VALIDASI METODE KLT-DENSITOMETRI UNTUK ANALISIS KADAR KUERSETIN DALAM EKSTRAK ETANOL DAUN SEMBUNG (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)

TUGAS AKHIR

Untuk memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

Anthony

NIM. 145070500111019

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

Validasi Metode KLT-Densitometri Untuk Analisis Kadar Kuersetin Dalam Ekstrak Etanol Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)

Oleh:

Anthony

NIM. 145070500111019

Telah diuji pada:
Hari : Rabu
Tanggal : 12 Desember 2018
Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I,

Alvan Febrian Shalas, M.Farm., Apt.
NIP. 2011068502181001

Pembimbing-I/Penguji-II,

Bachtiar Rifai P. I., M.Farm., Apt.
NIP. 2012058709291001

Pembimbing-II/Penguji-III

Ika Putri N., S.Farm., Apt., M.Sc.
NIP. 2013048909152001

Mengetahui,
Kepala Program Studi Farmasi,

Alvan Febrian Shalas, M.Farm., Apt.
NIP. 2011068502181001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anthony

NIM : 145070500111019

Program Studi : Program Studi Farmasi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tgulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 12 Desember 2018
Yang menyatakan pernyataan,

(Anthony)
NIM. 145070500111019

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas AKhir Dengan judul "Validasi Metode KLT-Densitometri Untuk Analisis Kadar Kuersetin Dalam Ekstrak Etanol Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)".

Penulis tertarik untuk mengangkat topik ini didasari oleh proses penuaan dini yang semakin cepat akibat peningkatan radikal bebas dari polusi udara, konsumsi alkohol, dan asap rokok, sehingga diperlukan suatu produk untuk menghambat proses penuaan dengan cara penambahan antioksidan, yang biasanya terdapat banyak pada tanaman. Agar mutu, khasiat, dan keamanan dari produk bahan alam dapat terjamin, maka dilakukan penetapan kadar senyawa, yang dalam penelitian ini dilakukan pada senyawa kuersetin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk dapat mengetahui dan menganalisis kadar kuersetin pada ekstrak daun sembung dengan metode KLT-Densitometri.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada:

1. Bachtiar Rifai Pratita Ihsan, M.Farm., Apt. sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan dengan sabar selama penulisan Tugas Akhir ini.
2. Ika Putri Nurhayati, S.Farm., Apt., M.Sc. sebagai pembimbing kedua yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan dengan sabar selama penulisan Tugas Akhir ini.
3. Alvan Febrian Shalas, M.Farm., Apt. sebagai penguji yang telah memberikan masukan dan pengetahuan untuk menyempurnakan Tugas Akhir ini.
4. Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si. selaku dosen pembimbing akademik yang telah memperhatikan penulis selama masa perkuliahan.
5. Oktavia Rahayu Adianingsih, S.Farm., M.Biomed. yang telah membantu penulis dalam menyusun proposal Tugas Akhir ini.
6. Hananditia Rachma Pramestutie, S.Farm., M.Farm.Klin., Apt., sebagai ketua tim Tugas Akhir Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
7. Orang tua penulis, bapak Johanes Maria dan ibu Tjiam Ai Lin serta saudara penulis, Julius yang terus memberikan dukungan kepada penulis.

8. Segenap dosen dan karyawan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, khususnya pada Program Studi Farmasi yang telah bekerja dengan maksimal sehingga penulis dapat melaksanakan perkuliahan dengan baik.
9. Rekan penelitian, Putri Aulia Rahmani, Ade Putri Delina, Iwayan Arya Yudisthira, dan Agung Febrian Ramadani yang telah bekerja sama dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini.
10. Gereja Mawar Sharon, terutama rekan CG AOG 1 yang tanpa hentinya mendoakan dan mendukung penulis untuk dapat menyelesaikan masa perkuliahan.
11. PharmacyUB in Christ, mulai angkatan 2014 hingga 2018 yang senantiasa mendoakan dan mendukung penulis.
12. Teman dekat penulis sejak sekolah, Averalda Magda Napitupulu, Kim Zsa Zsa Parsauliana Hutagalung, Kevin Christopher, yang selalu memperhatikan penulis walaupun tidak secara langsung.
13. Teman seperjuangan selama masa perkuliahan, yaitu teman-teman seangkatan Pharciobraty 2014.
14. KTB yes, kak Yogi, Adi Kuncoro, dan Yoel Bagus Giarto yang selalu mendukung penulis.
15. Grup Kenyang, yaitu Dian Kristiningtyas, Ericha Carolyne Santoso, Frinny Sembiring, dan Sindy Olivia Roemahlaiselan yang telah menemani penulis untuk menikmati kuliner Malang.
16. Tim Micin, yaitu Siendyarta Prasetya Tjahyono, Anggun Jesica, Philia Aretha, dan Dita Pradinawati yang telah membantu penulis untuk mendekatkan penulis kepada angkatan 2017.
17. Semua pihak yang telah membantu dan tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis sadar bahwa penulisan Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna, maka dari itu penulis menerima kritik dan saran yang membangun.

Akhir kata, penulis berharap Tugas Akhir ini dapat menjadi manfaat bagi pembaca.

Malang, 12 Desember 2018

Penulis

ABSTRAK

Anthony. 2018. *Validasi Metode KLT-Densitometri Untuk Analisis Kadar Kuersetin Dalam Ekstrak Etanol Daun Sembung (Blumea balsamifera (L.) DC.).* Tugas Akhir, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Bachtiar Rifai P. I., S. Farm., M. Farm., Apt. (2) Ika Putri Nurhayati, S. Farm., Apt., M. Sc.

Aktivitas antioksidan yang dimiliki senyawa kuersetin dalam *Blumea balsamifera* (L.) DC. berfungsi sebagai pelindung dari reaksi oksidasi berantai yang disebabkan oleh radikal bebas. Untuk itu, diperlukan penjaminan mutu, efikasi, dan keamanan khasiat dari efek terapi *Blumea balsamifera* (L.) DC., salah satunya dengan dilakukan penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak *Blumea balsamifera* (L.) DC. Digunakan metode KLT-Densitometri untuk memisahkan senyawa kuersetin dari senyawa lainnya yang terdapat dalam ekstrak etanol 96% dan 70%. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk dapat mengetahui dan menganalisis kadar kuersetin pada ekstrak *Blumea balsamifera* (L.) DC. dengan metode KLT-densitometri. Hasil ekstraksi *Blumea balsamifera* (L.) DC. dengan pelarut etanol 96% dan 70% berupa rendemen sebesar 8% dan 10,48%. Kemudian, hasil dari optimasi pada standar kuersetin didapatkan panjang gelombang 366 nm dan nilai Rf 0,8375. Dari hasil validasi, didapatkan hasil telah memenuhi persyaratan dengan nilai resolusi 0,8-1,1 untuk spesifisitas, nilai Vxo 4,555% untuk linieritas, *%recovery* dalam rentang 85-110% untuk akurasi, nilai LOD 0,2050 µg, dan nilai LOQ 0,6833 µg. Tetapi persyaratan presisi tidak memenuhi persyaratan yaitu %RSD kurang dari 4%. Setelah itu, didapatkan kadar ekstrak dengan pelarut etanol 96% dan 70% secara berurutan adalah 0,74±0,022% dan 0,39±0,004%. Dari hasil uji statistik *independent t-test*, dapat ditentukan bahwa kadar ekstrak dengan etanol 96% berbeda signifikan dari kadar ekstrak dengan etanol 70%, ditunjukkan pada nilai $p<0,05$. Dengan hasil diatas, maka dapat disimpulkan bahwa data telah memenuhi persyaratan validasi metode dan kadar antar ekstrak memiliki perbedaan yang bermakna.

Kata kunci : Validasi metode, antioksidan, kuersetin, *Blumea balsamifera* (L.) DC., KLT-densitometri

ABSTRACT

Anthony. 2018. *Validation Methods of a Thin-Layer Chromatography-Densitometer for Determination of Quercetin in Sambong Leaves (Blumea balsamifera (L.) DC.) Ethanol Extract*. Final Assignment, Pharmacy Program, Medical Faculty Brawijaya University. Advisers: (1) Bachtiar Rifai P. I., S. Farm., M. Farm., Apt. (2) Ika Putri Nurhayati, S. Farm., Apt., M. Sc.

Antioxidant activity possessed by quercetin in *Blumea balsamifera* (L.) DC. acts as a protection from chain oxidation reactions caused by free radicals. Therefore, quality assurance, efficacy, and safety of therapy effects from *Blumea balsamifera* (L.) DC. are needed by determining quercetin value from extract of *Blumea balsamifera* (L.) DC. leaves. TLC-Densitometry was used for separating quercetin from other compounds which are contained in ethanol extract 96% and 70%. The purpose of this study were to know and analyze quercetin value from *Blumea balsamifera* (L.) DC. extract with TLC-Densitometry method. The results from extraction of *Blumea balsamifera* (L.) DC. with ethanol 96% and 70% were in the form of yield of 8% and 10,48%. Subsequently, the results from optimization at quercetin standard were obtained Rf value 0,8375 at a wavelength of 366 nm. The results of validation have met the requirements with a resolution value of 0,8-1,1 for specificity, coefficient variation value of 4,555% for linearity, %recovery in the range 85-110% for accuracy, LOD value 0,2050 µg, and LOQ value 0,6833 µg. However, the precision did not meet the requirement, which %RSD less than 4%. Afterwards, the extracts obtained with ethanol 96% and 70% solvents were respectively 0.74±0.022% and 0.39±0.004%. From the results of the independent t-test statistical test, it can be determined that the levels of extracts with ethanol 96% differ significantly from the levels of extracts with 70% ethanol, indicated at $p < 0.05$. From the results, we can conclude that the requirement of validation methods has been fulfilled and the content of sample extracts are significantly different.

Keywords : Validation, antioxidant, quercetin, *Blumea balsamifera* (L.) DC., TLC-Densitometry

DAFTAR ISI

Halaman

Judul ..... **i**

Lembar Pengesahan ..... **ii**

Lembar Pernyataan Keaslian Tulisan ..... **iii**

Kata Pengantar ..... **iv**

Abstrak ..... **vi**

Abstract ..... **vii**

Daftar Isi ..... **viii**

Daftar Tabel ..... **xii**

Daftar Gambar ..... **xiii**

Daftar Lampiran ..... **xiv**

Daftar Singkatan ..... **xv**

BAB 1 PENDAHULUAN **1**

1.1 Latar Belakang 1

1.2 Rumusan Masalah 5

1.3 Tujuan 5

1.4 Manfaat 5

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA **6**

2.1 Tanaman Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) 6

2.1.1 Klasifikasi dan Keanekaragaman Tanaman 6

2.1.2 Aktivitas dan Manfaat Tanaman 7

2.2 Kuersetin (*2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one*) 8

2.3 Metode Ekstraksi Maserasi 9

2.4 Metode 9

2.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 9
2.4.2 Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri 11
2.5 Validasi Metode 11
2.5.1 Linieritas 11
2.5.2 Spesifisitas 11
2.5.3 Akurasi 12
2.5.4 Presisi 12
2.5.5 *Limit of Detection* (LOD) 13
2.5.6 *Limit of Quantification* (LOQ) 13
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN 14
3.1 Kerangka Konsep Penelitian 14
3.2 Hipotesis Penelitian 16
BAB 4 METODE PENELITIAN 17
4.1 Rancangan Penelitian 17
4.2 Sampel 17
4.3 Variabel Penelitian 17
4.3.1 Variabel Bebas 17
4.3.2 Variabel Terikat 17
4.3.3 Variabel Kontrol 17
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian 18
4.5 Bahan dan Alat Penelitian 18
4.5.1 Bahan 18
4.5.2 Alat 18
4.6 Definisi Operasional 18
4.7 Prosedur Penelitian 20

4.7.1 Kerangka Operasional 20
4.7.2 Ekstraksi Maserasi 20
4.7.3 Spesifisitas 21
4.7.3.1 Preparasi Standar 21
4.7.3.2 Preparasi Sampel 21
4.7.3.3 Pemilihan Fase Gerak 21
4.7.4 Penentuan Panjang Gelombang 22
4.7.5 Penentuan *Retardation Factor* (R_f) 22
4.7.6 Linieritas 22
4.7.7 Penentuan Akurasi 23
4.7.8 Penentuan Presisi 23
4.7.9 Penentuan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK) 24
4.7.10 Penetapan Kadar Kuersetin dalam Ekstrak Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) 24
4.8 Analisis data 24
4.8.1 Selektivitas (Spesifisitas) 24
4.8.2 Linieritas 25
4.8.3 Akurasi (Kecermatan) 25
4.8.4 Presisi (Keseksamaan) 25
4.8.5 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi 26
4.8.6 Penetapan Kadar Kuersetin dalam Ekstrak Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) 26
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA 27
5.1 Hasil Ekstraksi 27
5.2 Preparasi Standar Kuersetin dan Sampel 27
5.3 Hasil Optimasi Sistem KLT-Densitometri 28

5.4 Parameter Validasi 30
5.4.1 Linieritas 30
5.4.2 Akurasi dan Presisi 31
5.4.3 LOD dan LOQ 33
5.5 Penetapan Kadar 33
BAB 6 PEMBAHASAN 35
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian 35
6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian 39
6.3 Keterbatasan Penelitian 39
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN 40
7.1 Kesimpulan 40
7.2 Saran 40
DAFTAR PUSTAKA 41
LAMPIRAN 44

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Resolusi 29

Tabel 5.2 Persamaan Kurva Baku Linieritas 31

Tabel 5.3 Hasil Uji Akurasi Dan Presisi 32

Tabel 5.4 Hasil Penetapan Kadar Ekstrak Daun Sembung Dengan Etanol 96% dan 70% 34

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Tanaman Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) 7

Gambar 2.2 Struktur Senyawa Kuersetin 8

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian 14

Gambar 4.1 Kerangka Operasional Prosedur Penelitian 20

Gambar 5.1 (a) Ekstrak Kental Daun Sembung Dengan Pelarut Etanol 70%... 27

(b) Ekstrak Kental Daun Sembung Dengan Pelarut Etanol 96% .. 27

Gambar 5.2 (a) Hasil Optimasi Pada Sinar UV 366 nm 28

(b) Skema Hasil Optimasi 28

Gambar 5.3 Kurva Baku Kuersetin 30

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Surat Keterangan Ekstrak Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) 44

Lampiran 2. Surat Keterangan Analisis KLT-Akurasi 45

Lampiran 3. Surat Keterangan Analisis KLT-Penetapan Kadar 48

Lampiran 4. Hasil Spektrum Data 52

Lampiran 5. Perhitungan Kurva Baku Linieritas 53

Lampiran 6. Perhitungan Akurasi dan Presisi 54

Lampiran 7. Perhitungan LOD dan LOQ 56

Lampiran 8. Perhitungan Penetapan Kadar 57

Lampiran 9. Uji Statistik *Independent T-Test* 58

Lampiran 10. Dokumentasi Ekstraksi Maserasi 59

Lampiran 11. Dokumentasi Optimasi 60

Lampiran 12. Dokumentasi Hasil Pengujian 62

DAFTAR SINGKATAN

$\bar{X}$	: Kadar Rata-rata Zat pada Sampel
AOAC	: *Association of Official Analytical Chemists*
AUC	: *Area Under Curve*
b	: slope
BD	: Batas Deteksi
BK	: Batas Kuantitasi
BPOM	: Badan Pengawas Obat dan Minuman
Depkes RI	: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
DNA	: *Deoxyribonucleic Acid*
KCKT	: Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
KG	: Kromatografi Gas
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
KLTKT	: Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi
LOD	: *Limit of Detection*
LOQ	: *Limit of Quantitation*
MMB	: Materia Medika Batu
NCBI	: *National Center for Biotechnology Information*
p	: signifikansi
r	: Koefisien Korelasi
R_f	: *Retardation Factor*
RP-HPLC	: *Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatographic*
RSD	: *Relative Standard Deviation*
SD	: Standar Deviasi
Sxo	: Standar Deviasi Fungsi

Sy	: Simpangan Baku Residual
USDA	: *United States Department of Agriculture*
Vxo	: Koefisien Vasiasi Fungsi

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

Validasi Metode KLT-Densitometri Untuk Analisis Kadar Kuersetin Dalam Ekstrak Etanol Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)

Oleh:

Anthony

NIM. 145070500111019

Telah diuji pada:
Hari : Rabu
Tanggal : 12 Desember 2018
Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I,

Alvan Febrian Shalas, M.Farm., Apt.
NIP. 2011068502181001

Pembimbing-I/Penguji-II,

Bachtiar Rifai P. I., M.Farm., Apt.
NIP. 2012058709291001

Pembimbing-II/Penguji-III

Ika Putri N., S.Farm., Apt., M.Sc.
NIP. 2013048909152001

Mengetahui,
Kepala Program Studi Farmasi,

Alvan Febrian Shalas, M.Farm., Apt.
NIP. 2011068502181001

ABSTRAK

Anthony. 2018. *Validasi Metode KLT-Densitometri Untuk Analisis Kadar Kuersetin Dalam Ekstrak Etanol Daun Sembung (Blumea balsamifera (L.) DC.).* Tugas Akhir, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Bachtiar Rifai P. I., S. Farm., M. Farm., Apt. (2) Ika Putri Nurhayati, S. Farm., Apt., M. Sc.

Aktivitas antioksidan yang dimiliki senyawa kuersetin dalam *Blumea balsamifera* (L.) DC. berfungsi sebagai pelindung dari reaksi oksidasi berantai yang disebabkan oleh radikal bebas. Untuk itu, diperlukan penjaminan mutu, efikasi, dan keamanan khasiat dari efek terapi *Blumea balsamifera* (L.) DC., salah satunya dengan dilakukan penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak *Blumea balsamifera* (L.) DC. Digunakan metode KLT-Densitometri untuk memisahkan senyawa kuersetin dari senyawa lainnya yang terdapat dalam ekstrak etanol 96% dan 70%. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk dapat mengetahui dan menganalisis kadar kuersetin pada ekstrak *Blumea balsamifera* (L.) DC. dengan metode KLT-densitometri. Hasil ekstraksi *Blumea balsamifera* (L.) DC. dengan pelarut etanol 96% dan 70% berupa rendemen sebesar 8% dan 10,48%. Kemudian, hasil dari optimasi pada standar kuersetin didapatkan panjang gelombang 366 nm dan nilai Rf 0,8375. Dari hasil validasi, didapatkan hasil telah memenuhi persyaratan dengan nilai resolusi 0,8-1,1 untuk spesifisitas, nilai Vxo 4,555% untuk linieritas, *%recovery* dalam rentang 85-110% untuk akurasi, nilai LOD 0,2050 µg, dan nilai LOQ 0,6833 µg. Tetapi persyaratan presisi tidak memenuhi persyaratan yaitu %RSD kurang dari 4%. Setelah itu, didapatkan kadar ekstrak dengan pelarut etanol 96% dan 70% secara berurutan adalah 0,74±0,022% dan 0,39±0,004%. Dari hasil uji statistik *independent t-test*, dapat ditentukan bahwa kadar ekstrak dengan etanol 96% berbeda signifikan dari kadar ekstrak dengan etanol 70%, ditunjukkan pada nilai $p<0,05$. Dengan hasil diatas, maka dapat disimpulkan bahwa data telah memenuhi persyaratan validasi metode dan kadar antar ekstrak memiliki perbedaan yang bermakna.

Kata kunci : Validasi metode, antioksidan, kuersetin, *Blumea balsamifera* (L.) DC., KLT-densitometri

ABSTRACT

Anthony. 2018. *Validation Methods of a Thin-Layer Chromatography-Densitometer for Determination of Quercetin in Sambong Leaves (Blumea balsamifera (L.) DC.) Ethanol Extract*. Final Assignment, Pharmacy Program, Medical Faculty Brawijaya University. Advisers: (1) Bachtiar Rifai P. I., S. Farm., M. Farm., Apt. (2) Ika Putri Nurhayati, S. Farm., Apt., M. Sc.

Antioxidant activity possessed by quercetin in *Blumea balsamifera* (L.) DC. acts as a protection from chain oxidation reactions caused by free radicals. Therefore, quality assurance, efficacy, and safety of therapy effects from *Blumea balsamifera* (L.) DC. are needed by determining quercetin value from extract of *Blumea balsamifera* (L.) DC. leaves. TLC-Densitometry was used for separating quercetin from other compounds which are contained in ethanol extract 96% and 70%. The purpose of this study were to know and analyze quercetin value from *Blumea balsamifera* (L.) DC. extract with TLC-Densitometry method. The results from extraction of *Blumea balsamifera* (L.) DC. with ethanol 96% and 70% were in the form of yield of 8% and 10,48%. Subsequently, the results from optimization at quercetin standard were obtained Rf value 0,8375 at a wavelength of 366 nm. The results of validation have met the requirements with a resolution value of 0,8-1,1 for specificity, coefficient variation value of 4,555% for linearity, %recovery in the range 85-110% for accuracy, LOD value 0,2050 µg, and LOQ value 0,6833 µg. However, the precision did not meet the requirement, which %RSD less than 4%. Afterwards, the extracts obtained with ethanol 96% and 70% solvents were respectively 0.74±0.022% and 0.39±0.004%. From the results of the independent t-test statistical test, it can be determined that the levels of extracts with ethanol 96% differ significantly from the levels of extracts with 70% ethanol, indicated at $p < 0.05$. From the results, we can conclude that the requirement of validation methods has been fulfilled and the content of sample extracts are significantly different.

Keywords : Validation, antioxidant, quercetin, *Blumea balsamifera* (L.) DC., TLC-Densitometry

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Proses penuaan sel tubuh manusia terjadi secara alamiah akibat proses degenerasi sel yang melibatkan oksidasi sehingga merusak komponen sel tersebut. Proses ini dapat meningkat seiring dengan meningkatnya radikal bebas dalam tubuh yang dapat memicu proses oksidasi pada komponen biologis dan dapat merusak sel tersebut sehingga proses penuaan sel terjadi lebih cepat. Selain dari sistem biologis tubuh, radikal bebas juga dapat terbentuk dari polusi udara, asap rokok, dan pengonsumsian alkohol. Stres oksidatif merupakan dampak dari ketidakseimbangan radikal bebas dalam tubuh, yang dapat disebabkan oleh kurangnya antioksidan dalam tubuh, dan berlebihnya produksi radikal bebas (Moini, 2002; Ames, 1993).

Radikal bebas adalah suatu senyawa yang tidak stabil karena memiliki elektron yang tidak berpasangan, sehingga senyawa tersebut mencari pasangan elektron nya pada molekul biologi (Subeki, 1998). Akibatnya, terjadi reaksi oksidasi yang dapat merusak komponen biologi pada makhluk hidup, contohnya protein dan *deoxyribonucleic acid* (DNA). Kerusakan dari protein dan DNA merupakan hal yang serius karena dapat memicu timbulnya kanker, proses penuaan, dan penyakit lainnya (Oyzurt, 2011).

Antioksidan mampu menghambat proses oksidasi zat yang mudah teroksidasi meskipun dalam konsentrasi rendah. Antioksidan dapat melindungi sel biologis dari efek berbahaya radikal bebas yang reaktif dengan cara menghentikan proses oksidasi berantai dari radikal bebas (Schuler, 1990). Senyawa kimia yang

berperan sebagai antioksidan adalah senyawa fenolik dan polifenolik, yang banyak terdapat di alam terutama pada tumbuhan (Ramle, 2008). Maka dari itulah, pengembangan obat herbal yang berbahan dasar tumbuhan sangat baik untuk dilakukan karena masih banyak senyawa yang dapat berguna bagi kesehatan.

Senyawa kimia yang paling sering ditemukan pada tumbuhan salah satunya adalah senyawa golongan flavonoid. Senyawa golongan flavonoid merupakan senyawa kimia yang dibentuk dari metabolit sekunder tanaman dalam hal pertahanan tanaman tersebut. Flavonoid memiliki banyak khasiat yang dapat digunakan untuk kebutuhan manusia, salah satu khasiatnya yaitu sebagai antioksidan (Ramle, 2008). Salah satu contoh senyawa golongan flavonoid yang sering dilakukan pengujian adalah senyawa kuersetin. Oleh karena itu, senyawa kuersetin dapat dipilih untuk dijadikan bahan penelitian sebagai antioksidan.

Senyawa kuersetin merupakan senyawa fenolik yang termasuk dalam golongan flavonoid. Senyawa kuersetin banyak terkandung didalam tanaman, termasuk tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.). Diketahui bahwa kandungan senyawa kuersetin pada ekstrak kental daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) sebesar 2,40% (Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI), 2009). Sementara itu, pada penelitian analisis kuersetin pada ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) dengan metode *reversed-phase high-performance liquid chromatographic* (RP-HPLC) didapatkan kadar kuersetin berada dalam rentang 0.135 hingga 0.294 mg per gram simplisia kering daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) (Toralba, 2012). Namun, dari penelitian lain belum dicantumkan mengenai validitas metode dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Oleh sebab itu, dibutuhkan validasi terhadap metode KLT-densitometri

untuk analisis kadar kuersetin dalam ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.).

Analisis senyawa kuersetin dalam tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) dapat dilakukan dengan metode KLT (Depkes RI, 2009). Penelitian sebelumnya yang telah menganalisis kadar kuersetin antara lain analisis kuersetin pada ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) dengan metode *reversed-phase high-performance liquid chromatographic* (RP-HPLC) (Toralba, 2012). Namun, penelitian terkait analisis kadar kuersetin dalam ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) dengan metode KLT-densitometri belum pernah dilakukan.

Penentuan kualitas untuk menjamin keamanan khasiat yang optimal bergantung pada kandungan senyawa bioaktif yang terdapat dalam tanaman yang telah terbukti memiliki aktivitas fisiologis tertentu (Badan Pengawas Obat dan Minuman (BPOM), 2011). Penentuan kandungan senyawa bioaktif pada ekstrak bermanfaat untuk menentukan efikasi, mutu, dan keamanan dari tanaman yang akan digunakan, sehingga perlu dilakukan uji analisis secara kuantitatif senyawa kuersetin untuk menstandarisasi kandungan senyawa kuersetin dalam tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.). Untuk memenuhi persyaratan manfaat efikasi, mutu, dan keamanan dari tanaman tersebut, maka dilakukan standarisasi kandungan senyawa bioaktif dengan penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.).

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah KLT-densitometri, yaitu suatu metode pemisahan senyawa yang terdapat dalam suatu campuran dengan cara ditotolkan pada lempeng KLT. Pemisahan dapat terjadi karena terdapat perbedaan afinitas dan interaksi senyawa terhadap fase gerak dan fase diam

(Depkes RI, 2009). Dampak dari pemisahan senyawa tersebut adalah timbulnya bercak pada jarak tertentu setelah dilakukan eluasi sehingga dapat dianalisis secara kualitatif dan didapatkan nilai *retardation factor* (R_f). Analisis secara kuantitatif dari hasil KLT juga dapat dilakukan dengan cara menentukan kadar senyawa, nilai *relative standard deviation* (RSD), dan persentase perolehan kembali yang dapat menggambarkan nilai akurasi dan presisi (Riyanto, 2013). Kelebihan dari metode KLT-densitometri adalah spesifisitas yang tinggi dan dapat dipercaya, pengerjaan yang cepat dan mudah, biaya pengoperasian yang murah, jumlah pelarut dan polaritas yang mudah diatur, dan jumlah pelarut yang dibutuhkan sedikit (Khopkar, 1990). Metode ini juga memberikan ruang untuk bebas memilih fase gerak dan juga memiliki cara optimasi pemisahan yang bervariasi (Rahman, 2009).

Validitas metode dengan KLT-densitometri untuk analisis senyawa kuersetin dalam ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) harus memenuhi persyaratan uji validasi. Validasi digunakan untuk membuktikan bahwa metode analisis yang digunakan dapat memberikan hasil yang sesuai dan valid. Parameter yang digunakan untuk uji validasi antara lain selektivitas, spesifisitas, linieritas, akurasi yang dinyatakan dalam persentase perolehan kembali, presisi yang dinyatakan dengan parameter RSD, batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK) yang dinyatakan dalam rumus *Limit of Detection* (*LOD*) dan *Limit of Quantitation* (*LOQ*) (Riyanto, 2013).

Berdasarkan penjelasan uraian diatas, maka diperlukan penelitian tentang validasi metode KLT-densitometri untuk analisis senyawa kuersetin dalam ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui validitas dari metode KLT-densitometri dalam menganalisis kadar

senyawa kuersetin dalam ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.), sehingga senyawa kuersetin dalam dianalisis secara kuantitatif dan kadar senyawa kuersetin dalam ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) dapat diketahui.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Apakah metode KLT-densitometri untuk analisis kadar kuersetin dalam ekstrak etanol daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) memenuhi parameter validasi?

1.2.2 Apakah terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi etanol terhadap kadar kuersetin pada ekstrak etanol daun sembung?

1.3 Tujuan

1.3.1 Menganalisis kadar kuersetin dalam ekstrak etanol daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) dengan metode KLT-densitometri.

1.3.2 Mengetahui pengaruh perbedaan konsentrasi etanol terhadap kadar kuersetin pada ekstrak etanol daun sembung.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Akademik

1.4.1.1 Sebagai pengembangan ilmu fitokimia dan kimia analisis instrumen dalam pemanfaatan ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) dengan metode KLT-densitometri.

1.4.2 Manfaat Praktis

1.4.2.1 Sebagai acuan pada obat herbal untuk pemanfaatan ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) sebagai agen antioksidan.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)

2.1.1 Klasifikasi dan Keanekaragaman Tanaman

Berdasarkan departemen pertanian Amerika Serikat (*United States Department of Agriculture* (USDA)), tanaman sembung dibagi termasuk dalam klasifikasi tanaman sebagai berikut (USDA, 2018)**:**

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivision : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Subclass : Asteridae

Order : Asterales

Family : Asteraceae

Genus : Blumea

Species : *Blumea balsamifera* (L.) DC.

Gambar 2.1 Tanaman Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)

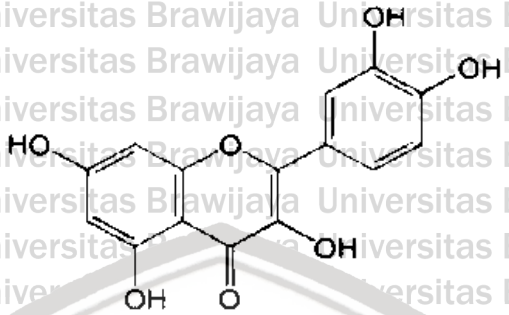
(Department of Traditional Medicine, 2004)

Tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.), yang terlihat seperti pada gambar 2.1, biasa tumbuh pada tepi hutan, dasar sungai, lembah, dan rumput-rumputan. Di negara cina, tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) secara umum digunakan sebagai obat herbal didaerah selatan sungai Yangtze seperti provinsi Hainan, Guizhou, Yunnan, dan Guangdong, serta Taiwan (Pang, 2014).

2.1.2 Aktivitas dan Manfaat Tanaman

Dari tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) digunakan seluruh tanaman, khususnya pada bagian daun, sebagai bahan dasar obat cina tradisional untuk mengobati *eczema*, dermatitis, *menorrhagia*, rematik, luka kulit, dan sebagai insektisida. Selain itu, tanaman sembung memiliki aktivitas farmakologi seperti antitumor, antifungi, antioksidan, antiobesitas, antimikroba, dan antiinflamasi (Pang, 2014).

2.2 Kuersetin (2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one)



Gambar 2.2 Struktur Senyawa Kuersetin (Depkes RI, 2009)

Kuersetin merupakan senyawa golongan flavonoid dari golongan fenolik yang banyak terdapat dalam tanaman. Senyawa kuersetin dipercaya memiliki aktivitas farmakologis sebagai antioksidan, antiinflamasi, antiapoptosis, bahkan pada penelitian yang lebih jauh, dapat melindungi hepar dari kerusakan yang disebabkan oleh hepatotoksin (Alrawaiq, 2014).

Kuersetin memiliki kelarutan yang sangat tinggi dalam eter dan metanol. Selain itu, kuersetin juga larut didalam etanol, aseton, dan asam asetat. Namun, kuersetin sukar larut didalam air sehingga kelarutannya dalam air sekitar 60 mg/L (*National Center for Biotechnology Information* (NCBI), 2018).

Molekul kuersetin terdiri dari 5 gugus hidroksil yang menentukan aktivitas biologis dari komponen tersebut dan kemungkinan dari derivatnya. Meskipun memiliki 5 gugus hidroksil, namun senyawa kuersetin memiliki sifat lipofilik. Sifat lipofilik maupun hidrofilik ditentukan berdasarkan pada tipe substansi pada molekulnya. Glikosilasi pada gugus hidroksil senyawa kuersetin dapat meningkatkan sifat hidrofilisitasnya (Materska, 2008).

Dari sifat kimianya, diketahui bahwa senyawa kuersetin memiliki sifat antioksidan yang disebabkan karena adanya gugus hidroksil bebas (Materska, 2008). Pada penelitian selanjutnya, diketahui bahwa gugus 1,2-dihidroksibenzena

pada cincin B adalah yang memiliki aktivitas antiradikal yang tinggi (Goupy *et al*., 2003).

2.3 Metode Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi dengan metode maserasi merupakan metode maserasi padat-cair bertahap yang dilakukan dengan merendam padatan dalam pelarutnya selama beberapa waktu sehingga substansi dari bahan alam dapat diekstrak tanpa dilakukan pemanasan, dengan pemanasan, maupun pada suhu pendidihan. Jika maserasi dilakukan dengan pelarut organik maka filtrat hasil ekstraksi dievaporasi atau didestilasi untuk mendapatkan ekstrak kental yang kemudian dapat dilanjutkan dengan proses pemisahan dengan kromatografi atau rekristalisasi langsung. Kecepatan proses ekstraksi dengan maserasi menjadi keuntungan dari metode ekstraksi ini (Depkes RI, 2000).

2.4 Metode

2.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi adalah suatu metode pemisahan zat terlarut dengan proses perpindahan dinamis yang melibatkan dua fase, salah satu fasenya bergerak dengan arah tertentu dan didalamnya senyawa tersebut menunjukkan perbedaan sehingga dapat diidentifikasi senyawa-senyawa tersebut. Fase gerak yang pada umumnya berbentuk cair atau gas, membawa zat terlarut melalui media sehingga terpisah dari zat terlarut lainnya. Sedangkan, fase diam bertindak sebagai pengikat atau penangkap zat terlarut yang terpisah tersebut sehingga fase yang biasanya menggunakan suatu penyangga yang inert ini dapat mengidentifikasikan senyawa yang terpisah dari zat terlarut lainnya (Depkes RI, 2009).

Jenis-jenis kromatografi yang digunakan dalam penelitian untuk menganalisis secara kualitatif dan kuantitatif yang digunakan untuk penetapan kadar dan pengujian dalam tanaman biasanya menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Gas (KG), dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Pada KLT biasanya digunakan lempeng kaca, plastik, atau logam yang dilapisi dengan serbuk halus fase diam. Pada umumnya, lapisan tipis pada KLT berupa serbuk penukar ion sehingga efektif untuk memisahkan senyawa polar (Depkes RI, 2009).

Fase diam yang digunakan memiliki perbedaan sifat yang ditentukan dari struktur, ukuran, kemurnian, maupun zat pengikat yang digunakan. Beberapa fase diam yang biasa digunakan adalah silika gel, alumina, dan selulosa. Masing-masing fase diam yang digunakan memiliki sifat yang berbeda sehingga kegunaannya pun berbeda. Misalnya, pada silika gel yang identik dengan penggunaannya pada KLT, alumina yang memiliki aktivitas tinggi dan dapat diatur pH nya sehingga bisa memiliki sifat basa, netral, atau asam, selulosa yang biasanya digunakan senyawa yang bersifat polar (Hansen, 2012).

Fase gerak yang biasanya digunakan dalam kromatografi adalah pelarut organik yang bisa digunakan sebagai pelarut tunggal maupun campuran. Pemilihan pelarut organik digunakan sebagai dasar dari pemisahan senyawa yang akan dilakukan sehingga sangat penting dilakukan pemilihan pelarut organik dengan pendekatan polaritas (Hansen, 2012).

Perbandingan antara jarak rambat senyawa yang terpisah dari zat terlarut dan jarak rambat fase gerak, yang dapat disebut sebagai *Retardation Factor* (Rf), dapat digunakan sebagai pembanding dalam uji identifikasi secara kuantitatif. Penetapan letak bercak yang dihasilkan pada KLT dapat dilihat dengan

pengamatan langsung jika senyawanya tampak pada cahaya tampak atau pada sinar ultraviolet, atau dengan pengamatan setelah disemprotkan dengan larutan penampak bercak (Depkes RI, 2009).

2.4.2 Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri

Pada KLT, dapat dilakukan analisis kuantitatif dengan mengukur besar dan intensitas bercak secara langsung pada lempeng KLT dengan menggunakan densitometer. Dari pengukuran besar dan intensitas bercak, dapat diketahui kadar dari senyawa tersebut dalam zat terlarut sehingga dapat diketahui persentase senyawa yang diamati dalam larutan (Depkes RI, 2009).

2.5 Validasi Metode

2.5.1 Linieritas

Linieritas dari suatu prosedur analitik merupakan perbandingan antara konsentrasi dan analit dalam sampel yang nantinya dari hasil linieritas, didapatkan hasil uji kuantifikasi yang valid. Linieritas diperlukan untuk prosedur analisis dikarenakan perlu adanya evaluasi hasil dari konsentrasi analit yang bisa berupa serapan dalam spektroskopi dan juga titik puncak dalam kromatografi. Diperlukan minimal 5 konsentrasi yang berbeda untuk menetapkan linieritas agar data perbandingan konsentrasi dan hasil respon dari instrumen dapat terlihat perbedaannya (Hansen, 2012). Koefisien korelasi yang tinggi ($r^2 \geq 0{,}99$) dapat digunakan sebagai tanda kecocokan yang baik (*Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), 2002).

2.5.2 Spesifisitas

Spesifisitas merupakan suatu prosedur analitik yang digunakan untuk menilai analit dengan suatu senyawa tertentu yang diharapkan terkandung dalam

analit. Senyawa yang terkandung biasanya termasuk pengotor, hasil degradasi, dan komponen matriks dari sediaan analit. Dalam prosedur ini juga harus dapat menentukan senyawa pengganggu agar dapat ditentukan kadar senyawa dalam analit yang sesuai sehingga data yang didapatkan sesuai dengan persyaratan (Hansen, 2012). Ditentukan resolusi dari titik puncak data yang didapatkan dari hasil respon alat densitometer. Resolusi hasil harus memenuhi persyaratan yaitu nilainya disekitar 1,5 (AOAC, 2002).

2.5.3 Akurasi

Keakuratan dari sebuah prosedur analitik dapat didefinisikan sebagai kedekatan hasil uji yang diperoleh dengan nilai sebenarnya. Keakuratan, yang biasa disebut sebagai kemurnian dari suatu senyawa, dapat ditentukan dengan menerapkan prosedur analitik terhadap analit yang diuji dari kemurnian yang diketahui. Akurasi dapat ditunjukkan hasilnya dengan dua cara, yaitu dalam persentase perolehan kembali atau dengan perbandingan antara nilai rata-rata data dan nilai sesungguhnya yang diterima (Hansen, 2012). Rentang yang digunakan sebagai persyaratan nilai akurasi adalah antara 85-110% dihitung sebagai persentase perolehan kembali (AOAC, 2002).

2.5.4 Presisi

Presisi dari suatu prosedur analitik mengungkapkan kedekatan antara hasil pengujian individual bila prosedur diterapkan berulang kali untuk beberapa sampel. Tujuannya untuk melihat prosedur yang dilakukan bisa diulang atau tidak. Presisi biasanya dinyatakan sebagai standar deviasi (SD) atau standar deviasi relatif (%RSD) dari rata-rata serangkaian pengukuran. Pengulangan biasanya dilakukan dibawah kondisi perlakuan yang sama selama interval waktu yang

singkat, dan biasanya dilakukan oleh analis yang sama dengan peralatan yang sama dan dilakukan dalam tempat yang sama pada satu hari. Nilai %RSD harus kurang dari 4% untuk memenuhi persyaratan (Hansen, 2012).

2.5.5 *Limit of Detection* (LOD)

Batas deteksi prosedur analitik individual adalah jumlah analit terendah dalam sampel, yang dapat dideteksi namun tidak perlu dihitung sebagai nilai pasti. Pengujian ini adalah untuk mengetahui batas, yang membuktikan bahwa jumlah analit berada di atas atau di bawah tingkat tertentu. Batas deteksi biasanya dinyatakan sebagai konsentrasi analit dalam sampel (Hansen, 2012).

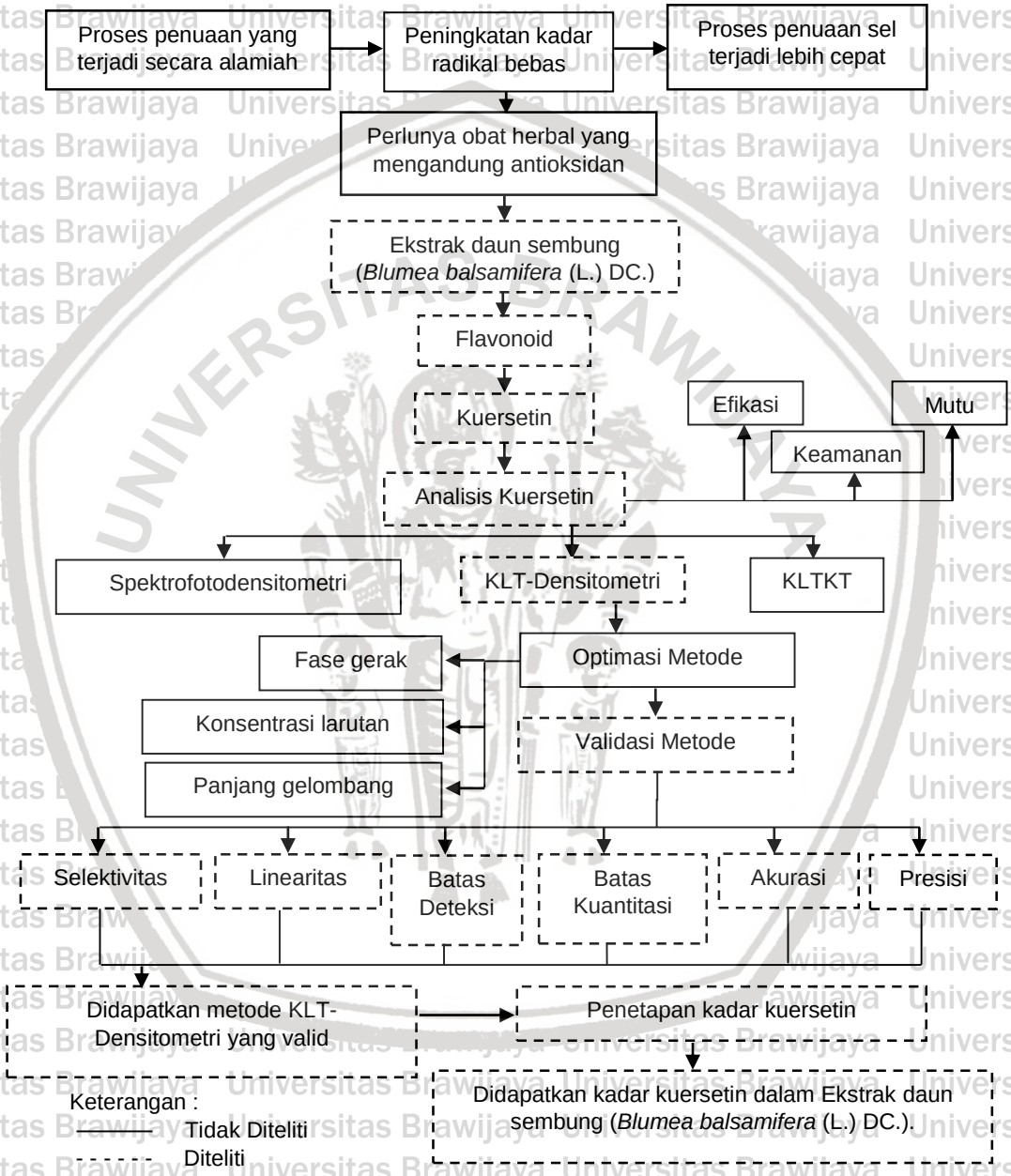
2.5.6 *Limit of Quantitation* (LOQ)

Batas kuantitasi adalah batas dari jumlah analit terendah dalam sampel, yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan akurasi dan ketepatan yang sesuai. Batas kuantifikasi merupakan parameter penentuan kuantitatif tingkat rendah senyawa dalam sampel. Tujuan penentuan batas kuantifikasi adalah untuk penentuan produk pengotor atau degradasi bahan aktif dan produk formulasi dan bioanalisis untuk penentuan kuantitatif kadar rendah zat obat dalam matriks biologis (Hansen, 2012).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Penelitian terkait validasi metode KLT-densitometri pada ekstrak tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) ini bertujuan untuk mendapatkan metode yang valid dalam analisis kadar kuersetin pada ekstrak tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.), seperti yang digambarkan pada kerangka konsep penelitian (Gambar 3.1). Penelitian dilakukan berdasarkan pada latar belakang meningkatnya jumlah radikal bebas dalam tubuh sehingga proses penuaan terjadi lebih cepat. Diperlukan senyawa antioksidan tambahan untuk mengimbangi peningkatan radikal bebas dalam tubuh. Hal ini menyebabkan penelitian terkait zat antioksidan yang mudah untuk dijangkau dan aman untuk dikonsumsi meningkat. Salah satu dari zat antioksidan yang populer dalam pengembangan pengobatan adalah kuersetin. Kuersetin, yang termasuk dalam golongan senyawa flavonoid, dalam pengembangannya banyak ditemukan didalam tanaman, salah satunya sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.).

Dalam penelitian untuk analisis kadar kuersetin, dapat digunakan metode KLT-densitometri untuk mengukur secara kuantitatif kadar senyawa kuersetin dalam ekstrak tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.). Diperlukan penentuan kandungan senyawa bioaktif pada ekstrak tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) untuk menentukan efikasi, mutu, dan keamanannya, sehingga dilakukan standarisasi senyawa kuersetin sebagai senyawa target dengan dilakukan penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.).

Persyaratan untuk uji validasi agar metode yang digunakan dapat dipercaya dan memberikan hasil yang sesuai dan valid, memiliki beberapa parameter yang harus dipenuhi, yaitu spesifisitas, linieritas, akurasi yang dinyatakan dalam persentase perolehan kembali, presisi yang dinyatakan dengan

parameter simpangan baku relatif (RSD), batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK) yang dinyatakan dalam rumus *Limit of Detection* (*LOD*) dan *Limit of Quantitation* (*LOQ*).

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Hasil dari validasi metode KLT-densitometri pada analisis kadar kuersetin dalam ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) memenuhi persyaratan parameter validasi metode.
2. Terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi etanol terhadap kadar kuersetin pada ekstrak etanol daun sembung.

BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental dengan metode KLT-Densitometri untuk analisis kadar kuersetin dalam ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.).

4.2 Sampel

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) dari Materia Medika Batu (MMB) menggunakan etanol 96% dan 70% sebagai pelarut.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut ekstraksi.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan pada penelitian ini adalah persen kadar kuersetin.

4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol yang digunakan selama penelitian ini adalah proses ekstraksi sampel, komposisi fase gerak, dan panjang gelombang maksimum.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2018 sampai dengan November 2018 di Laboratorium Kimia Analisis Farmasi Universitas Brawijaya dan Laboratorium Kimia Analisis Materia Medika Batu (MMB).

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak kental daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) yang diekstraksi dengan etanol 96% dari Materia Medika Batu, simplisia kering daun sembung, etanol 70%, kertas saring, standar kuersetin *Sigma-Aldrich*® ≥95% HPLC, metanol *Sigma-Aldrich*® p.a, asam format *Sigma-Aldrich*® p.a, kloroform *Sigma-Aldrich*® p.a, heksana *Sigma-Aldrich*® p.a, dan etil asetat *Sigma-Aldrich*® p.a.

4.5.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah lempeng KLT (silika GF_{254} nm), Densitometer *(TLC scanner CAMAG®)*, *Rotary evaporator IKA®*, toples kaca besar, corong, pipa kapiler, pipet tetes, batang pengaduk, gelas kimia, pinset, gelas ukur 10 ml, labu ukur 50 ml dan 10 ml, penggaris, alat tulis, kamera, neraca analitik *OHAUS*®, dan *chamber* eluen *CAMAG*®.

4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak kental tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) adalah ekstrak dari daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) yang diekstraksi dengan etanol 96% dan 70%.
2. Kuersetin pada daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) adalah salah satu zat aktif senyawa golongan flavonoid yang terdapat dalam ekstrak

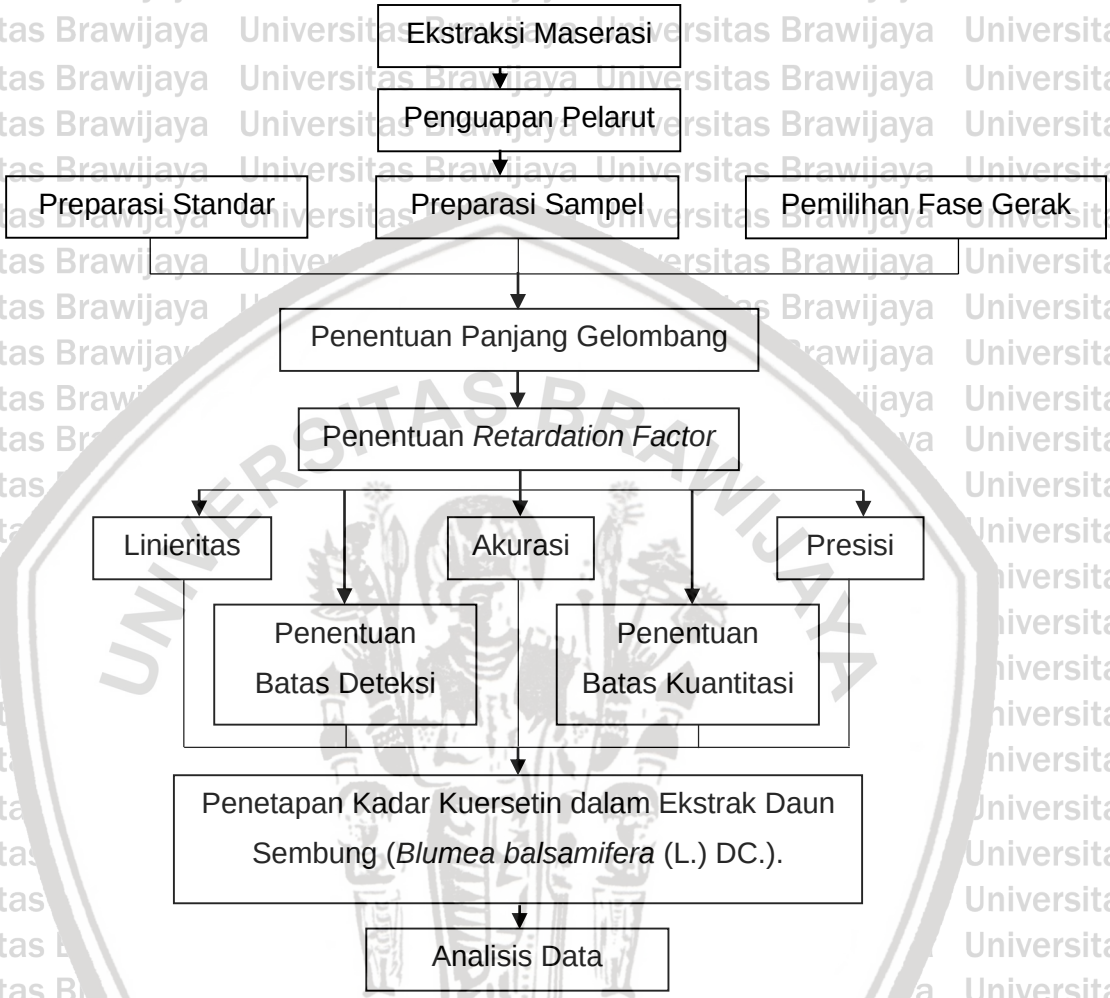
`

kental daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) yang memiliki aktivitas biologis.

3. Validasi metode adalah pengujian untuk menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan bersifat akurat, spesifik, dapat diulang, dan tahan pada kisaran analitik yang akan dianalisis.
4. Linieritas adalah perbandingan antara analit dalam sampel dan hasi respon alat sehingga mendapatkan hasil yang berbanding lurus dengan jumlah analit dalam sampel.
5. Selektivitas atau spesifisitas adalah kemampuan untuk menilai hanya suatu senyawa tertentu yang terkandung didalam analit secara cermat dan seksama.
6. Akurasi adalah kedekatan hasil uji yang diperoleh dengan nilai sebenarnya sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran.
7. Presisi adalah kedekatan antara hasil pengujian individual bila prosedur diterapkan berulang kali untuk sampel yang homogen.
8. Batas deteksi didefenisikan sebagai jumlah analit terendah dalam sampel, yang dapat dideteksi namun tidak perlu dihitung sebagai nilai pasti.
9. Batas kuantitasi merupakan batas dari jumlah analit terendah dalam sampel, yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan akurasi dan presisi yang sesuai.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Prosedur Penelitian

4.7.2 Ekstraksi Maserasi

Simplisia kering daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) ditimbang sebanyak 100 gram dengan neraca analitik *OHAUS*® dan ditambahkan etanol 96% dan etanol 70% pada toples kaca besar tempat maserasi dilakukan. Etanol yang ditambahkan menggunakan perbandingan 1:10 sehingga digunakan 1 L pada masing-masing ekstrak. Proses maserasi berlangsung selama 24 jam dengan remaserasi sebanyak satu kali. Selanjutnya ekstrak cair dipisahkan dari

matriksnya dengan kertas saring. Pelarut dari ekstrak cair diuapkan dengan *rotary evaporator IKA®* sehingga didapatkan ekstrak kental dari masing-masing sampel.

4.7.3 Spesifisitas

4.7.3.1 Preparasi Standar

Standar kuersetin ditimbang sebanyak 50 mg dengan menggunakan neraca analitik *OHAUS®*, kemudian dilarutkan dengan etanol pada labu ukur 50 mL sehingga didapatkan larutan standar dengan konsentrasi 1000 µg/mL.

4.7.3.2 Preparasi Sampel

Pada Farmakope Herbal Indonesia, disebutkan bahwa ekstrak kental daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) memiliki flavonoid total tidak kurang dari 2,40% yang dihitung sebagai kuersetin. Sehingga, ekstrak tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) ditimbang sebanyak 200 mg dengan menggunakan neraca analitik *OHAUS®*, kemudian dilarutkan dengan etanol pada labu ukur 10 mL.

4.7.3.3 Pemilihan Fase Gerak

Fase diam yang digunakan adalah silika GF_{254}. Sedangkan, fase gerak yang gunakan adalah heksana: etil asetat: asam format: metanol (3:3:0,8:0,2), dan kloroform: etil asetat: asam format: metanol (3:3:0,8:0,2). Untuk pemeriksaan secara kualitatif, dilakukan penotolan larutan sampel dan larutan standar. Kedua larutan tersebut ditotolkan sebanyak 6 µL, kemudian dieluasi dengan fase gerak tersebut. Dari dua macam fase gerak tersebut, dilihat fase gerak yang memiliki kemampuan terbaik untuk memisahkan kuersetin dari komponen-komponen lainnya.

`

4.7.4 Penentuan Panjang Gelombang

Larutan standar ditotolkan pada plat KLT silika GF_{254} sebanyak 6 µL, kemudian dieluasi dengan fase gerak yang terpilih. Noda yang diperoleh diamati spektrumnya dengan densitometer. Panjang gelombang yang terpilih adalah panjang gelombang yang memberikan titik puncak tertinggi.

4.7.5 Penentuan *Retardation Factor* (R_f) dan Resolusi (Rs)

Larutan sampel diekstraksi ditotolkan pada plat KLT silika GF_{254} sebanyak 6 µL, kemudian dihitung nilai R_f. Nilai R_f dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$Rf = \frac{jarak\ migrasi\ komponen}{jarak\ migrasi\ fase\ gerak}$$

Setelah nilai Rf ditentukan, dihitung juga puncak terdekat dari analit dan dibandingkan dengan analit untuk menghitung nilai resolusi. Nilai resolusi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$Rs = \frac{2(t_b - t_a)}{w_b + w_a}$$

Dimana, t_b adalah Rf maksimum puncak tinggi, t_a adalah Rf maksimum puncak rendah, w_b adalah lebar Rf puncak tinggi, dan w_a adalah lebar Rf puncak rendah.

4.7.6 Linieritas

Larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 1000 µg/mL diambil sebanyak 750; 1000; 1250; 1750 dan 2000 µL dan dilarutkan masing-masing dalam etanol pada labu ukur 10 mL sehingga didapatkan kadar menjadi 75; 100; 125; 175 dan 200 µg/mL. Kemudian ditotolkan pada plat KLT Silika GF_{254} sebanyak 10 µL, sehingga didapatkan jumlah kuersetin pada setiap totolan 0,75; 1,00; 1,25; 1,75; dan 2,00 µg. Setelah itu, plat KLT dieluasi dengan fase gerak yang terpilih

`

dan diamati noda yang diperoleh dengan densitometri serta dihitung nilai persamaan regresinya y = bX + a, koefisien korelasi (r) dan koefisien variasi fungsi (Vxo).

4.7.7 Penentuan Akurasi

Larutan baku standar kuersetin 1000 ppm diencerkan menggunakan etanol pada labu ukur 10 ml dengan mengambil 1,2 mL larutan baku untuk konsentrasi 120 ppm sebagai nilai 80%, 1,5 mL larutan baku untuk konsentrasi 150 ppm sebagai nilai 100%, dan 1,8 mL larutan baku untuk konsentrasi 180 ppm sebagai nilai 120%. Setiap konsentrasi dilakukan pengulangan pembuatan sebanyak 3 kali mulai dari pengambilan larutan baku sehingga didapatkan 9 larutan uji. Setelah itu, setiap larutan uji ditotolkan sejumlah 10 µL dan dieluasikan pada fase gerak terpilih untuk mengamati pemisahan dan hasil noda setelah dieluasi. Kemudian hasil noda yang telah dipindai dengan densitometer dibandingkan dengan persamaan kurva baku untuk mendapatkan konsentrasi uji dan diamati keakuratannya dengan konsentrasi yang sesungguhnya sehingga didapatkan persentase perolehan kembali (%*recovery*). Rentang yang digunakan sebagai persyaratan nilai kaurasi adalah antara 85-110% dihitung sebagai persentase perolehan kembali.

4.7.8 Penentuan Presisi

Larutan uji pada prosedur akurasi digunakan untuk penentuan nilai presisi dengan dilihat standar deviasi relatif (%RSD) dari hasil noda setelah dipindai dengan densitometer. Nilai %RSD dari hasil noda harus kurang dari 4% untuk memenuhi persyaratan.

`

4.7.9 Penentuan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 1000 µg/mL diambil sebanyak 750; 1000; 1250; 1750 dan 2000 µL dan dilarutkan masing-masing dalam etanol pada labu ukur 10 mL sehingga didapatkan kadar menjadi 75; 100; 125; 175 dan 200 µg/mL. Kemudian masing-masing larutan ditotolkan pada plat KLT Silika GF_{254} sebanyak 10 µL. Setelah itu dieluasi secara bersamaan dengan fase gerak yang terpilih dan diamati noda yang diperoleh dengan densitometri serta diperoleh nilai LOD dan LOQ.

4.7.10 Penetapan Kadar Kuersetin Dalam Ekstrak Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)

Larutan sampel ditotolkan pada plat KLT Silika GF_{254} sebanyak 10 µL. Kemudian dieluasi dengan fase gerak yang terpilih. Setelah itu diamati noda yang diperoleh dan dimasukkan ke persamaan regresi linier serta dihitung kadar kuersetin yang terdapat dalam kedua sampel. Setelah diketahui kadar kuersetin dari kedua sampel, dilakukan uji statistik dengan menguji normalitas, homogenitas dan dilanjutkan dengan *independent t-test* untuk membandingkan kadar dari kedua sampel.

4.8 Analisis Data

4.8.1 Selektivitas (Spesifisitas)

Pengujian spesifisitas ditentukan dengan nilai R_f antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan. Nilai resolusi yang terhitung harus berada disekitar 1,5.

`

4.8.2 Linieritas

Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (*slope*), intersepsi, dan koefisien korelasinya. Hasil koefisien korelasi yang tinggi, seperti diatas 0,99, menjadi penentu linieritas yang baik. Selain itu, nilai koefisien variasi (Vxo) berada dibawah 5% juga dapat menentukan linieritas yang baik.

4.8.3 Akurasi (Kecermatan)

Uji akurasi (kecermatan) ditentukan berdasarkan persyaratan nilai akurasi yang digunakan yaitu antara 85-110% dihitung sebagai persentase perolehan kembali.

4.8.4 Presisi (Keseksamaan)

Uji presisi (keseksamaan) ditentukan dengan parameter RSD (*Relative Standard Deviation*) yang dirumuskan sebagai berikut:

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} x\ 100\%$$

Keterangan:

%RSD = Standar deviasi relatif (%)

SD = Standar deviasi

$\bar{X}$ = Kadar rata-rata zat pada sampel

Nilai standar deviasi relatif dari hasil perhitungan harus kurang dari 4% untuk memenuhi persyaratan.

`

4.8.5 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi yang dirumuskan sebagai berikut (Małgorzata Dołowy et al., 2014):

$$LOD = \frac{3Sy}{b}$$

$$LOQ = \frac{10Sy}{b}$$

Dimana Sy adalah standar deviasi respon dan b adalah slope.

4.8.6 Penetapan Kadar Kuersetin dalam Ekstrak Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)

Menurut Farmakope Herbal Indonesia, diketahui bahwa kandungan senyawa kuersetin pada ekstrak kental daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) sebesar 2,40%. Hasil perhitungan kadar dalam penelitian ini dihitung sebagai persentase massa kuersetin terhadap massa ekstrak. Digunakan uji *independent t-test* untuk melihat perbedaan kadar yang bermakna antara ekstrak dengan pelarut etanol 96% dan dengan etanol 70%.

`

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Ekstraksi

Simplisia kering daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) ditimbang sebanyak 100 gram dan diekstraksi sebanyak dua kali didalam toples dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% dan 70% dengan perbandingan 1:10 selama 24 jam. Dilakukan remaserasi sebanyak 1 kali untuk memaksimalkan ekstraksi senyawa. Kemudian ekstrak cair disaring dengan kertas saring untuk memisahkan antara ekstrak cair dan matriks.

(a) (b)

Gambar 5.1 (a) Ekstrak Kental Daun Sembung dengan Pelarut Etanol 70%; (b) Ekstrak Kental Daun Sembung dengan Pelarut Etanol 96%

Setelah didapatkan ekstrak cair dari maserasi, dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator IKA®* hingga menghasilkan ekstrak kental sebanyak 8 gram untuk sampel 96% dan 10,48 gram untuk sampel 70%. Dari hasil ekstraksi menggunakan etanol 96% dan 70%, didapatkan rendemen ekstrak secara berurutan sebesar 8% dan 10,48%.

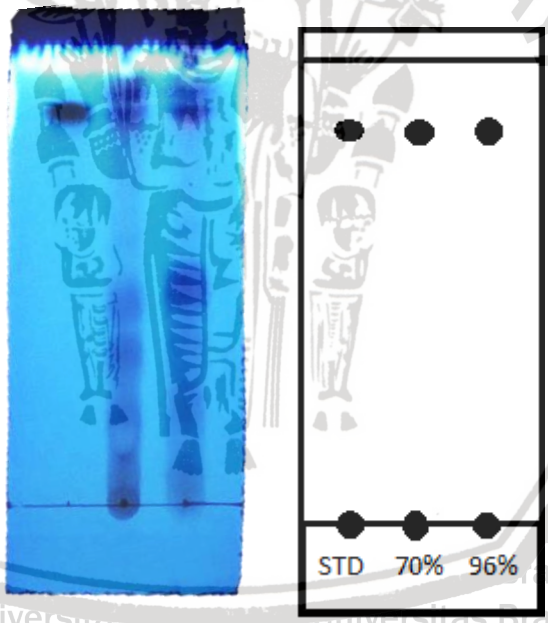
5.2 Preparasi Standar Kuersetin dan Sampel

Standar kuersetin ditimbang sebanyak 50 mg dengan neraca analitik *OHAUS®* dan dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 50 ml, sehingga didapatkan larutan baku induk kuersetin 1000 ppm. Sampel dari masing-masing

ekstrak ditimbang sebanyak 200 mg menggunakan neraca analitik *OHAUS*® dan dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 10 ml, sehingga didapatkan larutan sampel untuk diuji.

5.3 Hasil Optimasi Sistem KLT-Densitometri

Sebelum proses uji validitas, dilakukan optimasi pada beberapa fase gerak terhadap standar kuersetin dan sampel, sehingga terpilih kloroform: etil asetat: asam format: metanol (3:3:0,8:0,2) sebagai fase gerak yang memiliki pemisahan terbaik dan didapatkan nilai Rf dari ketiga noda sama yaitu sebesar 0,8375. Hasil dari optimasi fase gerak diamati pada sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm.



(a) (b)

Gambar 5.2 (a) Hasil Optimasi Pada Sinar UV 366 nm, (b) Skema Hasil Optimasi

Setelah dilakukan perhitungan resolusi dari hasil pemindaian alat densitometer, didapatkan hasil resolusi telah memenuhi persyaratan, yaitu sekitar 1,5.

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Resolusi.

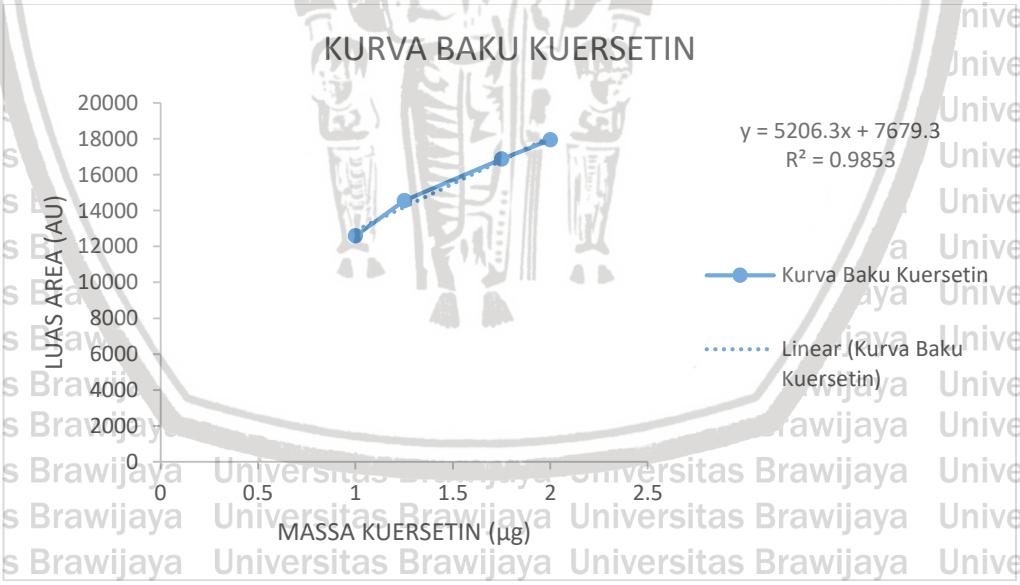
Sampel	Rf awal	Rf Maksimum	Rf Akhir	Wa	Wb	Resolusi
0.75	0.64	0.66	0.68	0.04	0.09	1.08
µg	0.68	0.73	0.77			
1.00	0.63	0.65	0.67	0.04	0.10	0.86
µg	0.67	0.71	0.77			
1.25	0.63	0.65	0.67	0.04	0.09	0.92
µg	0.67	0.71	0.76			
1.75	0.63	0.65	0.67	0.04	0.09	0.92
µg	0.67	0.71	0.76			
2.00	0.63	0.65	0.67	0.04	0.11	0.80
µg	0.67	0.71	0.78			
70%(1)	0.69	0.75	0.81	0.12	0.04	0.87
	0.81	0.82	0.85			
70%(2)	0.69	0.75	0.81	0.12	0.04	0.87
	0.81	0.82	0.85			
70%(3)	0.69	0.75	0.81	0.12	0.05	0.82
	0.80	0.82	0.85			
96%(1)	0.68	0.75	0.80	0.12	0.05	0.82
	0.80	0.82	0.85			
96%(2)	0.69	0.75	0.81	0.12	0.05	0.94
	0.81	0.83	0.86			
96%(3)	0.70	0.76	0.82	0.12	0.05	0.94
	0.82	0.84	0.87			

Selain itu, dilakukan juga penentuan panjang gelombang maksimum dengan diamati hasil respon alat densitometer pada panjang gelombang antara 200-700 nm. Didapatkan hasil seperti yang terdapat pada lampiran 4, bahwa nilai panjang gelombang dengan hasil respon maksimum berada pada rentang 300-350 nm.

5.4 Parameter Validasi

5.4.1 Linieritas

Hasil dari linieritas digunakan untuk mengevaluasi hasil dari konsentrasi analit yang berupa luas area dibawah kurva hasil respon dari alat densitometer. Untuk itu, dilakukan preparasi standar kuersetin dengan 5 konsentrasi yang berbeda, yaitu 75, 100, 125, 175, dan 200 ppm. Setelah preparasi selesai, kelima konsentrasi tersebut ditotolkan sejumlah 10 µL pada plat KLT yang telah disiapkan dan dieluasi pada fase gerak terpilih. Selanjutnya, hasil eluasi dipindai menggunakan alat densitometer pada panjang gelombang 366 nm untuk melihat densitasnya. Kemudian, massa kuersetin standar dibandingkan dengan hasil respon alat yang berupa luas area dibawah kurva (*Area Under Curve* (AUC)) sehingga didapatkan persamaan kurva baku y=5206,3x+7679,255 dengan r^2 sebesar 0.9853. Kurva baku yang terbentuk dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 5.3 Kurva Baku Kuersetin.

Dilihat dari koefisien korelasi yang tinggi, hasil linieritas persamaan kurva baku diatas belum memenuhi persyaratan (r^2>0,99). Selain dilihat dari koefisien korelasi, juga dilihat dari parameter lainnya yaitu koefisien variasi (Vxo) dari linieritas dengan membandingkan antara standar deviasi dari fungsi (Sxo) dan

rata-rata dari massa kuersetin yang digunakan. Standar deviasi fungsi didapat dari perbandingan simpangan baku residual (Sy) dengan slope dari fungsi. Rumus simpangan baku residual yang digunakan seperti yang ada pada rumus dibawah ini:

$$Sy = \sqrt{\frac{\sum(y - y1)^2}{N - 2}}$$

Hasil perhitungan Vxo ditampilkan pada tabel berikut:

Tabel 5.2 Persamaan Kurva Baku Linieritas

Massa Kuersetin (µg)	Luas Area (AU)	Luas Area Terhitung (AU)	(Y-Y1)²
1	12589.1	12885.535	87873.70922
1.25	14556.2	14187.105	136231.119
1.75	16868.7	16790.245	6155.187025
2	17940.7	18091.815	22835.74322
			253095.7585

$Sy = 355{,}74$

$Sxo = 0{,}0683$

$Vxo = 4{,}555\%$

Dari hasil perhitungan diatas, nilai Vxo telah memenuhi persyaratan (Vxo<5%).

5.4.2 Akurasi dan Presisi

Akurasi dan presisi dilakukan untuk mengetahui kedekatan hasil uji yang diperoleh dengan nilai sebenarnya sehingga didapatkan data yang presisi dan akurat. Oleh karena itu, disiapkan standar kuersetin dengan konsentrasi 120 ppm sebagai nilai 80%, 150 ppm sebagai nilai 100%, dan 180 ppm sebagai nilai 120%. Setiap konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali untuk melihat konsistensi dari preparasi sampel dan standar yang dilakukan peneliti.

Pengulangan pembuatan standar dilakukan mulai dari pengambilan larutan baku induk 1000 ppm. Dari data akurasi yang didapat, diambil juga datanya untuk menghitung nilai %RSD sehingga dapat dibandingkan dengan persyaratan presisi data.

Setelah dilakukan eluasi terhadap 10 µL dari masing-masing sampel dan dipindai dengan alat densitometer, hasil pembacaan dibandingkan dengan persamaan kurva baku untuk mendapatkan konsentrasi uji dan dibandingkan dengan konsentrasi yang sesungguhnya untuk melihat keakuratannya. Hasil dari pengulangan dihitung %RSD untuk menentukan nilai presisi.

Setelah dimasukkan kedalam persamaan kurva baku, didapatkan hasil uji akurasi dan presisi dalam tabel berikut:

Tabel 5.3 Hasil uji akurasi dan presisi

Sampel	Luas Area (AU)	Massa Kuersetin (µg)	%Recovery (%)	SD Massa (µg)	%RSD (%)
80%(1)	14581.4	1.33	110.48	0.064	5.09
80%(2)	14037.8	1.22	101.78		
80%(3)	13980.1	1.21	100.85		
100%(1)	15391.6	1.48	98.76	0.085	5.38
100%(2)	15944.0	1.59	105.83		
100%(3)	16261.8	1.65	109.90		
120%(1)	17807.5	1.95	108.08	0.141	7.36
120%(2)	18282	2.04	113.14		
120%(3)	16842.1	1.76	97.78		

Dilihat dari hasil uji akurasi dan presisi, dapat dinyatakan bahwa data telah memenuhi persyaratan. Dilihat dari hasil perhitungan, dapat dinyatakan bahwa *%recovery* telah memenuhi persyaratan dengan berada dalam rentang 85-110%. Namun, untuk %RSD-nya tidak memenuhi persyaratan (%RSD ≤4%).

5.4.3 LOD dan LOQ

Setelah didapatkan persamaan kurva baku dari linieritas senyawa kuersetin, ditentukan batas deteksi dan batas kuantitasi dari persamaan kurva baku tersebut untuk memastikan bahwa data yang didapat berada diatas batas dan dipastikan dapat diamati dengan persamaan kurva baku yang ada. Digunakan rumus sebagai berikut (Małgorzata Dołowy *et al*., 2014):

$$LOD = \frac{3Sy}{b}$$

$$LOQ = \frac{10Sy}{b}$$

Dimana Sy adalah standar deviasi dari fungsi dan b adalah slope.

Dari hasil perhitungan yang telah dilakukan, didapatkan nilai LOD sebesar 0,2050 µg dan LOQ sebesar 0,6833 µg.

5.5 Penetapan Kadar

Sampel yang sudah dipreparasi dalam labu ukur 10 ml ditotolkan sejumlah 10 µL pada plat KLT dan dilakukan pengulangan hingga 3 kali untuk melihat ketelitian sampel. Setelah itu, plat dieluasi pada fase gerak terpilih dan dipindai dengan alat densitometer untuk melihat AUC sehingga kadar sampel dapat diketahui melalui perbandingan dengan persamaan kurva baku dari linieritas.

Setelah dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku, didapatkan kadar kuersetin dalam sampel ekstrak dengan pelarut etanol 96% dan 70% secara berurutan adalah 0,74±0,022% dan 0,39±0,004% seperti yang ditampilkan pada tabel berikut:

Tabel 5.4 Hasil Penetapan Kadar Ekstrak Daun Sembung dengan Etanol 96% dan 70%

Sampel	Luas Area (AU)	Kadar (%)	Rata-Rata (%)	SD
Ekstrak	8170.4	0.39		
Etanol	8147	0.39	0.39	0.004
70%	8060.9	0.39		
Ekstrak	14207	0.76		
Etanol	13967.4	0.75	0.74	0.022
96%	13504.7	0.72		

Dari hasil uji penetapan kadar, diketahui bahwa kadar kuersetin pada ekstrak daun sembung dengan pelarut etanol 70% lebih kecil daripada dengan pelarut etanol 96%. Untuk mengetahui bahwa kadar ekstrak etanol 96% berbeda signifikan dengan kadar ekstrak etanol 70%, dilakukan uji statistik menggunakan *independent t-test*. Uji statistik menunjukkan data terdistribusi normal (p>0,05), sehingga dapat dilanjutkan dengan uji parametrik *independent t-test*. Data yang diperoleh dapat terbaca dengan baik pada aplikasi, sehingga hasilnya terdapat perbedaan bermakna antara kedua hasil sampel yang didapatkan (p<0,05).

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian ini diambil berdasarkan dari proses penuaan yang terjadi secara ilmiah karena sel mengalami degenerasi akibat oksidasi didalam sel tubuh. Peningkatan radikal bebas dalam tubuh memicu proses oksidasi pada sel sehingga protein dan DNA yang terdapat dalam sel menjadi rusak. Radikal bebas juga bisa didapat dari polusi udara, asap rokok, dan alkohol sehingga menyebabkan stres oksidatif, yaitu tingkat antioksidan dalam tubuh lebih sedikit dibandingkan jumlah radikal bebas yang diterima oleh tubuh (Moini, 2002; Ames, 1993). Fungsi dari antioksidan adalah untuk menghentikan reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas sehingga kerusakan sel dapat dihindari. Senyawa antioksidan paling banyak ditemukan dalam bentuk senyawa fenolik dan polifenolik seperti yang terdapat dalam tumbuhan. Senyawa antioksidan yang paling banyak ditemukan dalam tumbuhan biasanya berupa senyawa fenolik dan polifenolik, contohnya kuersetin yang termasuk golongan flavonoid (Ramle, 2008).

Tanaman sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) dipilih sebagai tanaman uji karena memiliki kadar kuersetin yang cukup tinggi, terutama pada bagian daunnya (Depkes RI, 2009). Pada penelitian analisis kuersetin pada ekstrak daun sembung dengan metode RP-HPLC didapatkan kadar kuersetin sekita 0,135 hingga 0,294 mg per gram simplisia kering daun sembung (Toralba, 2012). Dilakukan standarisasi kadar senyawa kuersetin dari tanaman sembung untuk menjamin kualitas, mutu, dan keamanan khasiat yang optimal (BPOM, 2011).

Pada awal penelitian, peneliti melakukan ekstraksi simplisia kering daun sembung untuk memisahkan senyawa kuersetin dari matriks. Proses ekstraksi menggunakan etanol 96% dan 70% dikarenakan senyawa kuersetin larut dalam etanol dan pelarut etanol merupakan salah satu pelarut yang aman untuk dikonsumsi sehingga penelitian ini dapat dikembangkan kedalam penelitian selanjutnya untuk pengembangan pengobatan di masyarakat. Metode ekstraksi yang dipilih adalah maserasi karena pada metode maserasi tidak dilakukan pemanasan sehingga kerusakan senyawa dapat dihindari dan proses ekstraksi berjalan optimal. Setelah itu, larutan disaring dengan kertas saring untuk memisahkan antara ekstrak cair dengan matriks dari simplisia daun sembung. Untuk dapat diukur kadar senyawa kuersetin pada ekstrak dengan terstandar, dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator IKA®* sehingga didapatkan ekstrak kental daun sembung. Pada ekstrak kental, berat yang ditimbang tidak mudah berubah karena kadar dari pelarut etanol sangat kecil, sehingga ketelitiannya meningkat (Depkes RI, 2000).

Setelah didapatkan ekstrak kental dengan pelarut etanol 96% dan 70%, kedua sampel tersebut ditimbang sebanyak 200 mg dan dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 10 ml sehingga didapatkan larutan sampel untuk diuji. Penimbangan sampel ditujukan untuk mengetahui bobot sampel dan untuk dibandingkan dengan kadar kuersetin setelah pengukuran, sehingga kadar kuersetin dari ekstrak dapat ditentukan.

Standar kuersetin dipreparasi dengan ditimbang 50 mg standar kuersetin dan dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 50 ml sehingga didapatkan larutan standar kuersetin 1000 ppm. Digunakan standar kuersetin sebagai senyawa pembanding untuk analisis kadar kuersetin dalam sampel dan untuk mengetahui

nilai Rf pada plat KLT dengan fase gerak terpilih. Proses eluasi bertujuan untuk memisahkan antar senyawa berdasarkan polaritas dari masing-masing senyawa (Depkes RI, 2009).

Fase gerak ditentukan berdasarkan pada pemisahan senyawa terbaik dan kecocokan dengan standar pada Rf tertentu. Pada penelitian ini, fase gerak yang terpilih adalah kloroform: etil asetat: asam format: metanol (3:3:0,8:0,2) (Donde, 2017) dengan alasan pemisahan dari senyawa pada ekstrak terlihat jelas dan perbedaan nilai Rf dengan standar tidak signifikan. Nilai Rf yang didapatkan pada hasil optimasi adalah 0,8375 pada panjang gelombang 366 nm. Dihitung juga nilai resolusi dari hasil optimasi, dan didapatkan bahwa hasil resolusi telah memenuhi persyaratan, yaitu nilai berkisar 1,5 (AOAC, 2002).

Setelah diketahui nilai Rf, panjang gelombang, dan fase gerak, dilakukan uji linieritas untuk mengetahui peningkatan konsentrasi akan sebanding dengan peningkatan hasil respon dari densitometer. Pada alat densitometer, respon yang dihasilkan berupa AUC, yaitu intensitas cahaya yang dipantulkan dari senyawa pada plat KLT yang disinari UV 366 nm. Pada sinar UV 366 nm, senyawa akan memantulkan cahaya karena memiliki gugus kromofor berupa ikatan rangkap terkonjugasi dari senyawa kuersetin sehingga senyawa dapat berfluoresens (Mythili, 2013). Massa dari senyawa kuersetin pada noda berbanding lurus dengan nilai respon (AUC) yang diamati dalam alat densitometer. Setelah nilai respon per massa yang diketahui sudah didapatkan, hasilnya dibandingkan dengan massanya untuk mendapatkan persamaan regresi linier**.** Persamaan regresi yang didapatkan dari penelitian ini belum memenuhi persyaratan ($r^2 \geq 0,99$). Selain itu, dilihat koefisien variasi (Vxo) dari linieritas sebagai parameter selain koefisien

korelasi. Dari hasil perhitungan yang sudah dilakukan, didapatkan hasil Vxo telah memenuhi persyaratan (Vxo ≤ 5%) (AOAC, 2002).

Setelah didapatkan persamaan linieritas, penelitian ini dilanjutkan dengan menghitung nilai akurasi dan presisi dari sistem KLT-Densitometri. Digunakan 3 konsentrasi yang berbeda dengan pengulangan 3 kali. Hasil pengujian akurasi yang dinyatakan dalam *%recovery* telah memenuhi persyaratan dengan nilai akurasi diantara 85-110%. Tetapi, hasil uji presisi tidak memenuhi persyaratan karena nilai %RSD berada diatas 4% (AOAC, 2002; Hansen, 2012). Maka dari itu, dapat disimpulkan bahwa data akurat, namun kurang presisi karena konsistensi data yang rendah.

LOD dan LOQ ditetapkan untuk memberikan batasan terhadap data yang didapat sehingga data berada diatas batas dan dapat diamati dengan persamaan linieritas yang telah ditentukan. Hasil dari perhitungan antara simpangan baku residual dan slope dari persamaan linieritas adalah 0,2050 µg untuk LOD dan 0.6833 µg untuk LOQ.

Sesudah pengujian validitas, dilakukan penetapan kadar terhadap sampel ekstrak dalam pelarut etanol 96% dan 70% dengan dieluasi dalam fase gerak terpilih dan diamati dengan alat densitometer untuk mengetahui nilai respon dari senyawa kuersetin pada sampel. Setelah itu, nilai respon dimasukkan kedalam persamaan kurva baku untuk mendapatkan kadar kuersetin. Dilihat juga konsistensi per sampel dengan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dan diamati %RSDnya. Setelah dilakukan pengamatan, diketahui bahwa kadar ekstrak dalam pelarut etanol 96% dan 70% secara berurutan adalah 0,74±0,022% dan 0,39±0,004%. Dari hasil tersebut, terlihat bahwa kadar kuersetin pada ekstrak daun sembung dengan pelarut etanol 70% lebih rendah daripada dengan pelarut

etanol 96%. Hal ini disebabkan karena senyawa kuersetin lebih larut dalam etanol, sehingga pada etanol kadar tinggi, jumlah kuersetin yang terlarut lebih banyak (NCBI, 2018).

Dari hasil uji statistik, diketahui bahwa data yang didapatkan telah terdistribusi normal (p>0,05) dan memiliki homogenitas yang baik (p<0,05), sehingga dapat dilanjutkan dengan pengujian statistik dengna *independent t-test*. Hasilnya menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kedua hasil sampel (p<0,05), sehingga dapat dipastikan bahwa perlakuan yang dilakukan pada sampel terdapat perbedaan yang signifikan. Digunakan uji statistik *independent t-test* karena pada sampel ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% tidak saling bergantung antar sampel.

6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian

Validasi metode berguna sebagai penjaminan kualitas dari sediaan obat tradisional sehingga dapat digunakan sebagai pengobatan yang terbukti aman dan berkhasiat bagi kesehatan. Selain itu, dengan dilakukan validasi metode, kadar senyawa bioaktif kuersetin dapat dipastikan ajek pada setiap sediaan yang ada. Senyawa kuersetin setelah dilakukan pada metode ekstraksi maserasi tidak mengalami degradasi sehingga dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya terkait aktivitas farmakologis. Proses ekstraksi juga menggunakan etanol sebagai pelarut sehingga aman untuk dikonsumsi dan dapat dikembangkan menjadi pengobatan untuk masyarakat.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak dilakukan uji *robustness,* dan metode ekstraksi yang dapat memisahkan komponen dengan lebih maksimal.

BAB 7
KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa:

- Data telah memenuhi persyaratan validasi metode dengan nilai resolusi untuk spesifisitas diantara 0,8-1,1; linieritas dengan nilai Vxo 4,555%; akurasi dengan *%recovery* dalam rentang 85-110%; serta nilai LOD dan LOQ secara berturut-turut adalah 0,2050 µg dan 0,6833 µg, namun presyaratan presisi tidak memenuhi persyaratan, yaitu %RSD kurang dari 4%.
- Ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) dengan pelarut etanol 96% memiliki kadar yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak daun sembung dengan pelarut etanol 70%. Kadar dari ekstrak daun sembung dengan pelarut etanol 96% dan 70% secara berurutan adalah 0,74±0,022% dan 0,39±0,004%. Hasil uji statistik *independent t-test* pada hasil penetapan kadar menunjukkan bahwa kadar antara ekstrak daun sembung dengan pelarut etanol 96% dan 70% memiliki perbedaan yang bermakna dengan nilai $p<0,05$.

7.2 Saran

- Perlu dilakukan uji *robustness* dengan memberikan variasi parameter-parameter metode, seperti perbedaan fase gerak, suhu, dan sebagainya.
- Perlu dilakukan ekstraksi dengan alat *speed extractor* yang dapat mengambil ekstrak secara cepat dan efisien.

DAFTAR PUSTAKA

Alrawaiq, N.S., Azman A. A Review of Flavonoid Quercetin: Metabolism, Bioactivity, and Antioxidant Properties. *International Journal of PharmTech Research*. 2014. 6 (3): 933-941.

Ames, B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. Oxidants, Antioxidants, and The Generative Diseases of Aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. 90: 7915-22.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2002. *Official Method of Analysis*, *16th edition*. Association of Official Analytical. Washington DC.

Badan Pengawas Obat dan Minuman (BPOM). 2011. Persyaratan Teknis *Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik*. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia nomor HK.03.1.23.06.11.5629. Jakarta.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI). 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat.* Direktorat Jendral POM-Depkes RI. Jakarta.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI). 2009. *Farmakope Herbal Indonesia edisi pertama*. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia nomor 261/MENKES/SK/IV/2009. Jakarta.

Department of Traditional Medicine. 2004. *Medicinal Plants of Myanmar*. Ministry of Health. Naypyidaw.

Dołowy, M., Katarzyna K.K., dan A. Pyka. Validation of a Thin-Layer Chromatography for the Determination of Hydrocortisone Acetate and Lidocaine in a Pharmaceutical Preparation. *The Scientific World Journal*. 2014. 2014: 1-10.

Donde, K., A. Shinde. Simultaneous Estimation of Gallic Acid, Quercetin and Kaempferol from *Euphorbia prostrata* W. Ait by High Performance Thin Layer Chromatography. *Int J Pharma Bio Sci*. 2017. 8(4): 61-67.

Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O. Quantitative Kinetic Analysis of Hydrogen Transfer Reactions from Dietary Polyphenols to the DPPH Radical. *J. Agric. Food Chem*. 2003. 51: 615-622.

Hansen, S., Stig P., Knut R. 2012. *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis.* John Wiley & Sons Ltd. West Sussiex.

Khopkar. 1990. *Concepts of Analytical Chemistry*. Diterjemahkan oleh Sapto Raharjo. Universitas Indonesia Press. Jakarta.

Materska, M. 2008. *Quercetin and Its Derivatives: Chemical Structure and Bioactivity*. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. Lublin.

Moini, H, Packer L., Saris N-E. L. Antioxidant and Prooxidant Activities of a Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2002. 182: 84-90.

Mythili, T. dan R. Ravindhran. Determination of Quercetin by HPTLC Method in *Sesbania sesban* (L.) Merr. Stem Extract. *IJAPBC*. 2013. 2(1): 113-119.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). *PubChem Compound Database; CID=5280343*, (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343, Diakses pada 24 Maret 2018).

Oyzurt, D., Birsen D., dan Resat A. 2011. *Determination of Total Antioxidant Capacity by a New Spectrofluorometric Method Based on Ce(IV) Reduction: Ce(III) Fluorescence Probe for CERAC Assay.* Springer Science. Istanbul.

Pang, Y. 2014. *Blumea balsamifera-A Phytochemical and Pharmacological Review*. Hainan Provincial Engineering Research Center. Hainan.

Rahman, A. 2009. *Kromatografi Untuk Analisis Obat*. Graha Ilmu. Yogyakarta.

Ramle, S.F.M., Kawamura F., Sulaiman O., Hashim R. 2008. Study on antioxidant activities, total phenolic compound, and antifungal properties of some Malaysian timbers from selected hardwoods species. *International Conference of Environmental Research and Technology*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Riyanto, S. 2013. *Kromatografi KLT.* Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

Schuler, P. 1990. Natural Antioxidant Exploited Comercially. dalam *Husdont BJF, Food Antioxidants.* Elsevier Applied Science. New York.

Subeki. 1998. *Pengaruh Cara Pemasakan Terhadap Kandungan Antioksidan Beberapa Macam Sayuran serta Daya Serap dan Retensinya Pada Tikus Percobaan*. Tesis Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Toralba, J.V. RP-HPLC Analysis of Quercetin in the Extract of Sambong (Blumea balsamifera (L.) DC.) Leaves. *Science Diliman*. 2012. 27 (1): 48-63.

United States Department of Agriculture (USDA). Plants Profile for Blumea balsamifera (Ngai Camphor). *Classification*, (Online), (https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=BLBA2, diakses 19 April 2018).