

MODEL OTENTIKASI KOMPOSISI OBAT BAHAN ALAM BERDASARKAN SPEKTRA INFRAMERAH DAN KOMPONEN UTAMA STUDI KASUS : OBAT BAHAN ALAM/FITOFARMAKA PENURUN TEKANAN DARAH

Agus Mohamad Soleh¹, Latifah K. Darusman² dan Mohamad Rafi²

¹Departemen Statistika FMIPA IPB

²Pusat Studi Biofarmaka, LPPM-IPB

Email :

¹agusms@ipb.ac.id / amsstk@yahoo.com

Abstrak

Komposisi kimia yang terkandung dalam ekstrak obat bahan alam merupakan suatu komposisi yang kompleks, dengan demikian pengujian keotentikannya tidak dapat dilakukan melalui pendekatan tunggal. Salah satu teknik analisis yang dapat menggambarkan secara menyeluruh karakteristik kimia suatu bahan adalah teknik spektroskopi FTIR. Spektra FTIR dihasilkan dari interaksi antara energi sinar inframerah dan komponen kimia penyusun campuran bahan, sehingga suatu spektra FTIR merupakan identitas khas campuran tersebut. Keotentikan komposisi suatu obat bahan alam pada studi ini ditentukan berdasarkan pada analisis komponen utama spektra inframerahnya. Studi dilakukan pada obat bahan alam/fitofarmaka penurun tekanan darah (Tensigard® : terdiri dari ekstrak seledri dan ekstrak daun kumis kucing). Pengukuran spektra inframerah dilakukan terhadap formula obat yang persentase komposisinya ditentukan melalui simplex lattice design. Selain itu pengukuran spektra inframerah juga dilakukan terhadap formula obat dengan mengganti (adulterasi) ekstrak kumis kucing dengan obat sintetis (reserpin) dan ekstrak sambiloto. Berdasarkan plot antara skor komponen utama pertama dan skor komponen utama kedua menunjukkan plot tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi komposisi obat, tetapi tidak dapat mendeteksi adanya adulterasi komposisi oleh bahan lain.

Kata Kunci : model otentikasi fitofarmaka, simplex lattice design, komponen utama, tensigard®

PENDAHULUAN

Komposisi kimia yang terkandung dalam ekstrak obat bahan alam merupakan suatu komposisi yang kompleks. Pengujian keotentikannya tidak dapat dilakukan melalui pendekatan tunggal (misalnya dengan ada tidaknya senyawa penanda). Salah satu teknik analisis yang dapat menggambarkan secara menyeluruh karakteristik kimia suatu bahan adalah teknik spektroskopi FTIR yang menghasilkan spektra FTIR. Spektra FTIR dihasilkan dari interaksi antara energi sinar inframerah dan komponen kimia penyusun campuran bahan, sehingga suatu spektra FTIR merupakan identitas khas campuran tersebut.

Penggunaan teknik spektroskopi FTIR yang dikombinasikan dengan teknik kemometrik sebagai

metode kontrol kualitas sediaan obat herbal di Indonesia masih terbatas. Jajang (2004) mencoba menerapkan metode kemometrik jaringan syaraf tiruan dan teknik spektroskopi FTIR untuk mengklasifikasikan berbagai ekstrak jati belanda berdasarkan aktivitas inhibisinya terhadap enzim lipase. Akan tetapi, potensi spektra FTIR sebagai penanda *metabolome* suatu bahan telah banyak digali, seperti yang dilakukan oleh Sim *et al.* (2004) yang mengkaitkan metode FTIR dan kemometrik untuk menentukan asal geografis dari teh atau Kirschner *et al* (2001) yang menggunakan teknik FTIR untuk mengklasifikasi dan identifikasi *Enterococci*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan model otentikasi komposisi penyusun obat bahan alam. Keotentikan komposisi suatu obat bahan alam

ditentukan berdasarkan pada analisis komponen utama (PCA) spektra inframerahnya. Untuk contoh model otentikasi, analisis komponen utama akan dilakukan terhadap spektra inframerah formula atau penyusun formula obat bahan alam/fitofarmaka penurun tekanan darah (Tensigard[®], terdiri dari ekstrak seledri, ekstrak daun kumis kucing, dan bahan pengisi).

Tujuan

Penelitian ini bertujuan mengembangkan model otentikasi komposisi penyusun fitofarmaka Tensigard (ekstrak seledri, kumis kucing, dan bahan pengisi). Model yang dikembangkan didasarkan pada interpretasi spektra FTIR dengan metode kemometrik.

TINJAUAN PUSTAKA

Spektroskopi Inframerah Transformasi Fourier (FTIR)

Metode spektrofotometer mengukur jumlah radiasi elektromagnetik yang diserap oleh larutan contoh. Jumlah serapan ini berkaitan dengan konsentrasi analit dalam larutan. Terdapat tiga proses dasar penyerapan radiasi oleh molekul yang semuanya melibatkan kenaikan molekul ke tingkat energi yang lebih tinggi, yaitu rotasi, vibrasi, dan transisi elektronik (Christian 1986).

Radiasi IR tidak memiliki cukup energi untuk menyebabkan transisi elektronik. Bila radiasi IR dilewatkan melalui suatu cuplikan, maka molekul akan menyerap energi sehingga terjadi vibrasi. Panjang gelombang serapan oleh suatu ikatan bergantung pada jenis getaran ikatan antar atom. Oleh karena itu, tipe ikatan yang berlainan akan menyerap radiasi IR pada panjang gelombang yang berbeda (Fessenden & Fessenden 1986). Vibrasi yang terjadi meliputi vibrasi ulur dan tekuk dan dikenal beberapa istilah, yaitu *rocking*, *twisting*, *scissoring*, dan *waging* (Hollas 2004).

Daerah radiasi spektroskopi IR berkisar pada bilangan gelombang 12800-10 cm^{-1} . Daerah 1400-4000 cm^{-1} merupakan daerah yang khusus untuk identifikasi gugus-gugus fungsional sedangkan daerah 1500-800 cm^{-1} merupakan daerah sidik jari (*fingerprint region*) (Murad *et al.* 2006). Pada daerah sidik jari, sedikit saja perbedaan struktur dan susunan molekul akan menyebabkan perubahan distribusi puncak serapan.

Spektrum IR diperoleh dengan mengukur intensitas radiasi cahaya sebelum (I_0) dan sesudah (I) melewati contoh. Spektrum IR ditampilkan dengan mengalurkan transmitans ($T=I/I_0$) sebagai fungsi dari bilangan gelombang. Nilai transmitans dapat diganti dengan nilai serapan, yaitu sinar yang

diserap oleh contoh. Serapan pada panjang gelombang tertentu dapat menghasilkan nilai konsentrasi contoh berdasarkan hukum Beer.

Berbeda dari spektrometer klasik, FTIR tidak mengukur panjang gelombang satu demi satu, melainkan dapat mengukur intensitas transmitan pada berbagai panjang gelombang secara serempak (Skoog *et al.* 1998). Monokromator prisma atau *grating* yang dapat mengurangi energi sinar diganti dengan interferometer. Interferometer ini mengatur intensitas sumber sinar inframerah dengan mengubah posisi dari cermin pemantul yang memantulkan sinar dari sumber sinar ke sampel. Jadi, adanya interferometer membuat spektrometer mampu mengukur semua frekuensi optik secara serempak dengan mengukur intensitas dari setiap frekuensi tunggal sebelum sinyal sampai ke detektor. Hasil dari pindai interferometer yang berupa interferogram (plot antara intensitas dengan posisi cermin) ini tidak dapat diinterpretasikan dalam bentuk aslinya. Proses transformasi fourier akan mengubah interferogram menjadi spektrum antara intensitas dengan frekuensi (George & McIntyre 1987).

Analisis Kemometrik Spektrum Inframerah

Spektrum inframerah sangat kaya akan informasi sktruktur molekular yang terbentuk dari gerak rotasi dan vibrasi atom dalam molekul. Banyaknya gerakan molekular dari molekul poliatom membentuk serangkaian pita serapan yang spesifik untuk masing-masing molekul. Hal ini membuat spektroskopi inframerah menjadi metode analisis kualitatif yang sangat berguna, namun interpretasinya juga kadang sulit dilakukan akibat adanya kemiripan dari setiap respon spektrum. Analisis kuantitatif spektrum inframerah juga sangat sulit karena adanya tumpang tindih spektrum serapan dari molekul yang terdapat dalam sampel (Stchur *et al.* 2002)

Kemometrik merupakan seni mengekstrak informasi kimia dari data yang dihasilkan oleh suatu percobaan kimia. Kemometrik menyediakan metode untuk mengurangi data berukuran besar yang diperoleh dari instrumen seperti spektrofotometer (Varmuza 2002) dan Naes (2002). Salah satu analisis spektrum yang ada yaitu membentuk model otentikasi menggunakan metode pengenalan pola seperti analisis komponen utama (PCA) dengan cara membentuk diagram kontrol berdasarkan nilai komponen utama yang diperoleh untuk mengidentifikasi adanya adulteran pada suatu formulasi bahan.

Analisis Komponen Utama (PCA)

PCA merupakan suatu teknik multivariat untuk mereduksi dimensi variabel dengan tidak kehilangan informasi. Prinsip PCA adalah mencari komponen utama yang merupakan kombinasi linear dari peubah asli. Komponen-komponen utama ini dipilih sedemikian rupa sehingga komponen utama pertama memiliki variasi terbesar dalam gugus data, sedangkan komponen utama kedua tegak lurus terhadap komponen utama pertama dan memiliki variasi terbesar berikutnya (Miller & Miller 1984). Kedua komponen utama pertama ini pada umumnya digunakan sebagai bidang proyeksi untuk pemeriksaan visual data multivariat. Jika jumlah varians dari komponen utama satu (KU_1) dan dua (KU_2) lebih besar dari 70%, maka plot skor komponen utama memperlihatkan visualisasi dua dimensi yang baik (Varmuza 2002).

BAHAN DAN METODE

Untuk mendapatkan model otentikasi komposisi obat bahan alam berdasarkan pola karakteristik komposisi kimia menggunakan spektra IR diperlukan data spektra FTIR dari ekstrak penyusun Tensigard®, bahan pengisi, obat sintetis resepin, ekstrak sambiloto dan campurannya, serta metode kemometrik yang tepat.

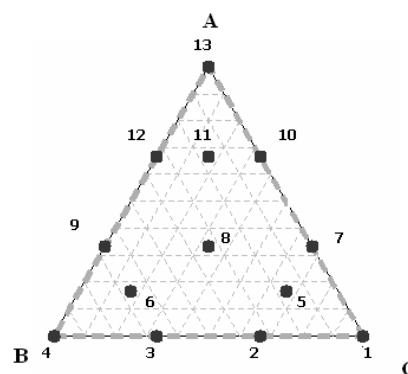
Persiapan Sampel dan Pembuatan Ekstrak

Setiap sampel dikeringkan dan ditentukan beberapa parameter simplisia seperti kadar air, kadar abu, dan komponen kualitatif kimia (hasil uji fitokimia). Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol. Sampel kering sebanyak 500g direndam dengan etanol sambil dikocok. Cairan yang dihasilkan dikumpulkan. Ampasnya direndam lagi dengan etanol baru dan cairannya dikumpulkan dengan cairan hasil perendaman pertama. Begitu seterusnya hingga air rendamannya tidak berwarna. Cairan ekstrak yang didapat dikeringkan dengan rotarievaporator. Ekstrak kering siap untuk digunakan untuk uji.

Desain Kombinasi Formula untuk Membentuk Diagram Kontrol

Ekstrak sendiri-sendiri atau kombinasinya yang akan diukur spektra FTIRnya didesain dengan desain campuran tipe kisi menggunakan perangkat lunak Minitab Versi 14. Parameter yang digunakan adalah desain campuran tipe kisi 3. Dengan cara ini jumlah sampel untuk membentuk diagram kontrol yang harus diukur spektra FTIRnya adalah 13. Masing-masing diulang sebanyak tiga kali. Komposisi dari ketiga campuran disajikan dalam Gambar 1. Selain itu diukur pula fomula yang

dicampur dengan obat sintetis (resepin) dan juga ekstrak sambiloto dengan tipe kisi yang sama pula.



Kode Komposisi Campuran	Persentase Campuran (%)		
	A	B	C
1	0.00	0.00	100.00
2	0.00	33.33	66.67
3	0.00	66.67	33.33
4	0.00	100.00	0.00
5	16.67	16.67	66.67
6	16.67	66.67	16.67
7	33.33	0.00	66.67
8	33.33	33.33	33.33
9	33.33	66.67	0.00
10	66.67	0.00	33.33
11	66.67	16.67	16.67
12	66.67	33.33	0.00
13	100.00	0.00	0.00

A = Seledri, B = Kumis Kucing / Reserpin / Sambiloto, C = Bahan Pengisi

Gambar 1. Segitiga rancangan komposisi campuran untuk semua kombinasi.

Pengukuran Spektra IR

Serbuk ekstrak kering ditimbang sebanyak 1 mg, dicampurkan dengan 200 mg KBr, dihaluskan dan dibuat pelet. Spektra IR dicatat di daerah mid-IR pada bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} . Pengukuran dilakukan dengan FTIR Tensor 37 Bruker pada resolusi 4 cm^{-1} dengan kecepatan pengamatan 30. Spektra FTIR yang dihasilkan ditransfer menjadi bentuk file ASCII untuk dianalisis lebih lanjut

Analisis Data

Interpretasi data spektra FTIR untuk menghasilkan nilai Komponen Utama (KU) dilakukan dengan bantuan piranti lunak R. Spektrum FTIR sebelumnya diseleksi terlebih dahulu kemudian dirata-ratakan. Diagram kontrol dibuat dengan cara membuat plot antara skor

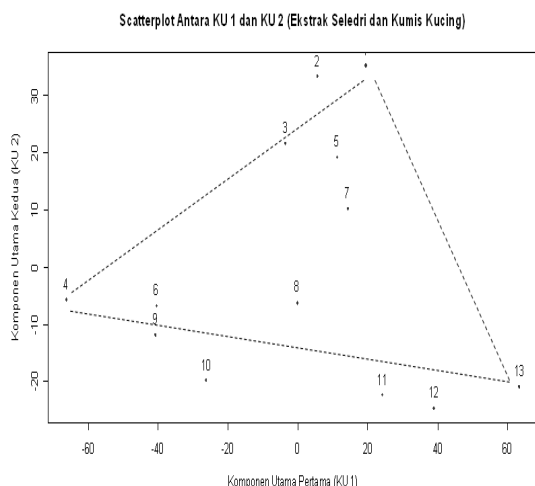
komponen utama pertama (KU₁) dengan skor komponen utama kedua (KU₂) berdasarkan segitiga komposisi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis PCA Spektrum Inframerah

Kombinasi Komposisi Ramuan Asli Tensigard

Analisis PCA terhadap spektrum inframerah yang dihasilkan dari kombinasi ramuan asli obat tensigard yaitu ekstrak seledri, kumis kucing, dan bahan pengisi menghasilkan Proporsi kumulatif Komponen Utama Pertama (KU₁) dan Komponen Utama Kedua (KU₂) yang cukup besar, yaitu sebesar 92,68 %, sehingga dengan hanya dua komponen utama yang digunakan sudah cukup digunakan dalam analisis dan tidak menghilangkan banyak informasi yang dikandung dalam data. Plot antara KU₁ dengan KU₂ yang dihasilkan disajikan pada Gambar 2 di bawah ini yang menunjukkan titik-titik plot relatif membentuk segitiga komposisi seperti yang diharapkan yaitu sesuai dengan desain yang dibuat (rancangan segitiga teoritik) walaupun terdapat titik yang menyimpang.



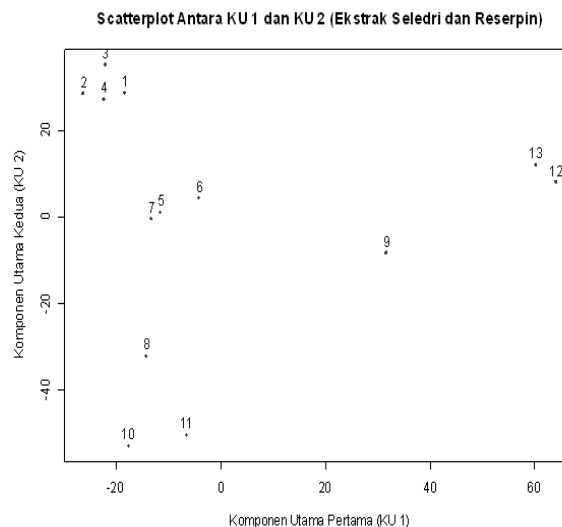
(Angka menunjukkan kode komposisi (lihat rancangan))

Gambar 2. Plot antara skor KU₁ dengan KU₂ hasil analisis PCA spektrum inframerah dari kombinasi Ekstrak Seledri dan Kumis Kucing.

Kombinasi Komposisi Ramuan Dengan Reserpin Sebagai Pensubstitusi Ekstrak Kumis Kucing

Hasil analisis PCA pada data spektrum inframerah kombinasi ekstrak seledri dengan reserpin memperoleh total proporsi kumulatif dari KU₁ dan KU₂ sebesar 97,66%, yang menandakan dengan dua komponen utama ini sudah cukup

digunakan. Plot antara KU₁ dan KU₂ hasil analisis PCA disajikan pada Gambar 3 berikut.

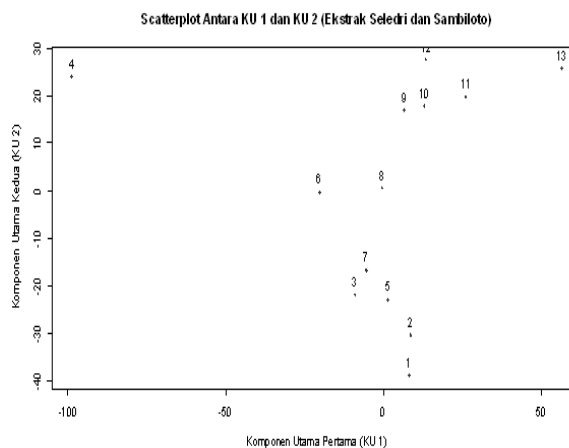


(Angka menunjukkan kode komposisi (lihat rancangan))

Gambar 3. Plot antara skor KU₁ dengan KU₂ hasil analisis PCA spektrum inframerah dari kombinasi Ekstrak Seledri dan Reserpin.

Kombinasi Komposisi Ramuan Dengan Ekstrak Sambiloto Sebagai Pensubstitusi Ekstrak Kumis Kucing

Untuk spektrum yang diperoleh dari kombinasi ekstrak seledri dan sambiloto, hasil analisis PCA memperoleh total proporsi kumulatif untuk KU₁ dengan KU₂ sebesar 94,71%. Plot antara kedua komponen utama ini disajikan pada Gambar 4 di bawah ini.



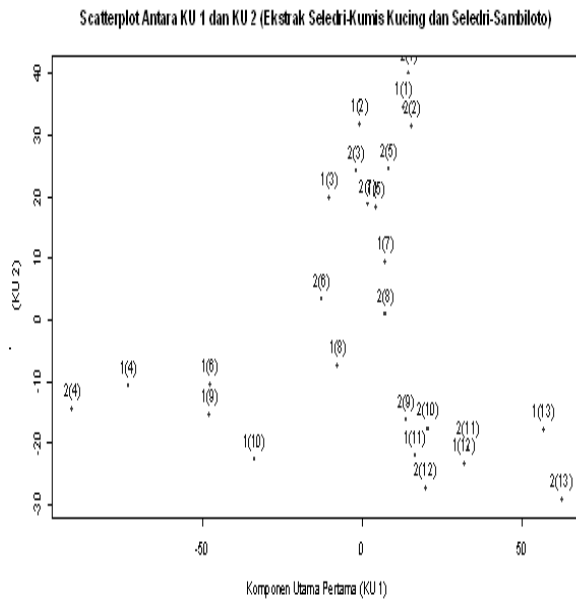
(Angka menunjukkan kode komposisi (lihat rancangan))

Gambar 4. Plot antara skor KU₁ dengan KU₂ hasil analisis PCA spektrum inframerah yang telah

diseleksi dari kombinasi Ekstrak Seledri dan Sambiloto.

Diagram Kontrol Model Otentikasi

Hasil penggabungan spektrum inframerah dari ekstrak seledri-kumis kucing (SDKK) dengan ekstrak seledri-sambiloto (SDSBL) menghasilkan proporsi kumulatif yang diterangkan oleh komponen utama pertama dan kedua sebesar 93,40%. Plot antara skor kedua komponen ini disajikan pada Gambar 5 di bawah ini.



(Angka pertama dalam plot menunjukkan kode komposisi ekstrak (1:SDKK, 2:SDSBL), sedangkan angka dalam kurung menunjukkan kode komposisi campuran (lihat rancangan).

Gambar 5. Plot antara skor KU_1 dengan KU_2 hasil analisis PCA spektrum inframerah dari kombinasi ekstrak seledri-kumis kucing dan ekstrak seledri-sambiloto.

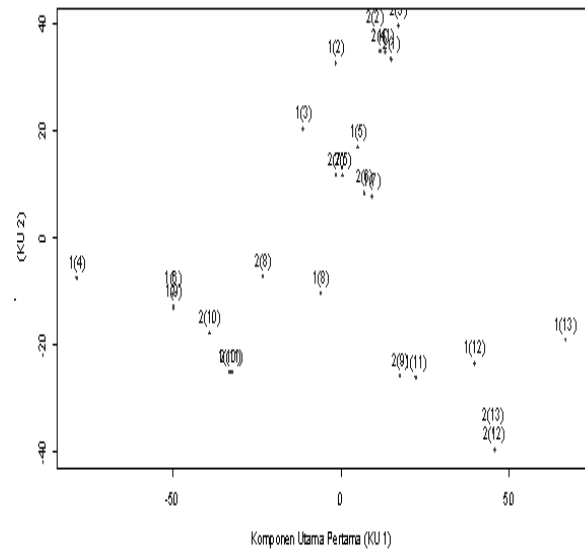
Dari plot yang dihasilkan tersebut (Gambar 5) terlihat bahwa kedua kombinasi ekstrak tidak mengelompok sendiri-sendiri berdasarkan kombinasi campuran, tetapi cenderung mengelompok dalam satu kelompok. Dengan demikian, diagram kontrol yang dihasilkan ini belum dapat membedakan apakah suatu komposisi ramuan tertentu merupakan ekstrak dari seledri-kumis kucing atau adulterasi dari ekstrak seledri-sambiloto.

Berdasarkan titik-titik plot komposisi campuran, dari diagram kontrol ini sudah dapat menentukan persentase komposisi suatu campuran ramuan. Dari diagram ini, komposisi campuran dari ekstrak seledri-kumis kucing dan seledri – sambiloto relatif

memiliki kedekatan titik plot, kecuali untuk komposisi campuran no 9, 10.

Hasil yang tidak berbeda jauh didapatkan dengan menggabungkan data spektrum inframerah dari kombinasi ekstrak seledri-kumis kucing dan adulterasi dari ekstrak seledri – reserpin. Total proporsi kumulatif dari komponen utama pertama dan kedua menunjukkan nilai sebesar 93,43%. Plot antara skor KU_1 dan skor KU_2 disajikan pada Gambar 6 di bawah ini.

Scatterplot Antara KU_1 dan KU_2 (Ekstrak Seledri-Kumis Kucing dan Seledri-Reserpin)



(Angka pertama dalam plot menunjukkan kode komposisi ekstrak (1:SDKK, 2:SDRP), sedangkan angka dalam kurung menunjukkan kode komposisi campuran (lihat rancangan).

Gambar 6. Plot antara skor KU_1 dengan KU_2 hasil analisis PCA spektrum inframerah yang telah diseleksi dari kombinasi ekstrak seledri-kumis kucing dan ekstrak seledri-reserpin.

Dari diagram kontrol ini juga terlihat bahwa sulit menentukan apakah suatu fitofarmaka benar-benar menggunakan kombinasi yang diklaim (Ekstrak seledri dengan kumis kucing). Hal ini disebabkan baik untuk ekstrak seledri-kumis kucing atau seledri-reserpin tidak memisah dalam kelompok masing-masing tetapi saling menumpuk.

Dengan demikian diagram kontrol yang dihasilkan ini baru dapat digunakan untuk melakukan kontrol terhadap komposisi campuran dari suatu fitofarmaka, tetapi belum dapat digunakan untuk melakukan kontrol dalam mendeteksi adanya adulterans pada obat fitofarmaka yang digunakan, karena dilihat dari titik-titik untuk tiap kombinasi komposisi yang diperoleh pada segitiga komposisi (Gambar 5 & 6) masih cenderung berada dalam satu kelompok.

Untuk dapat meningkatkan presisi model otentikasi yang dibuat diperlukan adanya pengolahan lebih lanjut pada spektra IR tiap kombinasi seperti derivatisasi spektra karena derivatisasi akan menghilangkan pergeseran garis dasar dan tumpang tindih puncak, sehingga informasi spektrum yang berguna untuk analisis komponen utama akan meningkat (Stchur *et al.* 2002) sehingga titik-titik pada segitiga komposisi yang dibentuk oleh nilai komponen utama akan mendekati nilai teoretis yang ada saat membuat desain kombinasi komposisi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Diagram kontrol model otentikasi dari kombinasi ekstrak seledri-kumis kucing, seledri – reserpin dan seledri – sambiloto yang dihasilkan belum dapat digunakan untuk melakukan deteksi adanya adulterans pada komposisi obat fitofarmaka yang diuji. Tetapi diagram ini dapat digunakan untuk melakukan deteksi terhadap komposisi campuran obat fitofarmakanya.

Saran

Untuk memperoleh diagram kontrol otentikasi fitofarmaka, desain campuran dengan tipe kisi perlu diperbanyak sehingga meningkatkan ketelitian dari diagram. Selain itu juga untuk meningkatkan presisi model otentikasi yang dibuat diperlukan adanya pengolahan lebih lanjut pada spektra IR tiap kombinasi seperti derivatisasi spektra sehingga titik-titik pada segitiga komposisi yang dibentuk oleh nilai komponen utama akan mendekati nilai teoretis yang ada saat membuat desain kombinasi komposisi.

DAFTAR PUSTAKA

- Sim, CO., M. R. Hamdan, Z. Ismail & M. N. Ahmad. 2004. Assesment of herbal medicines by chemometriccs- Assisted interpretation of FTIR spectra. Universiti Sains Malaysia, Penang
- Christian GD. 1986. *Analytical Chemistry*. Ed ke-4. New York: J Wiley.
- Fessenden & Fessenden. 1986. *Kimia Organik jilid 1*. Ed ke-3. Pudjaatmaka AH, penerjemah. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari *Organic Chemistry*
- George B & McIntyre. 1987. *Infrared Spectroscopy*. London: J Wiley.
- Hollas JM. 2004. *Modern Spectroscopy*. Ed ke-4. New York: J Wiley.
- Jajang 2004. Penerapan Analisis *Artificial Neural Networks* (ANN) Dalam Pengelompokan Ekstrak Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk). Tesis Sekolah Pasca Sarjana IPB, Bogor
- Kirschner C et al. 2001. Classification and Identification of Enterococci: a Comparative Phenotypic, Genotypic, and Vibrational Spectroscopic Study. *J Clin Microbiol* 39(5): 1763-1770
- Miller JC. 2000. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Ed Ke-4. Harlow: Pearson Education.
- Murad AA, M Lin, AG Cavinato, BA Rasco. 2006. *The use of Fourier transform infrared spectroscopy to differentiate Escherichia coli O157:H7 from other bacteria inoculated into apple juice*. *J Food Microb* 23: 162-168.
- Naes T, T Isaksson, T Fearn, T Davies. 2002. *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. Chichester: NIR Publications
- Skoog DA, FJ Holler, TA Nieman. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. Ed ke-5. Philadelphia: Harcaurt Brace.
- Stchur, P., D Cleveland, J Zhou, RG Michel. 2002. A review of recent applications of near infrared spectroscopy, and the characteristics of a novel PbS CCD array-based near infrared spectrometer. *Appl Spect Rev* 37:383-428.
- Varmuza, K. 2002. Applied chemometrics: from chemical data to relevant information. 1st Convergence on Chemistry. Kairo, Mesir.