat, Jawa Tengah dan Lampung, yang di teliti oleh Emawati (2018).

Oleh karena itu pada penelitian ini untuk mengetahui perbedaan senyawa aktif berdasarkan pelarut, maka akan di lakukan pemisahan senyawa aktif pada ekstraksi tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) yang diambil di daerah Purwoharjo kota Banyuwangi dengan lima pelarut yang berbeda (etanol, etanol 70%, kloroform, heksan, etil asetat) dengan metode ekstraksi ultrasonik. Kemudian di lakukan analisis menggunakan parameter profil kromatogram dengan Kromatografi lapis Tipis (KLT). Yang nantinya data hasil dari kromatogram akan diolah menggunakan Image J dan dianalisis untuk menentukan keragaman profil kromatogram menggunakan analisis PCA.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini ialah:

1. Bagaimana pola kromatogram sidik jari pada tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) berdasarkan variasi pelarut?
2. Bagaimana pengelompokkan senyawa tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) berdasarkan variasi pelarut menggunakan PCA?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Adapun tujuan penelitian ini ialah:

1. Mengetahui pola kromatogram sidik jari pada tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) berdasarkan variasi pelarut.
2. Mengetahui pengelompokkan senyawa tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) berdasarkan variasi pelarut menggunakan PCA.

### **1.4 Batasan Masalah**

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Sampel yang digunakan ialah tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) yang berasal dari Purwoharjo Banyuwangi.
2. Pelarut yang digunakan ialah etanol, etanol 70%, kloroform, n-heksan, dan etil asetat.
3. Mengolah data secara kemometrik dengan Principal Component Analysis (PCA).

### **1.5 Manfaat**

Manfaat dari penelitian ini adalah diharapkan dapat mengetahui manfaat dari tanaman herbal anting-anting (*Acalypha indica* L.). Serta diharapkan dapat mengetahui informasi dari profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) senyawa aktif pada tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) dengan menggunakan lima

pelarut yang berbeda yakni etanol 70%, kloroform, heksan, etil asetat, etanol

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Tanaman Anting-Anting**

Tanaman anting-anting (*Acalypha indica L.*) merupakan tanaman liar yang umum ditemukan dipinggir jalan, lereng gunung maupun lapangan berumput pada daerah tropis. Tanaman anting-anting yang merupakan tanaman liar memiliki kandungan senyawa alkaloid yang dapat digunakan sebagai obat (Wijayakusuma, 2005). Ciri-ciri tanaman anting-anting yakni, pada daunnya tanaman anting-anting memiliki bentuk daun bulat lonjong. Letak daun tanaman ini berselang seling. Bentuk ujung dan pangkal daun tanaman anting-anting berbentuk lancip, sedangkan bagian pinggir daun bergerigi. Panjang daun tanaman ini ialah 2,5 cm hingga 8 cm serta lebarnya sekitar 1,5 cm hingga 3,5 cm. Pada batangnya, tanaman anting-anting banyak ditemukan di pinggir jalan, di lereng gunung dan di lapangan yang memiliki banyak rumput. Tanaman anting-anting memiliki ketinggian sekitar 30 cm sampai dengan 50 cm. Batang tanaman anting-anting dapat bercabang serta memiliki garis kasar memanjang. Pada bunganya, tanaman anting-anting ialah bunga yang berumah satu dan memiliki kelamin tunggal. Bunga pada tanaman anting-anting muncul dari ketiak daun yang berbentuk kecil dalam rangkaian yang berupa malai. Dan pada buahnya, buah dari tanaman anting-anting memiliki warna hitam dan berbentuk kecil (Ameilia, 2018).

Beberapa penelitian menyatakan bahwa tanaman anting-anting (*Acalypha indica L.*) memiliki beragam senyawa kimia seperti saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, minyak atsiri, steroid, triterpenoid, asam askorbat,  $\beta$ -sitosterol, fiber, quercetin, dan kaempferol (Hayati, 2012; Kumar, 2013; Dalimartha, 2010; Kirom,



2017 dan Sirait, 2007). Senyawa kimia yang terdapat pada tanaman anting-anting memiliki berbagai efek farmakologi, diantaranya efek antidiabetik, efek hipoglikemik, efek antioksidan yang diduga dapat dimanfaatkan untuk menurunkan kadar glukosa darah yang tinggi sehingga dapat digunakan menjadi terapi diabetes mellitus (Kirom, 2017).

Klasifikasi tanaman anting-anting adalah sebagai berikut (BPOM RI, 2000):

Kingdom : Plantae  
Sub kelas : Tracheobiontai  
Divisi : Spermatophyta  
Sub Divisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledoneae  
Sub-kelas : Rosidae  
Bangsa : Euphorbiales  
Suku : Euphorbiaceae  
Marga : *Acalypha*  
Jenis : *Acalypha indica* Linn



Gambar 2. 1 Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L)

Tanaman anting-anting di beberapa daerah dikenal dengan sebutan ceka mas (Melayu), Lelatang (Jakarta), rumput kokosongan (Sunda), rumput bolong-bolong (Jawa) (Muslimah, 2008). Kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman anting-anting yakni senyawa flavonoid (Yasmin, dkk, 2013; Febriyanti, dkk, 2012), steroid (Febriyanti, dkk, 2014; Sirait, 2007; Hayati, dkk,

2012), monoterpen, seskuioterpen, dan triterpenoid (Febriyanti, dkk, 2014; Sirait, 2007), tannin (Noriko, 2013; Hayati, dkk, 2012), Saponin (Tukiran, dkk, 2014; Sirait, 2007), dan alkaloid (Tukiran, dkk, 2014). Menurut Ameilia (2018), khasiat dari tumbuhan tanaman anting-anting yakni tumbuhan anting-anting telah banyak digunakan secara turun-temurun sebagai obat disentri, diare, gangguan pencernaan, muntah darah, berak darah dan kencing darah, khususnya pada daun berkhasiat mengobati mimisan. Pada tumbuhan anting-anting memiliki rasa pahit. Akar pada tanaman anting-anting dapat digunakan untuk menurunkan kadar asam urat darah yang tinggi, meredakan nyeri pada rematik, pengobatan diabetes mellitus dan meredakan pegal linu. Selain berkhasiat untuk manusia, tanaman anting-anting juga dapat melancarkan pencernaan pada kucing. Cara yang dapat digunakan untuk meyakinkan tanaman tersebut yakni dengan cara menyabutnya sampai ke akar dan membiarkannya. Jika ada kucing yang memakan akarnya, berarti tanaman tersebut adalah tanaman anting-anting.

## **2.2 Ekstraksi Ultrasonik**

Metode ultrasonik merupakan ekstraksi dengan perambatan energi melalui gelombang ultrasonik dengan menggunakan cairan sebagai media perambatan dan menimbulkan efek kavitasi yang dapat memecah dinding sel, sehingga senyawa dapat terekstrak dalam pelarut tersebut. Efek kavitas merupakan proses pembentukan gelombang mikro dikarenakan meningkatnya tekanan akibat gelombang ultrasonik. Kelebihan dari ekstraksi ultrasonik yaitu waktu ekstraksi lebih cepat, rendemennya lebih maksimal dan lebih hemat pelarut (Winata dan Yuniarta, 2015). Metode ultrasonik merupakan salah satu metode yang lebih efektif, karena pada metode ekstraksi ultrasonik proses ekstraksi dapat

berlangsung lebih cepat dan pelarut yang dibutuhkan tidak banyak dibandingkan konvensional (Zou. Dkk. 2014). Metode ultrasonik menggunakan bantuan gelombang ultrasonik, sehingga pada proses ekstraksi terjadi perambatan energi melalui gelombang ultrasonik dan dapat meningkatkan intensitas perpindahan energi dengan media perambatannya berupa cairan (Kuldicole, 2012).

Prinsip ekstraksi ultrasonik adalah adanya peningkatan transfer massa yang disebabkan oleh naiknya penetrasi pelarut kedalam jaringan tumbuhan lewat efek kapiler. Gelembung kavitasi akan terbentuk pada dinding sel tanaman akibat adanya gelombang ultrasonik. Kavitasi adalah proses pembentukan gelembung-gelembung mikro (*microbubbles*) karena meningkatnya tekanan pada saat ekstraksi sebagai akibat dari adanya gelombang ultrasonik. Pecahnya gelembung kavitasi melibatkan energi yang besar dan menghasilkan efek panas yang membantu interaksi antara pelarut dan bahan dalam ekstraksi sehingga hasil ekstraksi lebih maksimal. Gelembung kavitasi akan terpecah disebabkan oleh tipisnya bagian kelenjar tumbuhan yang mudah rusak oleh sonikasi (Melecchi *et al*, 2006; Sani, 2014). Faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi adalah persiapan bahan, lama pengadukan, proses penyaringan dan pemekatan. Hal yang harus diperhatikan dalam pemilihan jenis pelarut adalah daya larut, titik didih, sifat toksik, mudah tidaknya terbakar dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi (Khopkar, 2008).

Keuntungan dari ekstraksi ultrasonik yaitu waktu yang digunakan lebih singkat, efisiensi lebih besar (Garcia dan Castro, 2004), aman dan meningkatkan jumlah rendemen (Zou, dkk., 2014). Pada penelitian Supardan, dkk (201) dalam mengambil minyak dari limbah cair menyatakan rendemen minyak yang

diperoleh dari proses ekstraksi ultrasonik dengan rasio volume limbah terhadap pelarut 1:1 dan waktu ekstraksi 60 menit sebesar 0,138%. Pada kondisi yang sama, proses ekstraksi tanpa ultrasonik menghasilkan rendemen sebesar 0,002% dengan kecepatan pengadukan 200 dan 300 rpm. Dan pada penelitian Yang, dkk. (2009), dalam mengekstraksi tongkol jagung juga menunjukkan hasil yang signifikan. Hasil ekstraksi menggunakan ultrasonik dengan waktu 43 menit mampu mengekstrak sebanyak 43%, sedangkan menggunakan ekstraksi konvensional yang membutuhkan waktu 24 jam menghasilkan ekstrak sebanyak 34%.

Cara kerja metode ultrasonik dalam mengekstraksi adalah sebagai berikut (keil, 2007):

- a. Gelombang ultrasonik pada sekeliling bahan yang akan diekstraksi akan menyebabkan pemanasan pada bahan tersebut, dan melepaskan senyawa ekstrak.
- b. Terdapat efek ganda yang dihasilkan yaitu pengacauan dinding sel sehingga membebaskan kandungan senyawa yang ada di dalamnya dan pemanasan lokal pada cairan dan meningkatkan difusi ekstrak.
- c. Energi kinetik dilewatkan ke seluruh bagian cairan diikuti dengan munculnya gelembung kavitasasi pada dinding atau permukaan sehingga meningkatkan transfer massa antara permukaan padat-cair.
- d. Efek mekanik yang ditimbulkan adalah meningkatkan penetrasi dari cairan menuju dinding membran sel, mendukung pelepasan komponen sel, dan meningkatkan transfer massa.

### 2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode pemisahan yang didasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen diantara dua fasa (fase gerak/eluen dan fasa diam/ plat silika) yang memiliki tingkat kepolaan yang berbeda (Sastrohamidjojo, 1996). Menurut Sherma (1991), Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan bentuk kromatografi planar dengan fase diam berupa lapisan yang seragam pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat alumunium, atau pelat plastik dan fase gerak berupa cairan yang bergerak sepanjang fase diam. Prinsip Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yaitu pemisahan campuran karena adanya pergerakan solvent melewati permukaan datar, komponen-komponen tersebut akan bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda-beda tergantung dari kelarutannya, adsorpsi, ukuran molekul, muatan dan elusi (Fifield dan Kealy, 2000).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan kromatografi cair-padat dan merupakan metode pemisahan fisikokimia. Lapisan yang memisahkan terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penangga berupa pelat gelas, logam atau lapisan yang cocok (Padmawinata, 1985). Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) salah satu yang menjadi pilihan sebagai metode kendali mutu tumbuhan obat, dikarenakan memiliki keunggulan seperti sederhana, biaya rendah, kapasitas sampel yang besar, hasil yang cepat, dan memberikan resolusi pemisahan yang baik (Vermaak, dkk, 2009). Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) di lakukan beberapa kali menggunakan beberapa eluen dengan tingkat kepolaran yang berbeda untuk mendapatkan pelarut yang mampu memberikan pemisahan yang baik serta noda zat warna yang bagus. Bercak pada

plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dimonitor dibawah lampu UV 254 nm dan UV 365 nm (Alen, 2017). Faktor yang dapat mempengaruhi hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) selama proses analisis yakni kestabilan senyawa. Kestabilan senyawa baik sebelum elusi (pada plat) maupun setelah elusi (visualisasi) harus stabil selama proses analisis (Laila, 2019). Jeda waktu tunggu pada proses analisis menyebabkan spot dalam plat dapat berubah (Reich dan Schibli, 2006). Kestabilan senyawa dinyatakan dengan tidak adanya perubahan jumlah, posisi, warna, intensitas spot selama jeda waktu tunggu (Effendi, 2016).

Eluen atau fase gerak pada KLT merupakan suatu medium angkut yang terdiri atas satu atau campuran pelarut tunggal. Fase gerak akan merayap sepanjang fase diam melalui gaya kapiler. Senyawa diidentifikasi berdasarkan penampakan dan nilai  $R_f$ -nya (jarak relatif komponen terhadap jarak pelarut) yang kemudian di bandingkan dengan spot standar untuk analisis kualitatifnya (Fried & Sherma, 1982).

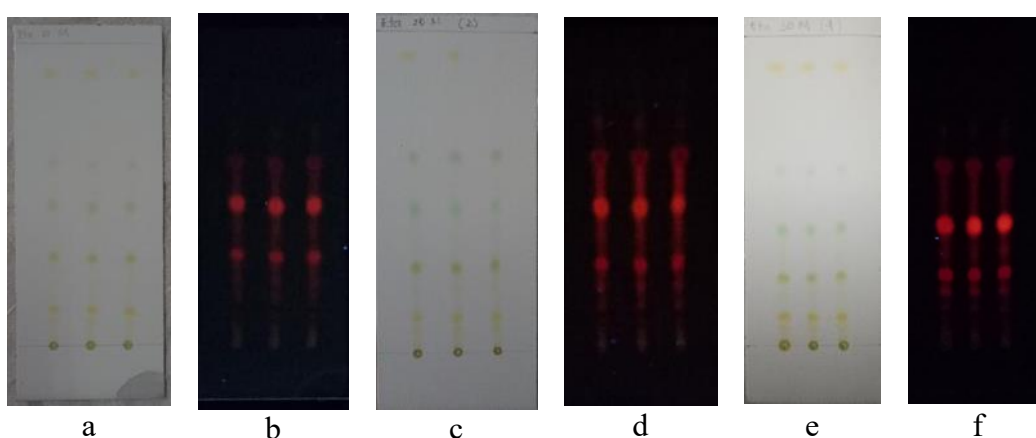
Identifikasi senyawa-senyawa yang terpisah pada kromatografi lapis tipis dapat dihitung dengan menggunakan  $R_f$  (*Retrdation factor*):

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Harga  $R_f$  dipengaruhi oleh sruktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan, sifat dari penyerap, jenis eluen dan jumlah cuplikan (Sastrohamidjojo, 2007). Gandjar dan Rohman (2007) menyatakan bahwa senyawa yang mempunyai  $R_f$  lebih besr mempunyai kepolaran yang rendah, begitu juga sebaliknya. Hal tersebut karena fase diam bersifat polar, senyawa yang lebih polar akan tertahan kuat pada fasa diam sehingga menghasilkan nilai  $R_f$  yang rendah.

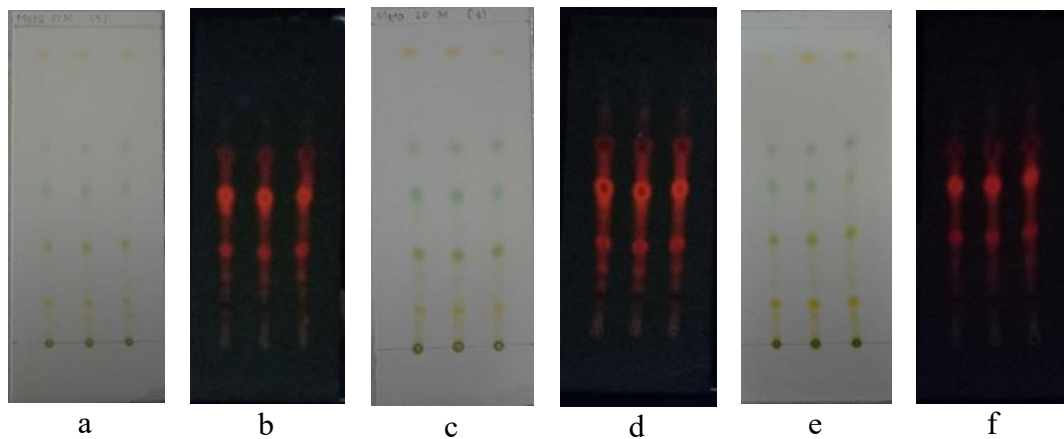
Eluen yang digunakan yakni sikloheksana: toluena: dietilamin (75:15:10), yang mana menurut Fadhilah (2016) eluen tersebut menunjukkan eluen yang terbaik untuk mendapatkan alkaloid yang terpisah dengan baik pada tanaman anting-anting. Penggunaan eluen tersebut menghasilkan 4 noda dengan nilai Rf masing-masing sebesar 0,35; 0,65; 0,78 dan 0,89.

Pada penelitian Safitri (2018), dengan menggunakan tanaman anting-anting di hasilkan polat KLT sebagai berikut:



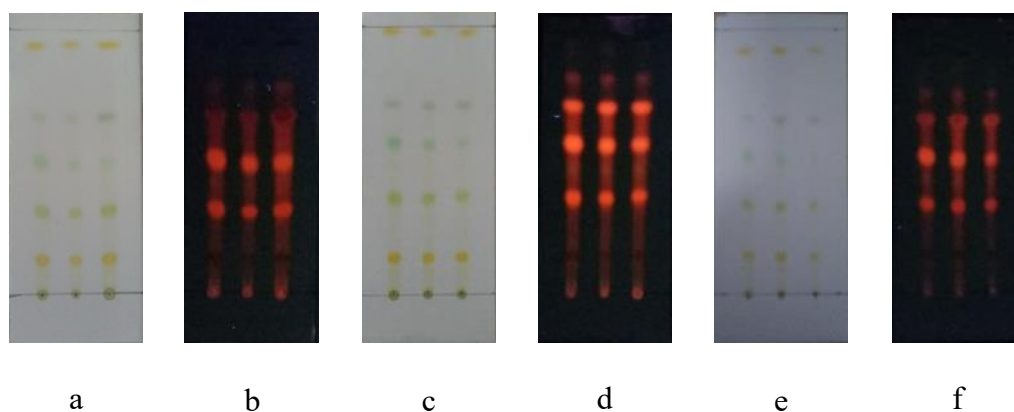
Gambar 2. 2 Hasil KLT ekstrak kasar dengan pelarut etanol

- Keterangan:
- Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 10 menit tanpa lampu UV
  - Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 10 menit menggunakan lampu UV 366 nm
  - Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 20 menit tanpa lampu UV
  - Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 20 menit menggunakan lampu UV 366 nm
  - Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 30 menit tanpa lampu UV
  - Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 30 menit menggunakan lampu UV 366 nm



Gambar 2. 3 Hasil KLT ekstrak kasar dengan pelarut metanol

- Keterangan:
- Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 10 menit tanpa lampu UV
  - Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 10 menit menggunakan lampu UV 366 nm
  - Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 20 menit tanpa lampu UV
  - Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 20 menit menggunakan lampu UV 366 nm
  - Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 30 menit tanpa lampu UV
  - Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 30 menit menggunakan lampu UV 366 nm



Gambar 2. 4 Hasil KLT ekstrak kasar dengan pelarut etil asetat

- Keterangan:
- Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 10 menit tanpa lampu UV
  - Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 10 menit menggunakan lampu UV 366 nm



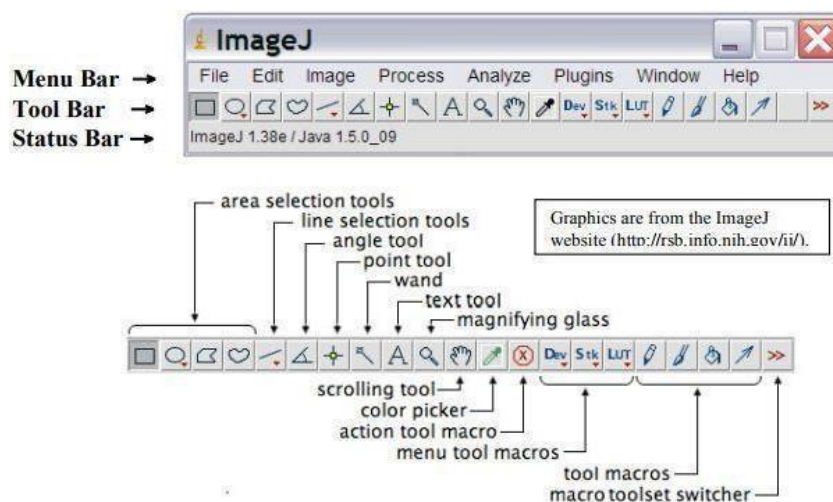
- c. Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 20 menit tanpa lampu UV
- d. Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 20 menit menggunakan lampu UV 366 nm
- e. Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 30 menit tanpa lampu UV
- f. Hasil KLT ekstrak kasar dengan lama ekstraksi 30 menit menggunakan lampu UV 366 nm

Pada penelitian Safitri tersebut, hasil pemisahan KLT pada tanaman anting-anting didapatkan jumlah noda yang berbeda pada variasi pelarut. Yakni, pada pelarut etanol menghasilkan 3 spot, pada pelarut metanol menghasilkan 3 spot, dan pada pelarut etil asetat menghasilkan 4 spot.

#### **2.4 Analisis ImageJ**

Image J merupakan perangkat lunak pengolah gambar berbasis program Java yang dikeluarkan oleh National Institute of Health, United State of America (NIH). Image J dapat menghitung area dan piksel dari suatu gambar, mengukur jarak, sudut, membuat profil dari desintogram dan garis kurva. Program ini di dukung dengan pengatur gambar seperti pengatur ketajaman, kehalusan, kecerahan, warna, sudut dan penyaring dari gambar yang akan diolah. Program ini dapat mengolah gambar dalam bentuk format yang beragam seperti tagged image format file (TIFF), grafic interchange format (GIF), joint photographic experts group (JPEG), bitmap image (BMP) dan gambar mentah (Aji, 2011).

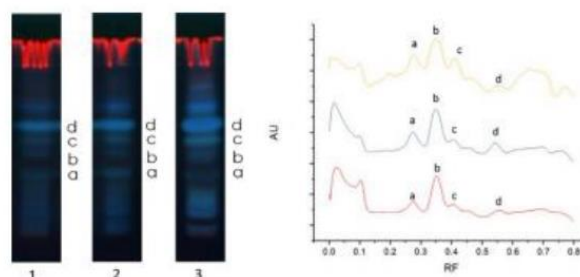
Menurut Reinking (2007), program Image J berisi menu-menu bar, tool bar, dan status bar yang bisa dilihat pada gambar. Ketika kursor berada diatas gambar, maka akan ditampilkan koordinat dan koordinat tersebut diukur dalam pixel/detik. Dalam gambar digital, pixel merupakan titik Tunggal dalam pencitraan atau elemen terkecil dari gambar yang dapat dikenali.



Gambar 2. 5 Program Image J

Program ini didukung dengan berbagai pengatur gambar, seperti pengatur ketajaman, kehalusan, kecerahan, warna, sudut, dan filter dari gambar yang akan diolah. Selain itu dapat membantu dalam melakukan transformasi geometris, seperti scaling, rotasi, dan membalik (Ferreira & Rasband, 2010).

Pada penelitian Putri (2018), pita KLT menunjukkan perbedaan pada pita d untuk masing-masing usia 1,2 dan 3 bulan. Pita d pada klt untuk usia 3 bulan, menunjukkan senyawa yang dikandung lebih besar. Gambar dibawah akan menunjukkan interpretasi puncak pada pita. Setiap pita memiliki ketebalan yang berbeda-beda, diketahui nilainya melalui luas area puncak yang muncul tersebut. Semakin tebal pita maka luas puncak yang dihasilkan semakin besar.



Gambar 2. 6 Plat KLT 366 nm dan interpretasi dengan image J (--) usia 1 bulan, (-) usia 2 bulan, (--) usia 3 bulan (Putri et al.,2018)

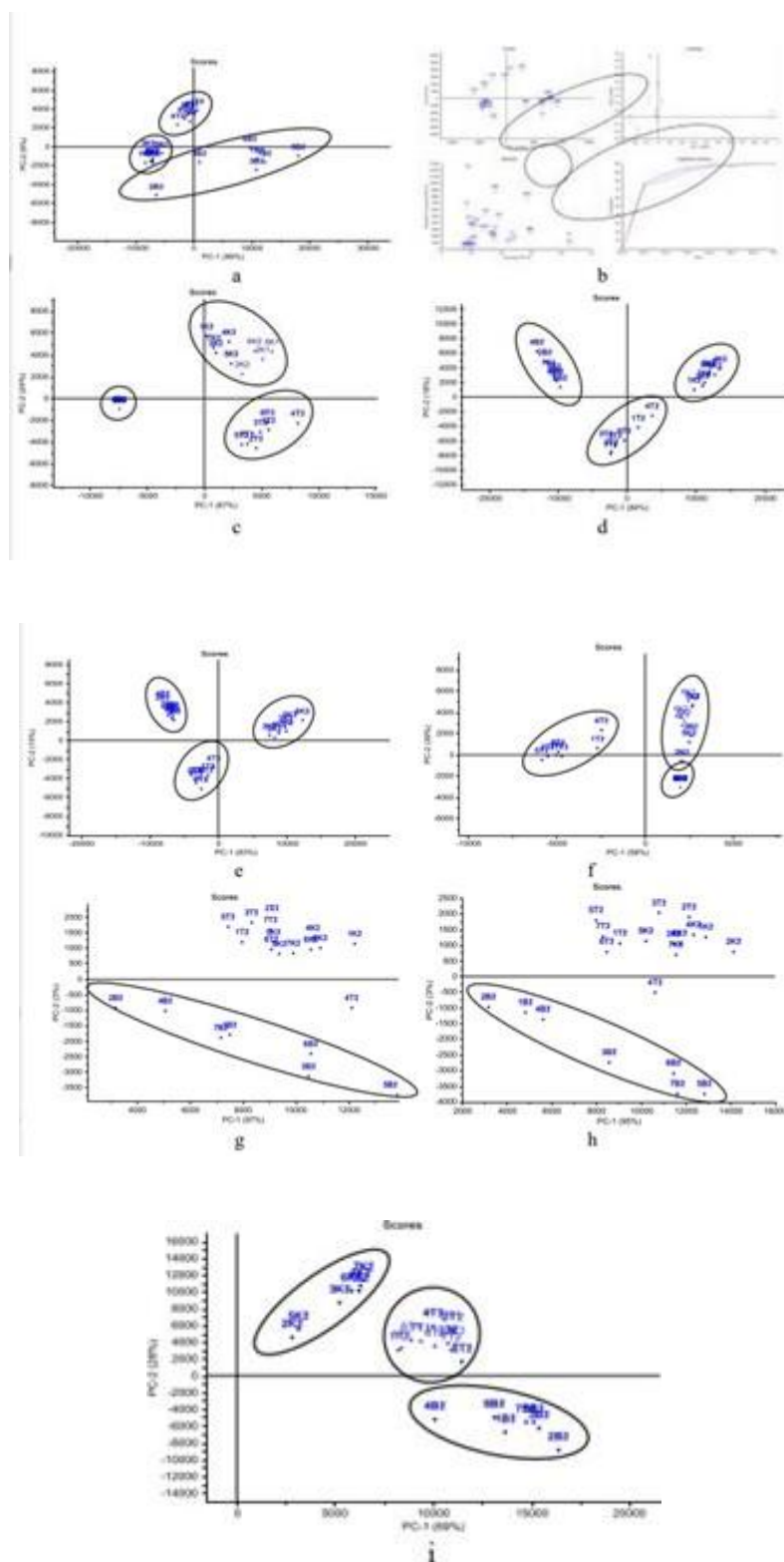
## 2.5 Analisis PCA (Principal Component Analysis)

Principal Component Analysis (PCA) merupakan metode analisis perubah ganda yang bertujuan menyederhanakan perubah yang diamati dengan cara menyusutkan (mereduksi) dimensinya (Fitrianti, 2011). PCA dapat memudahkan visualisasi pengelompokan data, evaluasi kesamaan antar kelompok atau kelas, dan menemukan faktor atau alasan dibalik pola yang teramati melalui korelasi berdasarkan sifat kimia atau fisika-kimia. Penyederhanaan perubah dilakukan dengan cara menghilangkan korelasi diantara perubah bebas melalui tranformasi perubah bebas asal ke perubah baru yang tidak berkorelasi sama sekali atau yang biasa disebut dengan Principal Component (PC).

Tujuan Principal Component Analysis (PCA) adalah untuk menjelaskan bagian dari variasi dalam kumpulan variabel yang diamati atas dasar beberapa dimensi. Dari variabel yang banyak dirubah menjadi sedikit variabel. Tujuan khusus Principal Component Anlysis (PCA) yaitu :

1. Untuk meringkas pola kolerasi antar variabel yang diobservasi.
2. Mereduksi sejumlah besar variabel menjadi sejumlah kecil faktor.
3. Memberikan sebuah definisi operasional (sebuah persamaan regresi) dimensi pokok penggunaan variabel yang observasi.
4. Menguji teori yang mendasarinya (Tabachnick, 2001).

Pada penelitian Fitriana, Suci A (2011), diperoleh hasil dari analisis PCA yakni pada gambar 2.6:



Gambar 2. 7 Score plot dua PC pertama dari nilai AUC temulawak, kunyit dan bangle

Hasil dari analisis PCA tersebut yakni pengelompokan terbaik untuk memisahkan tanaman temulawak, kunyit, dan bangle di miliki oleh data nilai AUC dari densitogram pita KLT yang tanpa penyemprotan larutan pendeteksi pita komponen (Gambar d) dan data nilai AUC dari densitogram pita KLT dengan penyemprotan menggunakan larutan vanilina pada visualisasi sinar UV dengan Panjang gelombang 254 nm (Gambar e). terlihat pada masing-masing kelompok berada saling berdekatan. Kelompok tanaman dengan jenis yang sama berada saling berdekatan karena kemiripan sifat dan komposisi kimia yang dimilikinya.

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2023 sampai September 2023 di Laboratorium Kimia Analitik Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat alat gelas, blender, oven, loyang dan ayakan 90 mesh, kertas saring, corong gelas, gelas pengaduk, gelas arloji, plat KLT silika gel G<sub>60</sub>F<sub>254</sub>, oven, loyang, pipa kapiler, chamber, spatula, botol vial, pipet ukur, bola hisap, pipet tetes, alat semprot, cutter, penggaris, ultrasonik dan Camera.

##### **3.2.2 Bahan**

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.), etanol 96%, etanol 70%, kloroform, heksan, etil asetat, aquades, dan plat KLT silika gel G<sub>60</sub>F<sub>254</sub>.

#### **3.3 Rancangan Penelitian**

Penelitian dilaksanakan dengan metode kualitatif. Pertama diambil tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) dan dikeringanginkan serta dihaluskan dengan menggunakan blender. Selanjutnya di ayak dengan ukuran 90 mesh. Serbuk kasar kemudian dilakukan ekstraksi ultrasonik dengan pelarut etanol 70%, etanol 96%, etil asetat, kloroform, n-heksan selama 20 menit. Ekstraksi ultrasonik yang digunakan memiliki frekuensi 42 KHz pada suhu kamar. Selanjutnya disaring dan

filtratnya merupakan ekstrak kasar senyawa tanaman anting-anting. Ekstrak kasar tanaman anting-anting dipisahkan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil kromatogram kemudian dianalisis menggunakan image J dan PCA.

### **3.4 Tahap Penelitian**

Penelitian ini dirancang dengan tahapan sebagai berikut:

1. preparasi sampel tanaman anting-anting.
2. Ekstraksi senyawa tanaman anting-anting dengan ultrasonik dengan lama ekstraksi 20 menit dan variasi pelarut (etanol, etanol 70%, kloroform, heksan, etil asetat).
3. Metode pemisahan kromatografi lapis tipis berdasarkan perbedaan pelarut dengan menggunakan eluen Sikloheksana: Toluena: Dietilamin (75:15:10).
4. Analisis profil senyawa tanaman anting-anting menggunakan KLT.
5. Analisis menggunakan image J.
6. Analisis menggunakan PCA.

### **3.5 Cara Kerja**

#### **3.5.1 Preparasi Sampel**

Tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) diambil dari kota Banyuwangi daerah Purwoharjo. Kemudian semua tanaman anting - anting yang telah diambil dari beberapa tempat di campur. Tanaman anting-anting sebanyak 1 kg dicuci dengan air terlebih dahulu untuk memisahkan kotoran dengan tumbuhan. Kemudian tanaman anting-anting dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan menggunakan oven. Selanjutnya tanaman anting-anting dihaluskan dengan

blender sampai berbentuk serbuk, kemudian serbuk diayak dengan ayakan mesh 90 mesh dan disimpan dalam wadah plastik.

### **3.5.2 Ekstraksi dengan Ultrasonik**

Senyawa tanaman anting-anting diekstrak menggunakan ekstraksi ultrasonik selama 20 menit dengan frekuensi 42 KHz menggunakan lima variasi pelarut yaitu etanol 70%, etanol 96%, etil asetat, kloroform, dan n-heksan. Ekstraksi ultrasonik dilakukan dengan cara diambil 0,5 gr serbuk dilarutkan dalam 5 ml etanol 70%, 0,5 gr serbuk dilarutkan dalam 5 ml etanol 96%, 0,5 gr serbuk dilarutkan dalam 5 ml etil asetat, 0,5 gr serbuk dilarutkan dalam 5 ml kloroform, 0,5 gr serbuk dilarutkan dalam 5 ml heksan. Diulang sebanyak 3 kali. Perbandingan antara berat : volume yang digunakan 1:10 (Handayani, 2016). Selanjutnya serbuk yang telah dicampur dengan pelarut dimasukkan kedalam botol vial dan dilakukan ekstraksi ultrasonik waterbath pada frekuensi 42 KHz dan sesuai dengan suhu kamar selama 20 menit. Kemudian disaring hasil ekstraksi dengan kertas saring sehingga didapat filtrat ekstrak tanaman anting-anting. Ekstrak yang didapat dikemas dengan botol vial.

### **3.5.3 Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis**

#### **3.5.3.1 Persiapan Plat KLT**

Pemisahan senyawa ekstrak tanaman anting-anting dilakukan dengan menggunakan plat silika G<sub>60</sub>F<sub>254</sub> sebagai fase diamnya dengan ukuran 8 x 10 cm. Kemudian diberi garis pada tepi bawah dengan jarak 1 cm untuk mengetahui batas elusi dan batas tepi bawah dengan jarak 1 cm untuk menentukan titik awal



penotolan. Selanjutnya plat silika  $G_{60}F_{254}$  diaktivasi dengan cara di oven pada suhu  $105^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit untuk menghilangkan kelembaban air.

### **3.5.3.2 Persiapan Fase Gerak (Eluen)**

Sebelum dilakukan pengelusan, eluen dalam bejana dijenuhkan terlebih dahulu. Setiap campuran fase gerak dimasukkan ke dalam Chamber, kemudian ditutup rapat dan dilakukan penjenuhan selama 30 menit. Penjenuhan dilakukan untuk menyamakan tekanan uap pada seluruh bagian bejana. Eluen yang digunakan yaitu sikloheksana : toluena : dietilamin dengan perbandingan 75 : 15 : 10 (Fadhilah, 2016).

### **3.5.3.3 Proses Elusi**

Ekstrak yang telah di ekstraksi dengan ultrasonik waterbath di ambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 20 mikroliter, kemudian di letakkan dalam microtube. Kemudian ditotolkan sebanyak 3 totolan (pada tempat yang sama) pada tiap variasi pelarut menggunakan pipa kapiler pada plat selanjutnya dielusi dengan fase gerak, plat tersebut dimasukkan dalam Chamber yang berisi fase gerak yang telah jenuh, kemudian Chamber ditutup rapat hingga fase geraknya mencapai tinggi 8 cm dari posisi aplikasi ekstrak. Selanjutnya plat diangkat dan dikeringkan. Kemudian noda pada plat silika  $G_{60}F_{254}$  hasil dari KLT diamati menggunakan UV 366 nm. Dan diamati warna noda yang dihasilkan. Kemudian di dokumentasi dengan kamera Nikon D5300.

### 3.5.4 Pengolahan Plat KLT dengan Image J

Gambar profil KLT hasil dokumentasi dengan kamera yang sudah berupa file (JPEG/PNG) diolah dengan software image J. Gambar yang akan diolah dapat dibuka dengan menekan “File”, “Open” dan dipilih gambar yang diinginkan. Gambar plat KLT ditandai dalam bentuk kotak penanda yang disediakan oleh Image J penandaan yang disamakan pada semua pola sidik jari merupakan tahap preprocessing, cara penandaannya dengan digunakan icon berebentuk kotak (Rectangular). Setelah itu, dipilih menu “Analyze”, “Gels”, dan “Select first line” atau dipilih “Select next line” untuk pita berikutnya jika pita yang akan diolah lebih dari satu. Selanjutnya, dipilih kembali menu “Analyze”, “Gels”, dan “Plot lane”, yang akan menampilkan kromatogram dari masing-masing gambar pita KLT sesuai intensitas warna yang diberikan. Pada masing-masing dasar puncak kromatogram yang dihasilkan, dibuat baseline menggunakan icon berbentuk garis “Straight” kemudian menekan icon berbentuk tongkat “Wand tool” pada daerah puncak tersebut, sehingga akan dihasilkan nilai AUC yang diinginkan secara otomatis. Proses *smoothing* dilakukan dengan memilih menu “process-smooth” atau menekan “Ctrl-Shift-S” pada gambar mentah plat KLT untuk memperhalus bentuk densitogram yang di hasilkan (Fitrianti, 2011).

### 3.5.5 Klasifikasi Sampel Tanaman Anting – Anting dengan PCA

Analisis Multivariat dengan menggunakan metode PCA (*Principal Component Analysis*) dilakukan dengan menggunakan web *MetaboAnalyst 5.0*. Analisis dilakukan dengan membuka web *MetaboAnalyst 5.0* kemudian data AUC dari *Microsoft Excel* yang telah didapatkan pada *Image J* diinput dalam bentuk

csv. Caranya yakni dengan memilih menu “*Statistical Analysis (one factor)*” yang kemudian diunggah pada menu “*A plain txt file*” dengan format “*sample in columns*” dan disubmit. Selanjutnya dilakukan tahap “*normalize*” dan di “*process*” hingga muncul beberapa opsi data yang ingin di tampilkan. Pada opsi tersebut di klik pada pilihan PCA. Selanjutnya akan muncul data berupa score plot yang menunjukkan nilai PC yang di hasilkan. Tahap selanjutnya yakni untuk mengetahui visualisasi dari data PCA dilakukan dengan menekan opsi heatmap yang kemudian akan menunjukkan matriks untuk membantu mengkomunikasikan data hasil PCA dengan pola warna.

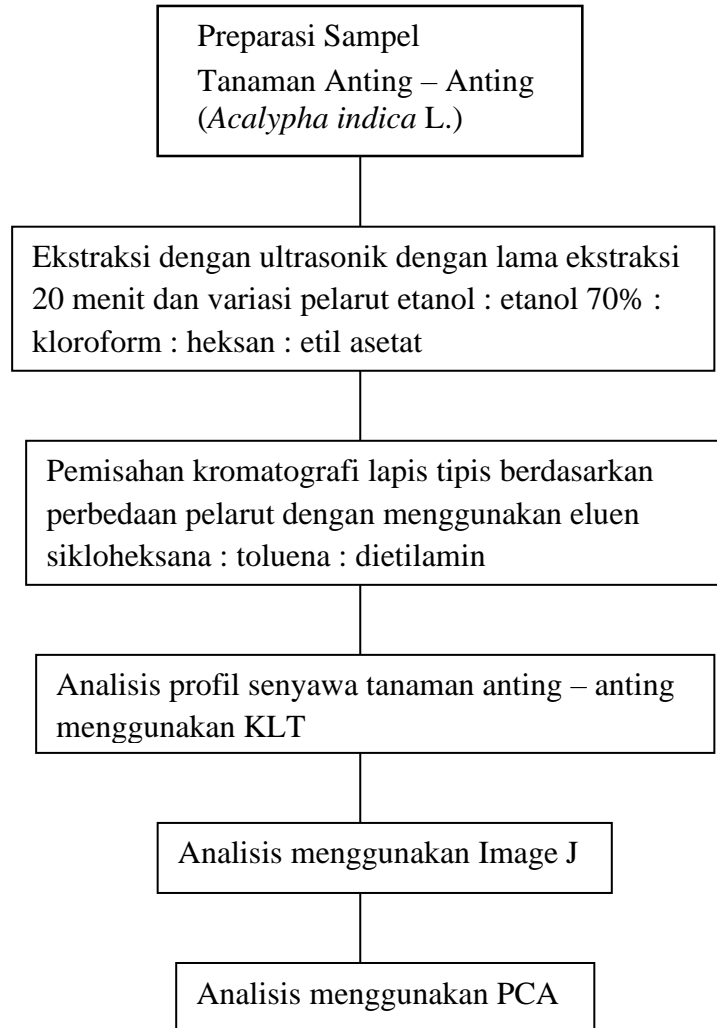
### **3.6 Analisis Data**

Pada analisis data ini dilakukan identifikasi KLT untuk mengetahui pola kromatogram dengan mengamati spot dan intensitas warna pada plat yang diamati dibawah sinar UV 366 nm. Kemudian hasil KLT diolah menggunakan software Image J untuk mengetahui parameter besarnya intensitas (AU) dan luas area (AUC). Dengan pemberian tanda pada gambar plat KLT, gambar pita KLT, proses smoothing pada gambar mentah plat KLT untuk memperhalus densitogram sehingga diperoleh nilai AU dan AUC.

Kemudian dilakukan analisis multivariat menggunakan data AUC dengan analisis Principal Component Analysis (PCA). Dimana untuk mengetahui pengelompokkan yang terbentuk pada tiap masing-masing sampel dari tiap variasi pelarut yang berbeda dengan membentuk data menjadi lebih sederhana.

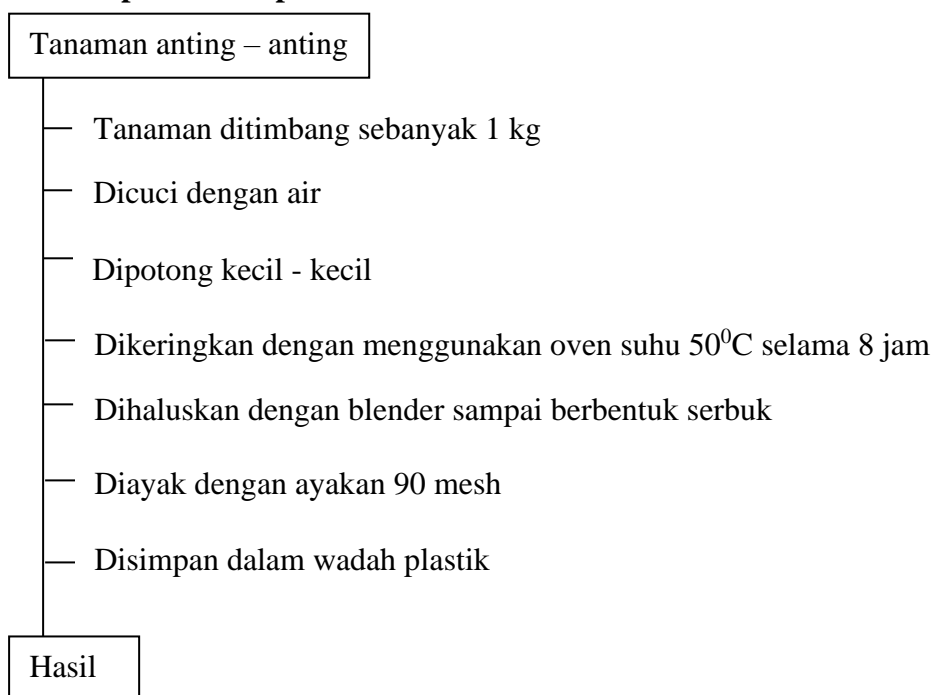
## LAMPIRAN

### 1. Rancangan Penelitian

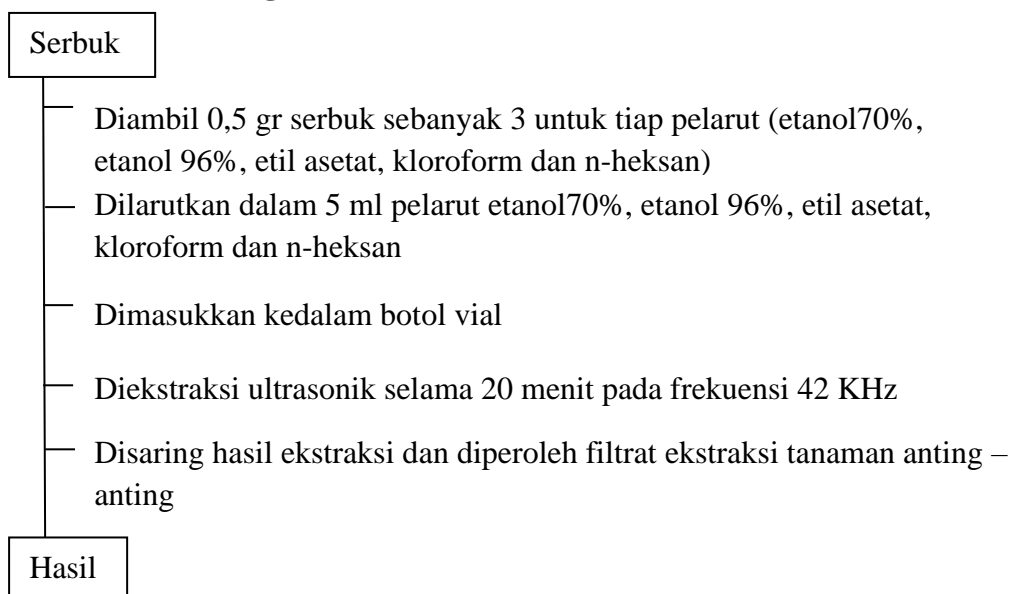


## 2. Diagram Alir

### 2.1 Preparasi Sampel



### 2.2 Ekstraksi dengan Ultrasonik



## 2.3 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLT

### 2.3.1 Persiapan Plat KLT

Plat Silika G<sub>60</sub>F<sub>254</sub>

- Dibentuk ukuran 8 x 10 cm
- Diberi garis pada tepi bawah dengan jarak 1 cm
- Diaktivasi dengan cara di oven pada suhu 105<sup>0</sup>C selama 30 menit

Hasil

### 2.3.2 Persiapan Fase Gerak (Eluen)

Sikloheksana : Toluena : Dietilamin

- Campuran fase gerak dimasukkan ke dalam Chamber (75 : 15 : 10)
- Ditutup rapat
- Dilakukan penjenuhan selama 30 menit

Hasil

### 2.3.3 Proses Elusi

Ekstra

- Ditotolkan menggunakan pipa kapiler sebanyak 7 totolan pada tiap variasi pelarut pada plat
- Dimasukkan kedalam Chamber yang berisi fase gerak yang telah jenuh
- Ditutup rapat
- Dielusi dengan fase gerak hingga fase geraknya mencapai 8 cm
- Diangkat dan dikeringanginkan
- Didokumentasi

Hasil

## 2.4 Pengolahan Plat KLT dengan Image J

### Dokumentasi

- Dibuka aplikasi dengan menekan “File”
- Diklik “Open” dan dipilih gambar yang diinginkan
- Ditandai gambar KLT dengan menggunakan icon berbentuk kotak (Rectangular)
- Dipilih menu “Analyze”, “Gels” dan “Select first line”
- Dipilih icon “Scrolling tool” dan digeser menggunakan tanda panah untuk bagian selanjutnya
- Dipilih kembali menu “Analyze”, “Gels” dan “Select next line”
- Dipilih “Analyze”, “Gels”, “Plot Lanes”
- Dibuat baseline pada kromatogram yang dihasilkan menggunakan icon bentuk garis “Straight” dan di klik icon tongkat “Wand tool” pada daerah puncak
- Dihasilkan nilai AUC

### Hasil

## 2.5 Klasifikasi Sampel dengan PCA

### Data Image J

- Dimasukkan nilai AUC kedalam Excel
- Dianalisis hasil interpretasi dari metode PCA dengan bantuan orange
- Dibuka software orange
- Ditarik widget “File” kemudian klik 2 kali untuk membuka dan di pilih yang akan digunakan
- Ditarik garis dari widget “File”
- Dipilih “Preprocess spectra” klik 2 kali “Add Preprocessor”. “Normalize spectra”, “Final Preview” dan klik “Commit Automatically” pada tahap preprocessing
- Ditarik garis dari widget “Preprocessor spectra” dan dipilih “Spectra” klik 2 kali untuk melihat spektra dari nilai AUC
- Ditarik garis widget “Spectra” dan pilih “PCA”
- Ditarik garis pilih “Score Plot” klik 2 kali untuk melihat interpretasinya

### Hasil

**3. Perhitungan**  
**Pembuatan eluen Sikloheksana, Toluena dan Dietilamin dengan perbandingan (75:15:10)**

Dibuat 10 ml pelarut

$$\text{Volume Sikloheksana} : \frac{75}{100} \times 10 \text{ ml} = 7,5 \text{ ml}$$

$$\text{Volume Toluena} : \frac{15}{100} \times 10 \text{ ml} = 1,5 \text{ ml}$$

$$\text{Volume Dietilamin} : \frac{10}{100} \times 10 \text{ ml} = 1 \text{ ml}$$



#### 4. Data Pemisahan Menggunakan KLT

pelarut	Nilai Rf												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Etanol 70% 1	0.13	0.16	-	0.3	0.4	-	-	0.6	0.68	0.75	0.85	-	-
Etanol 70% 2	0.14	0.16	-	0.31	0.41	-	-	0.6	0.68	0.74	0.84	-	-
Etanol 70% 3	0.14	0.18	-	0.31	0.41	-	-	0.6	0.68	0.75	0.85	-	-
Etanol 96% 1	0.13	-	0.24	0.33	-	0.46	0.55	-	0.65	0.75	0.85	-	0.94
Etanol 96% 2	0.12	-	0.24	0.33	-	0.46	0.54	-	0.68	0.74	0.84	-	0.95
Etanol 96% 3	0.13	-	0.24	0.33	-	0.46	0.54	-	0.68	0.73	0.84	-	0.95
Etil asetat 1	0.11	-	0.21	0.3	-	0.45	0.54	0.66	0.75	-	0.83	0.85	0.94
Etil asetat 2	0.11	-	0.23	0.3	-	0.45	0.55	0.66	0.75	-	0.83	0.85	0.93
Etil asetat 3	0.11	-	0.23	0.31	-	0.46	0.56	0.7	0.75	-	0.84	0.86	0.94
Klorofom 1	0.1	-	0.2	0.29	-	0.44	0.5	-	0.65	0.7	0.8	-	0.94
Klorofom 2	0.1	-	0.2	0.28	-	0.43	0.49	-	0.65	0.7	0.8	-	0.95
Klorofom 3	0.11	-	0.2	0.28	-	0.44	0.5	-	0.65	0.7	0.8	-	0.95
N-heksan 1	0.13	-	-	0.33	-	0.53	0.63	0.7	-	0.83	-	0.89	-
N-heksan 2	0.13	-	-	0.31	-	0.53	0.61	0.7	-	0.83	-	0.9	-
N-heksan 3	0.13	-	-	0.31	-	0.53	0.61	0.7	-	0.83	-	0.9	-

## 5. Dokumentasi Penelitian

### 5.1 Ekstraksi Tumbuhan Anting-Anting (*Acalypha indica* L.)



Penimbangan serbuk tanaman anting-anting



Proses ekstraksi



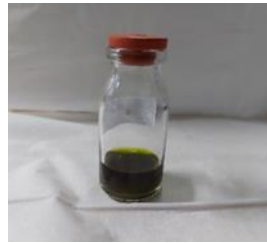
Penyaringan



Filtrat ekstrak etanol 70%



Filtrat ekstrak etanol 96%



Filtrat ekstrak etil asetat



Filtrat ekstrak kloroform



Filtrat ekstrak n-heksan

## 5.2 Proses KLT



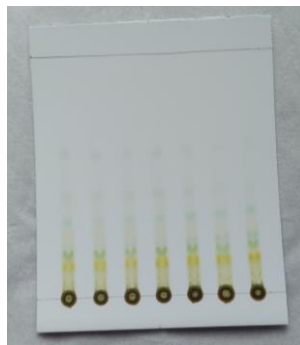
persiapan plat KLT



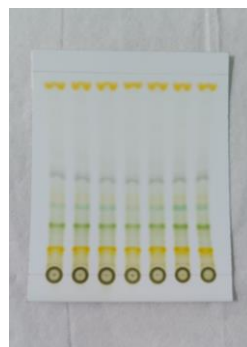
Proses penotolan sampel pada plat KLT



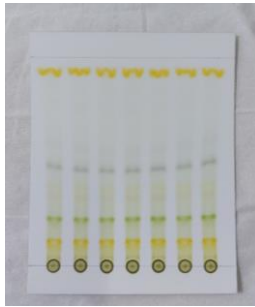
Pengulsian plat silika KLT dalam eluen



Etanol 70% setelah di elusi



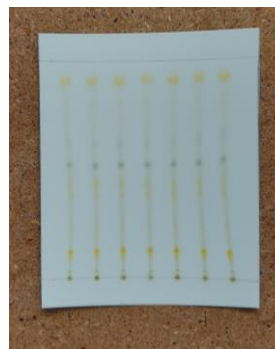
Etanol 96% setelah di elusi



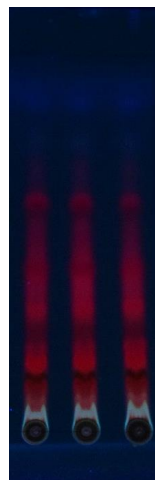
Etil asetat setelah di elusi



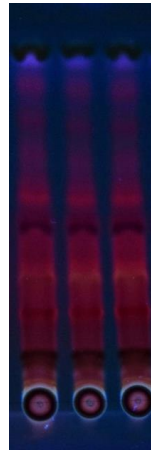
Kloroform setelah di elusi



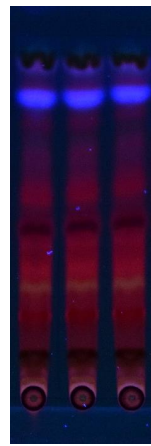
N-heksan setelah di elusi



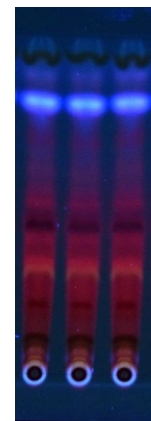
Etanol 70% hasil KLT



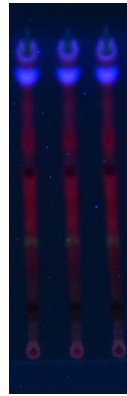
Etanol 96% hasil KLT



Etil asetat hasil KLT



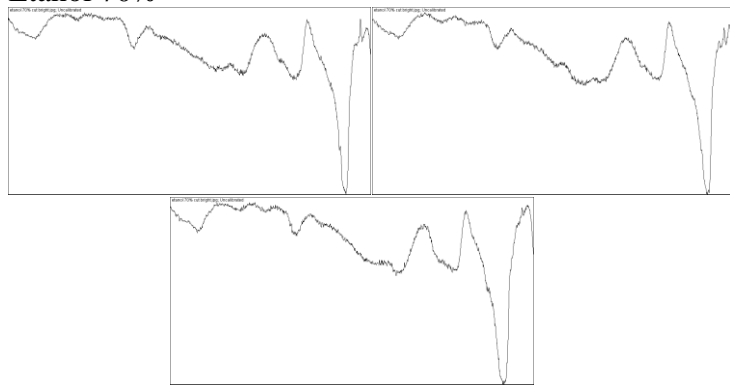
Kloroform hasil KLT



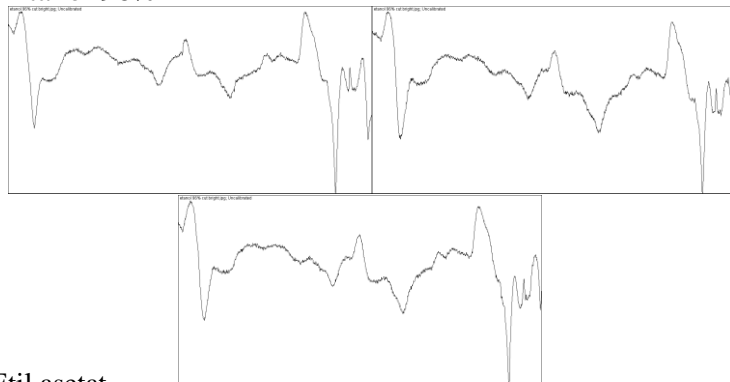
N-heksan hasil KLT

### 5.3 Hasil Image J

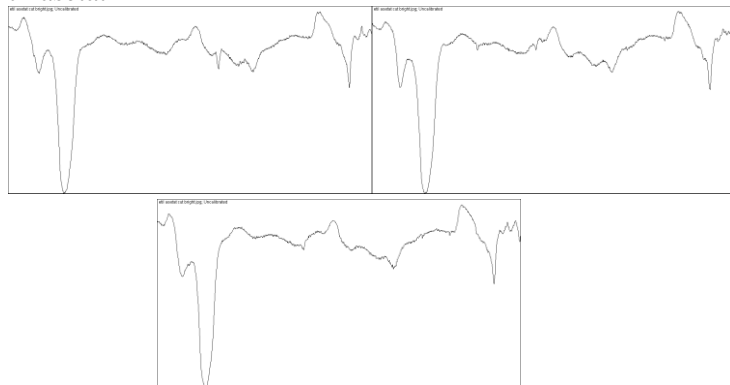
#### 1. Etanol 70%



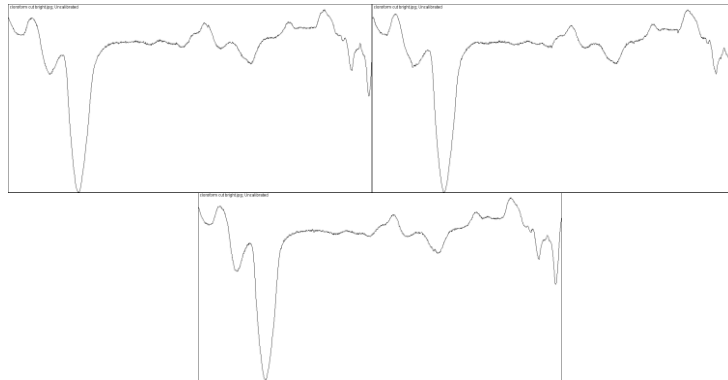
#### 2. Etanol 96%



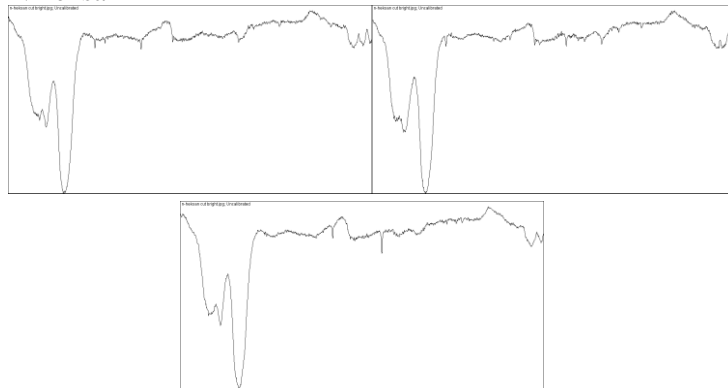
#### 3. Etil asetat



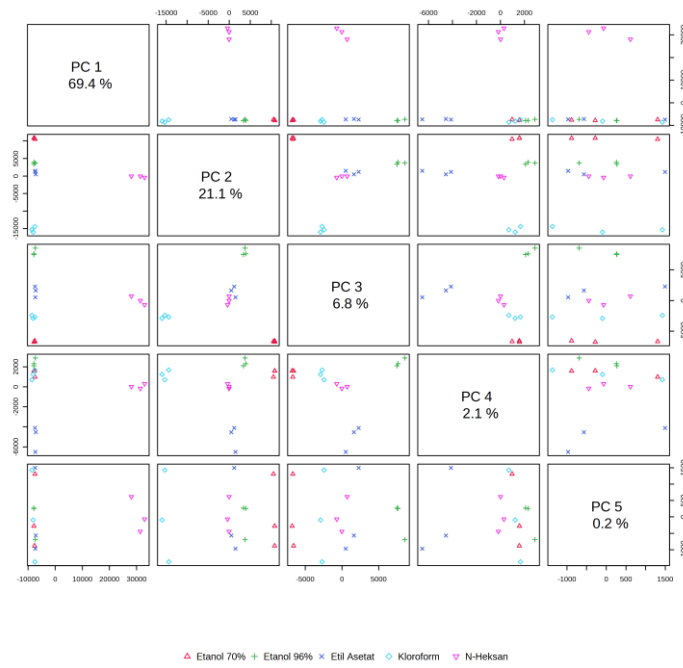
4. Kloroform



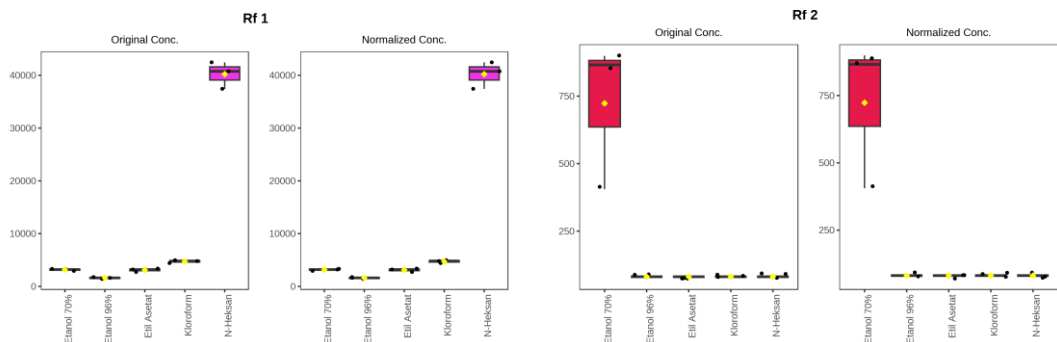
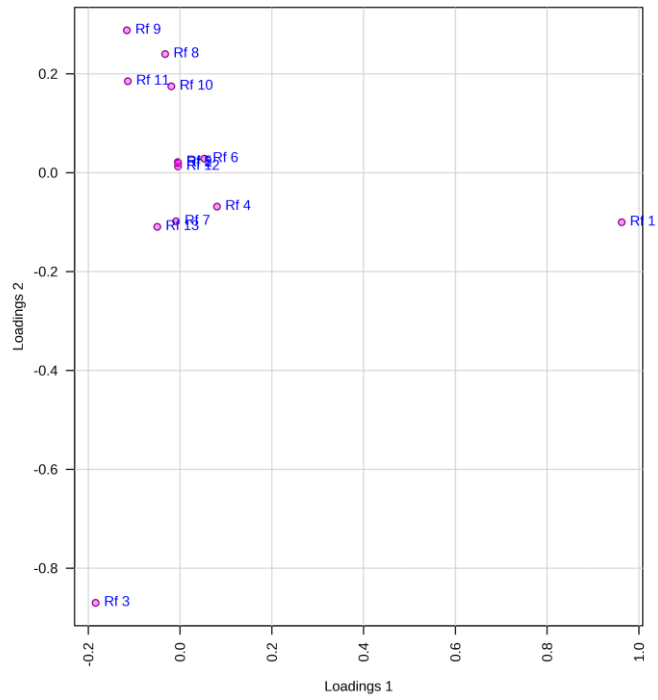
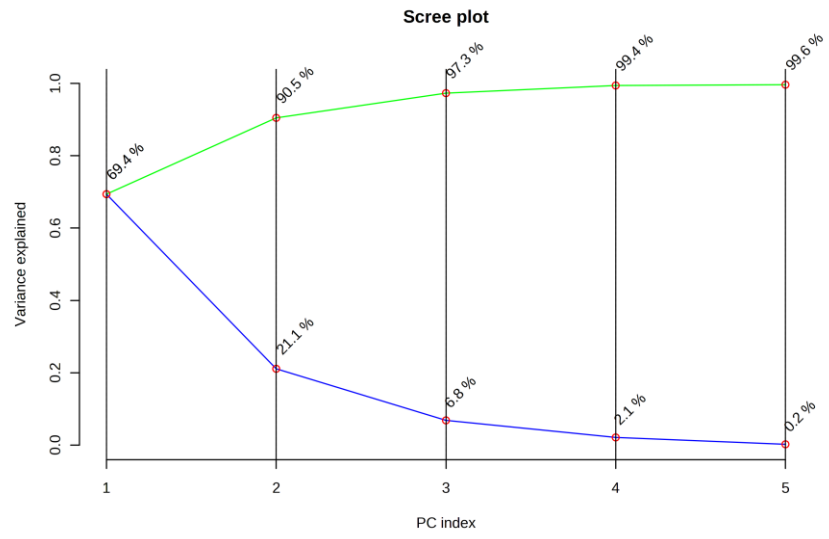
5. N-heksan



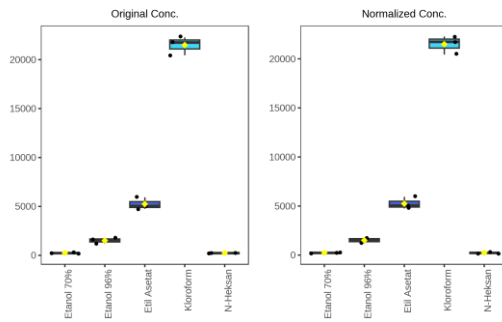
5.4 Hasil Analisis PCA Dengan *MetaboAnalyst 5.0*



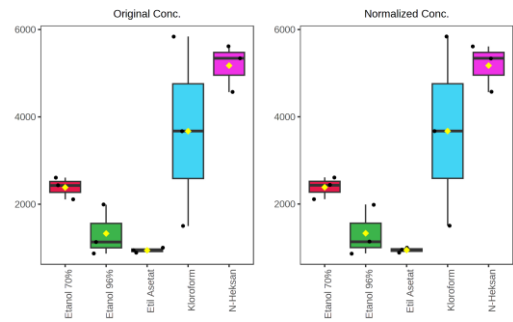




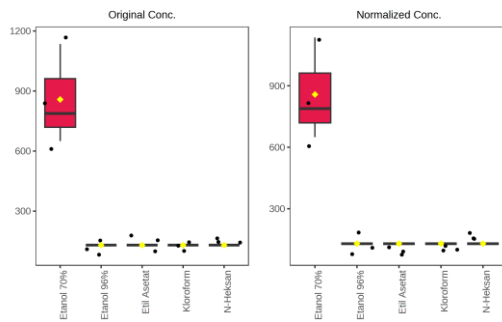
Rf 3



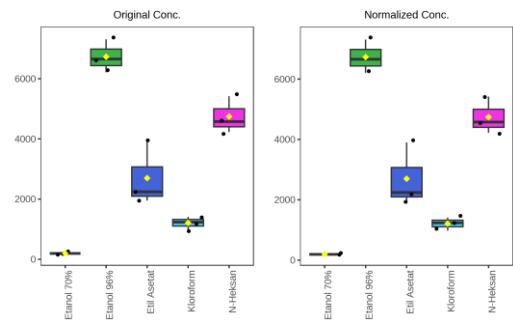
Rf 4



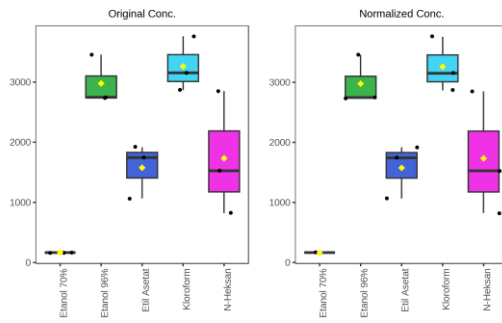
Rf 5



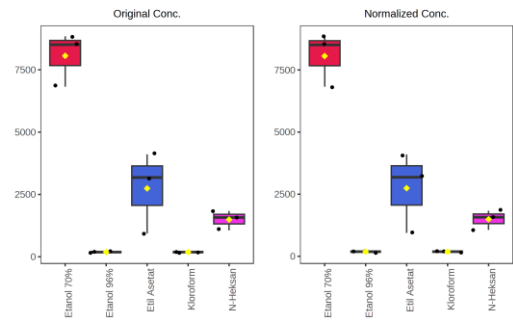
Rf 6



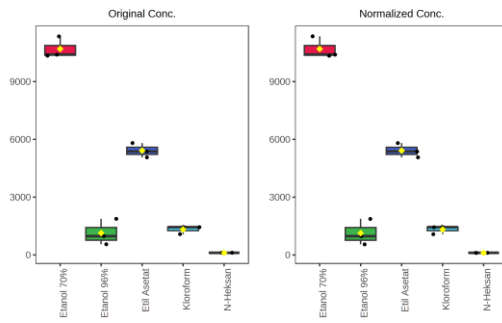
Rf 7



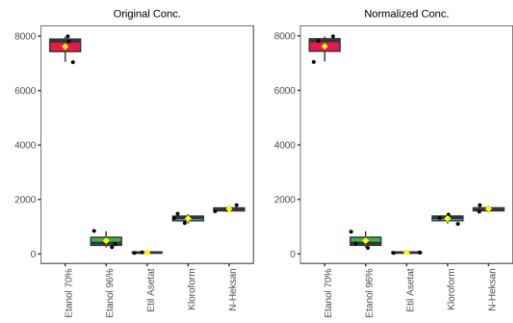
Rf 8



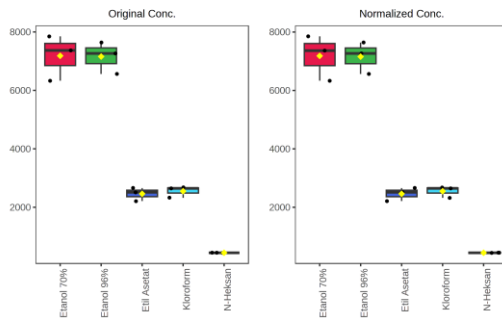
Rf 9



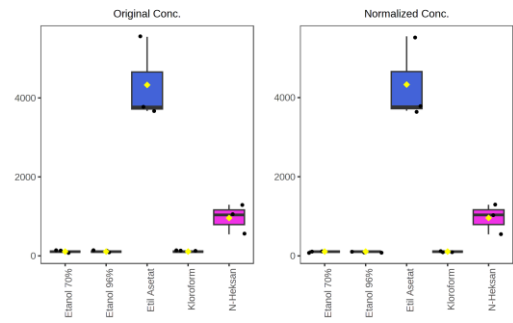
Rf 10



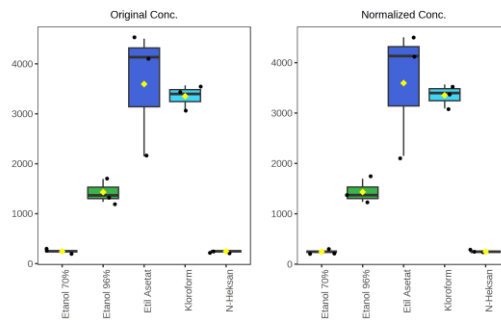
Rf 11



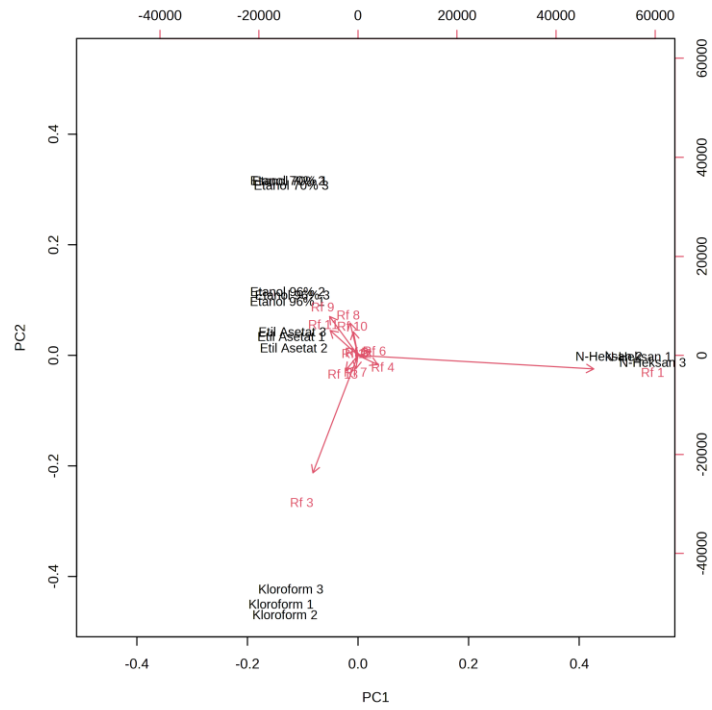
Rf 12



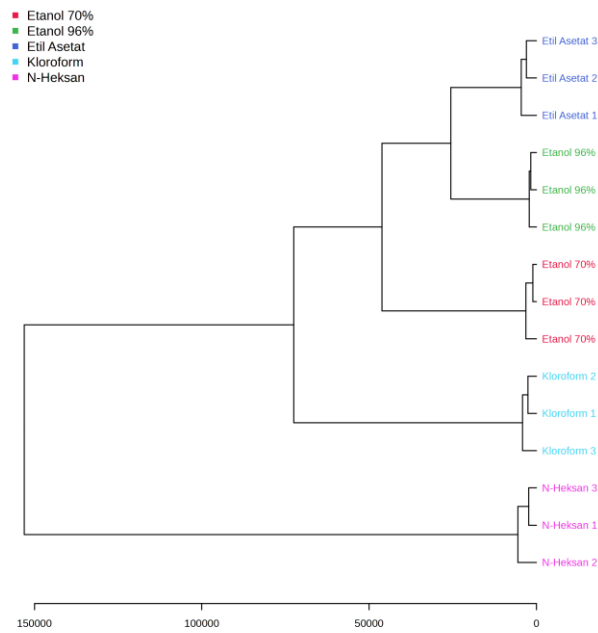
Rf 13



Biplot

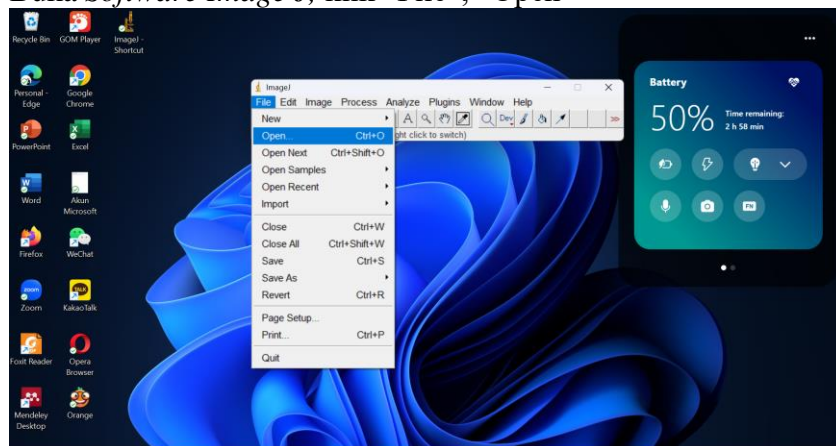


Dendrogram

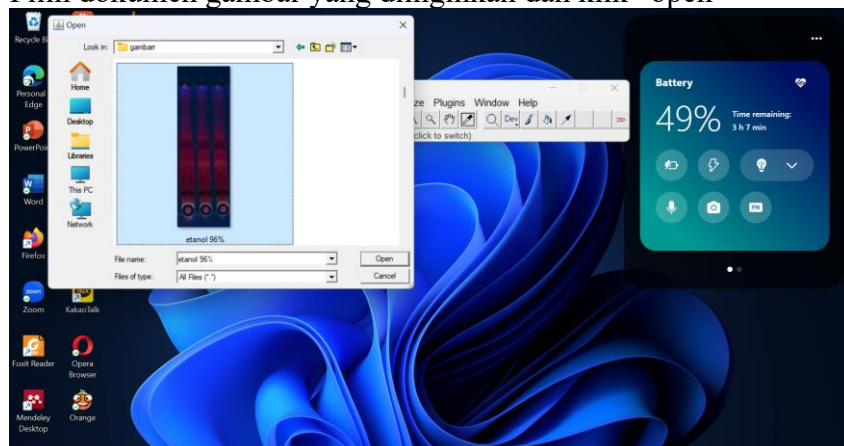


## 5.5 Tahapan Pengolahan Data dengan *Software Image J*

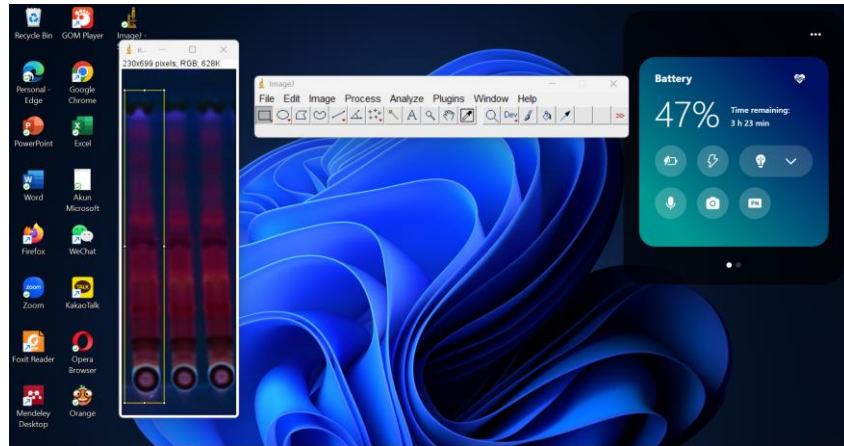
a. Buka *Software Image J*, klik “File”, “Open”



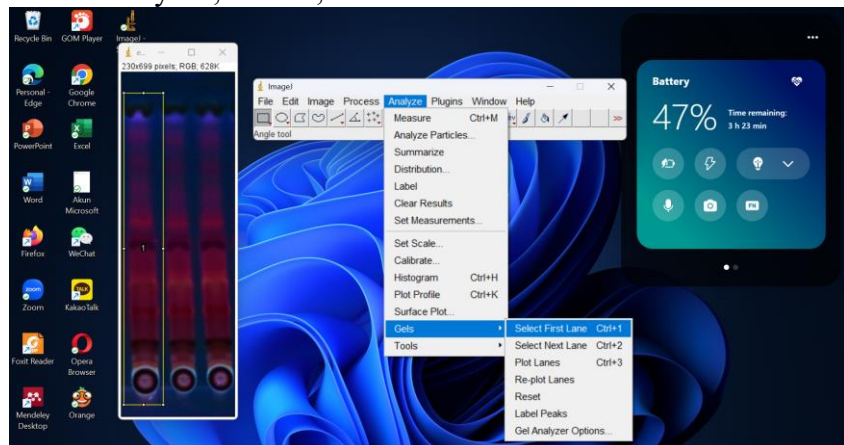
b. Pilih dokumen gambar yang diinginkan dan klik “open”



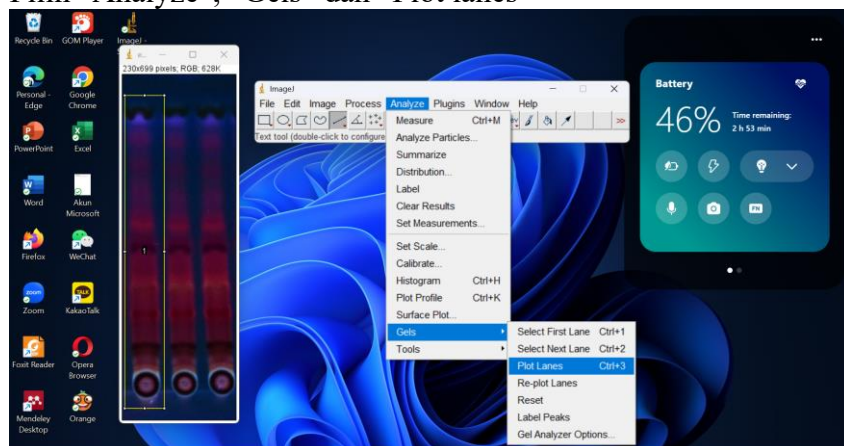
- c. Pilih icon kotak “Rectangular” dan sesuaikan dengan pita yang akan diolah



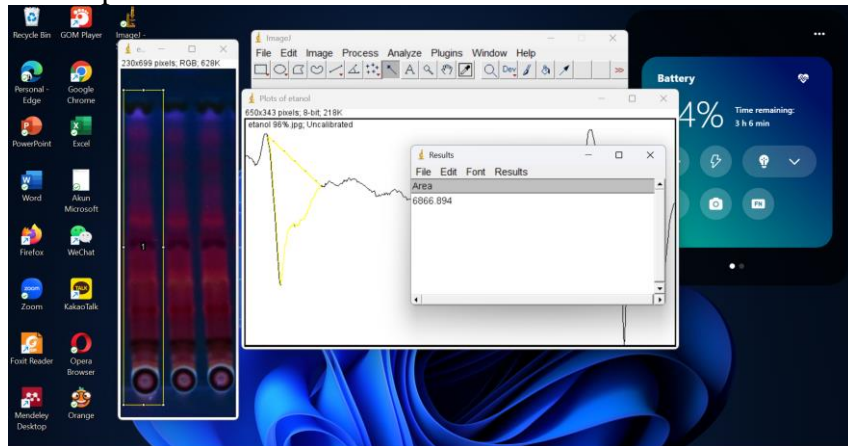
- d. Pilih “Analyze”, “Gels”, and “Select first lane”



- e. Pilih “Analyze”, “Gels” dan “Plot lanes”



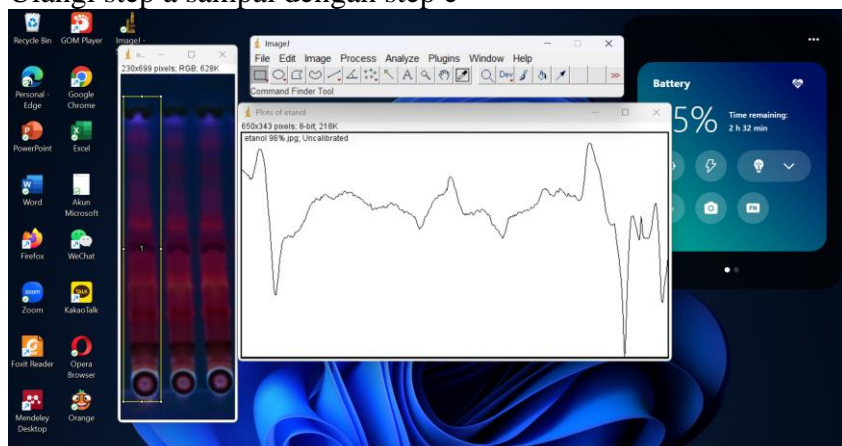
- f. Buat *Baseline* menggunakan icon berbentuk garis “*Straight*” kemudian menekan *icon* berbentuk tongkat “*Wand tool*” pada daerah puncak tersebut



- g. Pindahkan nilai AUC ( *Area Under Curve*) ke file Microsoft Excel

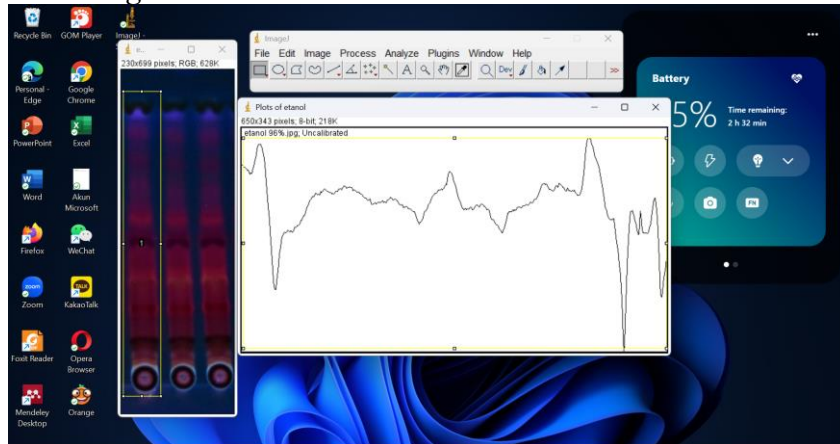
Compound	Etanol 90%	Etanol 90%	Etanol 90%	Etanol 70%	Etanol 70%	Etanol 70%	Kloroform	Kloroform	Kloroform	Etil Asetat	Etil Asetat	Etil Asetat	N-Heksan	N-Heksan	N-Heksan
Group	Etanol 90%	Etanol 90%	Etanol 90%	Etanol 70%	Etanol 70%	Etanol 70%	Kloroform	Kloroform	Kloroform	Etil Asetat	Etil Asetat	Etil Asetat	N-Heksan	N-Heksan	N-Heksan
RF 1	1426.146	1617.782	1770.024	3207.58	2939.823	3228.258	4422.187	4793.087	4965.288	2739.69	3380.69	3202.347	40754.44	37436.47	42453.36
RF 2	0	0	0	405.577	865.669	898.79	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RF 3	1789.61	1559.903	1169.66	0	0	0	21746.46	22278.39	20441.49	4747.501	5933.966	5040.865	0	0	0
RF 4	1134.761	866.74	1986.945	2610.761	2430.983	2111.497	1502.51	3673.936	5841.25	884.983	946.761	1000.054	5340.706	4568.827	5613.605
RF 5	0	0	0	649.64	788.317	1135.723	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RF 6	8214.631	6656.439	7310.853	0	0	0	1412.933	974.368	1235.761	2238.589	3900.693	1951.966	5423.907	4577.886	4225.137
RF 7	2729.116	2744.631	3457.459	0	0	0	3760.175	2866.397	3151.761	1066.225	1917.51	1743.095	822.648	2850.137	1524.782
RF 8	0	0	0	8842.238	8513.116	6825.095	0	0	0	937.347	3183.853	4105.631	1834.53	1061.489	1573.388
RF 9	976.196	1873.53	551.861	10339.6	10396.84	11347.53	1451.66	1079.518	1440.832	5067.049	5371.463	5808.927	0	0	0
RF 10	827.912	235.284	395.577	7055.468	7811.217	7973.489	1458.803	1117.53	1318.51	0	0	0	1556.054	1774.347	1607.104
RF 11	6565.146	7642.752	7266.217	7850.167	7396.267	6331.651	3324.489	2646.903	2678.551	2511.773	2657.702	2210.317	0	0	0
RF 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3671.468	3767.882	5548.329	1292.539	1038.075	546.276
RF 13	1693.891	1368.355	1236.113	0	0	0	3568.347	3398.933	3089.518	2148.548	4133.175	4503.296	0	0	0

- h. Ulangi step a sampai dengan step e

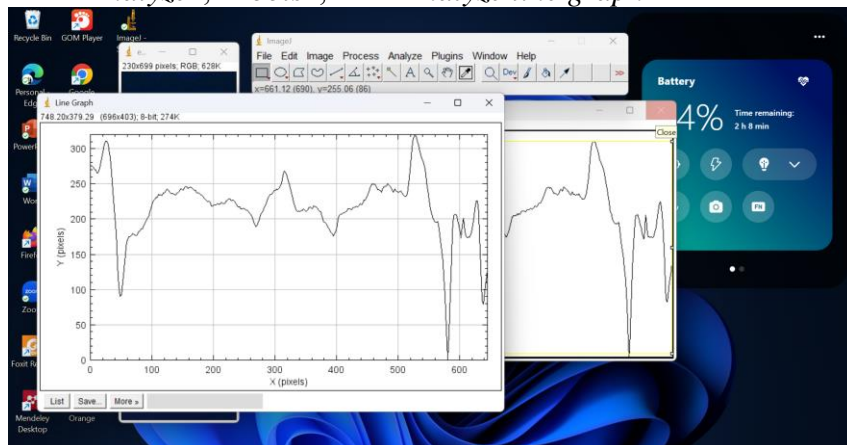




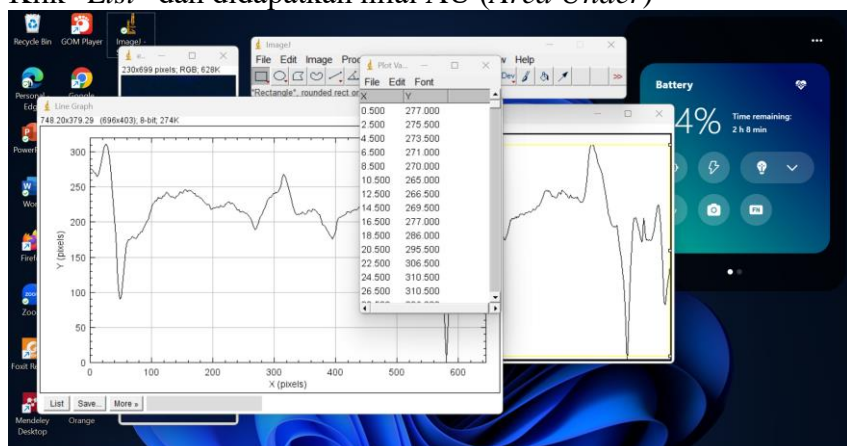
- i. Blok seluruh densitogram dengan menggunakan icon “*Rectangular*”



- j. Klik “*Analyze*”, “*Tools*”, dan “*Analyze line graph*”



- k. Klik “*List*” dan didapatkan nilai AU (*Area Under*)

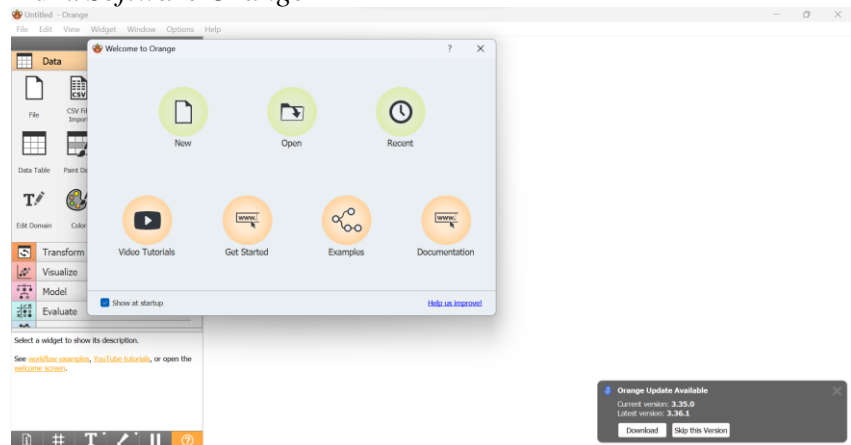


## 1. Pindahkan nilai AU (Area Under) ke dalam Microsoft Office

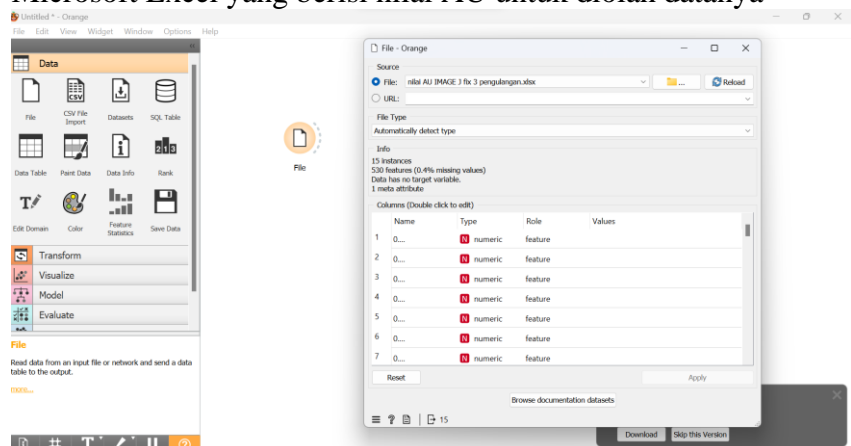
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1		0.00047	0.00236	0.00425	0.00614	0.00803	0.00992	0.01181	0.0137	0.01559	0.01748	0.01937	0.02126	0.02315	0.02504	0.02692	0.02881	0.0307
2	Etanol 96% 1	483.5	481	477	471.5	472	465	470.5	479.5	483	494.5	494	505.5	513	524	526	526	527
3	Etanol 96% 2	450.5	449	442.5	446	453	459	468	478	489.5	500.5	511	521	525.5	525	524	522	515.5
4	Etanol 96% 3	451.5	446.5	447.5	457	462	475	479	489.5	499.5	508.5	513	519	518.5	525	523	521.5	511.5
5	Etanol 70% 1	509.5	508.5	504	501.5	500	499	495.5	489	485.5	479.5	477	480.5	481	480.5	474.5	471	472.5
6	Etanol 70% 2	505	507.5	503.5	499	495.5	499.5	498.5	492	486	489.5	488.5	486.5	484	480.5	477.5	480	479
7	Etanol 70% 3	512.5	505.5	504	502	503	501	493.5	487	492	490	493	488	479	479.5	481	480	476.5
8	kloroform 1	494.5	489.5	485.5	480	477	472.5	467.5	465	460.5	458.5	457	454	452.5	452	451.5	451.5	450.5
9	kloroform 2	505.5	507	503.5	496.5	491.5	484	480.5	478.5	473	470.5	467.5	463.5	462.5	462	458	457.5	458.5
10	kloroform 3	488.5	481	474.5	469.5	465.5	462.5	459	456.5	453.5	450.5	449.5	449.5	446.5	447.5	446	447.5	447.5
11	Etil Asetat 1	486.5	485.5	484.5	484	484.5	485	481.5	480	477.5	477.5	475.5	475	477.5	478	481.5	485	487.5
12	Etil Asetat 2	487	486.5	485.5	484	480.5	479.5	478.5	477.5	477.5	479	477	480	482	484.5	490	493	496.5
13	Etil Asetat 3	479	479.5	478	477	472.5	473.5	469	469	468.5	468	468	474	479	482	486.5	493.5	500.5
14	N-heksan 1	495.5	497	494	491	488.5	485.5	483	472.5	471	466.5	463.5	458.5	458	453	455.5	451	449
15	N-heksan 2	504	496.5	496.5	496.5	490.5	489.5	488.5	483.5	482	475.5	468.5	463	462.5	455	457	453	452
16	N-heksan 3	504	496.5	496.5	496.5	490.5	489.5	488.5	483.5	482	475.5	468.5	463	462.5	455	457	453	452

## 5.6 Tahapan Pengolahan Data dengan Software Orange

### a. Buka Software Orange

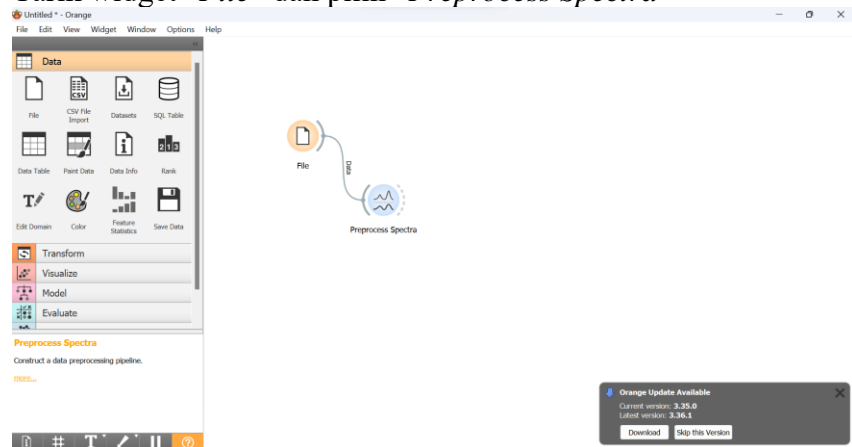


### b. Pilih icon "File", klik dua kali dan pilih file berbentuk Microsoft Excel yang berisi nilai AU untuk diolah datanya

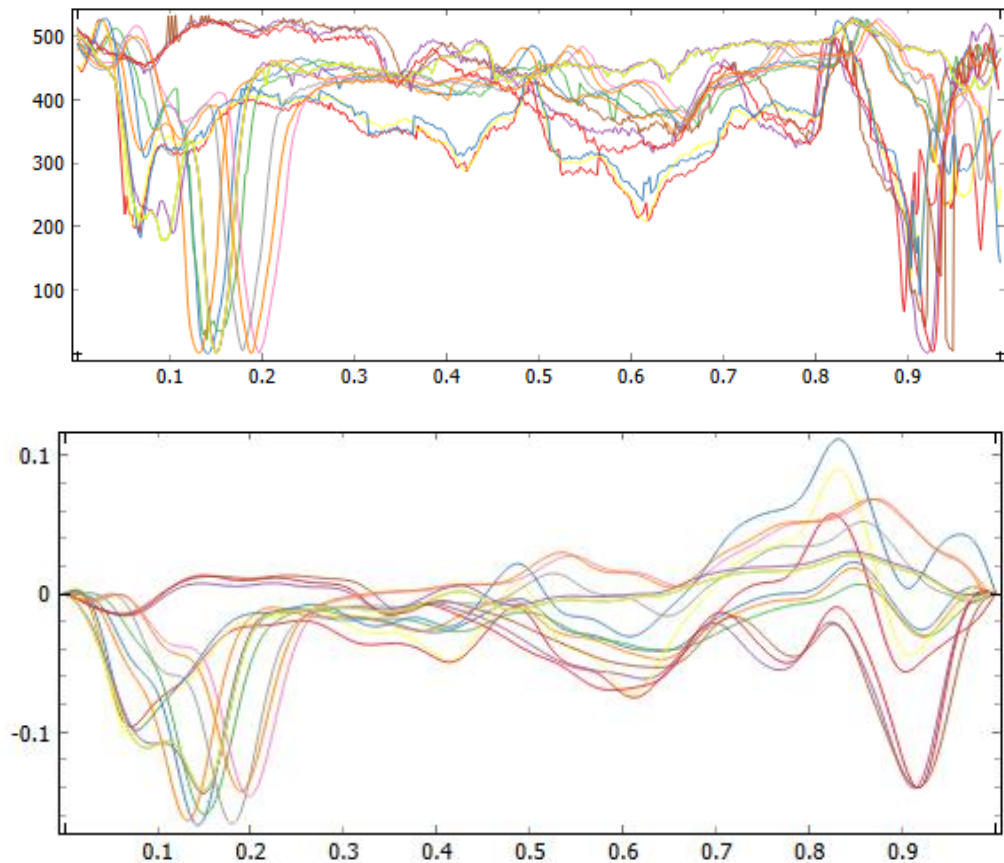




c. Tarik widget “File” dan pilih “Preprocess Spectra”

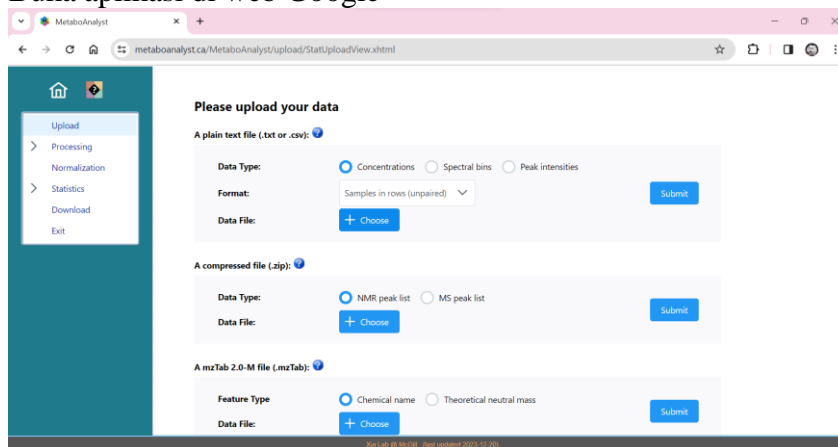


d. Klik “Add preprocessor”, “Gaussian smoothing”, “Normalize spectra”, dan klik “Baseline correction”

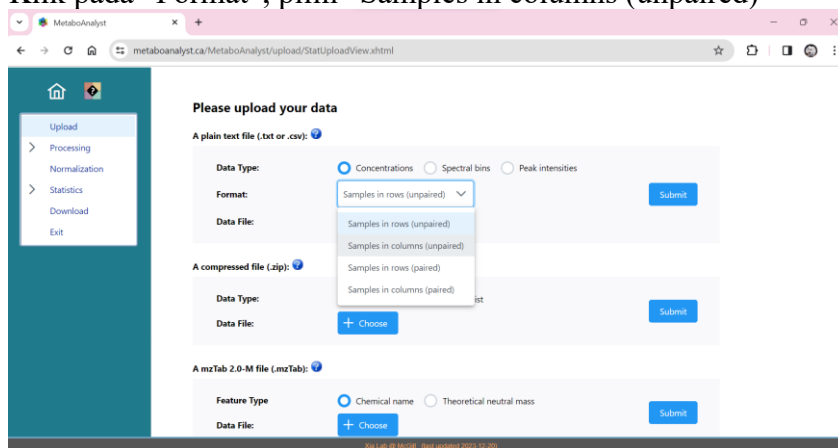


## 5.7 Tahap Pengolahan Data dengan Menggunakan *Metaboanalyst* 0.5

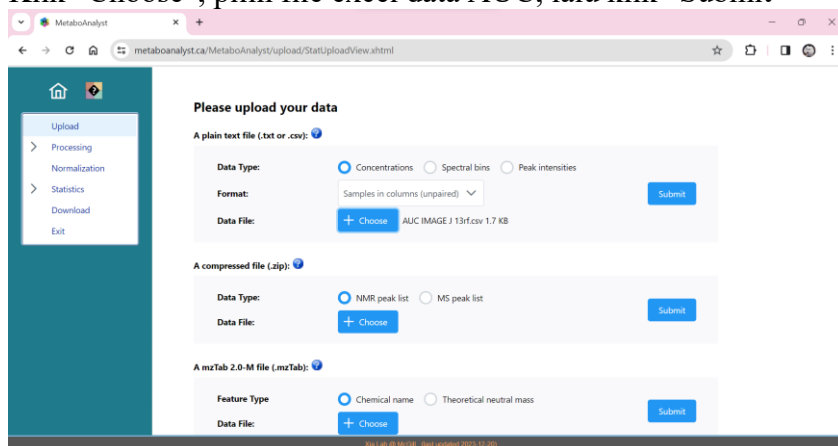
a. Buka aplikasi di web Google



b. Klik pada “Format”, pilih “Samples in columns (unpaired)”



c. Klik “Choose”, pilih file excel data AUC, lalu klik “Submit”



## d. Klik "Proceed"

4. The presence of missing values or features with constant values (i.e. all zeros).

**Data processing information:**

Checking data content ...passed.  
 Samples are in columns and features in rows.  
 The uploaded file is in comma separated values (csv) format.  
 The uploaded data file contains 15 (samples) by 13 (compounds) data matrix.  
 Samples are not paired.  
 5 groups were detected in samples.  
 Only English letters, numbers, underscore, hyphen and forward slash (/) are allowed.  
 Other special characters or punctuations (if any) will be stripped off.  
 All data values are numeric.  
 A total of 0 (0%) missing values were detected.  
 By default, missing values will be replaced by 1/5 of min positive values of their corresponding variables.  
 Click the **Proceed** button if you accept the default practice.  
 Or click the **Missing Values** button to use other methods.

Buttons: Edit Groups, Missing Values, Proceed

## e. Klik "Normalize"

Buttons: Normalize, View Result, Proceed

## f. Klik "Proceed"

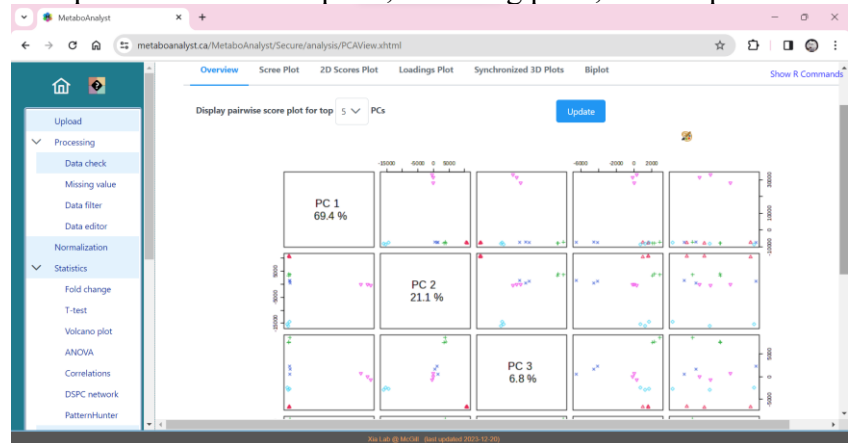
OK  
 You can click View Result button to view the effect, or Proceed button to analysis page!

Buttons: Normalize, View Result, Proceed

## g. Klik “Principal Component Analysis (PCA)”

The screenshot shows the MetaboAnalyst web interface. On the left is a navigation menu with options: Upload, Processing (Data check, Missing value, Data filter, Data editor), Normalization, Statistics (Fold change, T-test, Volcano plot, ANOVA, Correlations, DSPC network, PatternHunter), Download, and Exit. The main content area is titled "Chemometrics Analysis" and lists several methods: Significance Analysis of Microarray (and Metabolites) (SAM), Empirical Bayesian Analysis of Microarray (and Metabolites) (EBAM), Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares - Discriminant Analysis (PLS-DA), Sparse Partial Least Squares - Discriminant Analysis (sPLS-DA), and Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis (orthoPLS-DA). A blue box contains a note: "This is mainly designed for better interpretation in comparison of two groups (control vs treatment). For multi-group design, the recommended approach is to compare each treatment group with the control group. You can use Data Editor -> Edit Groups to achieve this." Below this, there are sections for "Cluster Analysis" (Hierarchical Clustering, Dendrogram, Heatmaps; Partitional Clustering: K-means, Self-Organizing Map (SOM)) and "Classification & Feature Selection" (Random Forest, Support Vector Machine (SVM)).

## h. Didapatkan data “Scree plot”, “Loading plot”, dan “Biplot”



## i. Klik “Heatmap”

