

**VALIDASI METODE ANALISIS KUERSETIN  
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA  
TINGGI DAN APLIKASINYA PADA EKSTRAK ETANOL  
DAUN BIDARA LAUT (*Strychnos ligustrina* Blume)**

**SKRIPSI**



oleh:

Wahyu Setyaningsih

165010077

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS WAHID HASYIM  
SEMARANG  
Januari 2021**

**VALIDASI METODE ANALISIS KUERSETIN  
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA  
TINGGI DAN APLIKASINYA PADA EKSTRAK ETANOL  
DAUN BIDARA LAUT (*Strychnos ligustrina* Blume)**

**SKRIPSI**

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat  
dalam mencapai derajat Sarjana Farmasi  
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi  
Universitas Wahid Hasyim**

oleh:

Wahyu Setyaningsih

165010077

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS WAHID HASYIM  
SEMARANG  
Januari 2021**

## INTISARI

### VALIDASI METODE ANALISIS KUERSETIN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI DAN APLIKASINYA PADA EKSTRAK ETANOL DAUN BIDARA LAUT (*Strychnos ligustrina* Blume)

Daun bidara laut (*Strychnos ligustrina* Blume) mengandung senyawa flavonoid yang terbukti memiliki aktivitas antioksidan. Senyawa yang terkandung dalam tanaman bidara laut yaitu fenolik, flavonoid, alkaloid, tanin dan saponin. Salah satu senyawa flavonoid yaitu kuersetin. Flavonoid termasuk senyawa polar sehingga dapat dipisahkan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode analisis kuersetin menggunakan metode KCKT dan aplikasinya pada ekstrak etanol daun bidara laut (EEDBL).

Daun bidara laut diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, penguapan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental. Analisis kuersetin menggunakan alat KCKT (Jasco) yang dilengkapi dengan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 371 nm. Fase diam yang digunakan yaitu C<sub>18</sub> (Lichrospher) dan fase gerak metanol:air (59:41, v/v) dengan laju alir 1,2 mL/menit. Metode yang digunakan untuk menetapkan kadar EEDBL divalidasi meliputi uji linieritas, sensitivitas, selektivitas, presisi dan akurasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua uji validasi memenuhi persyaratan. Nilai-nilai parameter uji linieritas dengan nilai korelasi ( $r$ ) = 0,9997, LOD sebesar 0,104 µg/mL dan LOQ 0,348 µg/mL, selektivitas baik, uji presisi dengan %RSD ≤ 2% dan uji akurasi sebesar 99,968%-100,149%. Metode yang divalidasi dapat diaplikasikan untuk menetapkan kadar kuersetin pada EEDBL dengan kadar yang diperoleh adalah 0,192%.

Kata kunci : ekstrak daun bidara laut, KCKT, kuersetin, validasi.

## **ABSTRACT**

### **VALIDATION OF QUERCETINE ANALISYS USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METODS AND ITS APPLICATION ON ETHANOL EXTRACT LEAVES OF BIDARA LAUT (*Strychnos ligustrina* Blume)**

*The leaves of bidara laut (*Strychnos ligustrina* Blume) contain flavonoid compounds which are proven to have antioxidant activity. The compound contained in bidara leaf in phenol, flavonoids, alkaloids, tannin and saponin. One of the flavonoid compounds is quercetin. Flavonoids is polar in nature so that it can be separated using high performance liquid chromatography (HPLC). This study aims to validate the quercetin analysis method using the HPLC method and its applied to the ethanol extract of the leaves of bidara laut (EELBL).*

*The leaves of bidara laut extracted using the maceration method with 70% ethanol solvent, evaporation using a rotary evaporator to obtain a thick extract. Analisis of quercetine content using the HPLC tool (Jasco) equipped with a UV-Vis detector at a mavelength 371 nm. Using mobile phasemethanol : water (59:41) and using C<sub>18</sub> column (Lichrospher) with water rate 1,2 mL/menit. The method used to determine the validated EELBL level includes tests of linearity, sensitivity, selectivity, precision and accuracy.*

*The results showed that all validation tests met the requirements. Parameter values linearity with the correlation ( $r$ ) = 0,9997, LOD 0,104  $\mu\text{g/mL}$  and the LOQ 0,348  $\mu\text{g/mL}$ , good selectivity, precision test %RSD  $\leq 2\%$  and accuracy 99,968%-100,149%. The validated method can be applied to determine the quercetin level in EELBL with the level obtained is 0,192%.*

*Keywords : extracted bidara leaf, HPLC, quercetin, validation.*

**PENGESAHAN SKRIPSI**

**Berjudul**

**VALIDASI METODE ANALISIS KUERSETIN  
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA  
TINGGI DAN APLIKASINYA PADA EKSTRAK ETANOL  
DAUN BIDARA LAUT (*Strychnos ligustrina* Blume)**

oleh:  
Wahyu Setyaningsih  
165010077

**Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim  
Pada tanggal: 27 Januari 2021**

Pembimbing Utama,



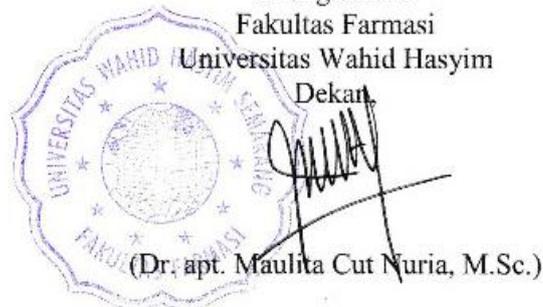
(apt. Aqnes Budiarti, M.Sc.)

Pembimbing Pendamping,



(apt. Emy Susanti, M.Biomed.)

Mengetahui:  
Fakultas Farmasi  
Universitas Wahid Hasyim  
Dekan



(Dr. apt. Maulita Cut Nuria, M.Sc.)

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Wahyu Setyaningsih

NIM : 165010077

Judul Skripsi : Validasi Metode Analisis Kuersetin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan Aplikasinya pada Ekstrak Etanol Daun Bidara Laut (*Strychnos ligustrina* Blume).

Dengan ini menyatakan bahwa dalam skripsi saya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah skripsi saya dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Demikian surat pernyataan ini dibuat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Semarang, 27 Januari 2021

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized initial 'W' with a star symbol above it, followed by the letters 'Setyaningsih' in a cursive script.

Wahyu Setyaningsih

***“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.”***

***(QS. Al-Insyirah ; 5)***

*Kupersembahkan untuk:*

*Kedua orang tuaku tercinta, bapak Sholikin dan ibu Rasningsih atas  
segala doa dan perjuangannya selama ini*

*Adikku Pramudya Setiawan dan segenap keluarga tercinta*

*Almamater sebagai wujud terima kasih dan khidmahku*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “**Validasi Metode Analisis Kuersetin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan Aplikasinya pada Ekstrak Etanol Daun Bidara Laut (*Strychnos ligustrina* Blume)**”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam memperoleh derajat Sarjana Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim.

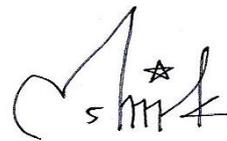
Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan berbagai pihak. Untuk itu penulis ingin mengucapkan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Dr. apt. Maulita Cut Nuria, M.Sc. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim.
2. Ibu apt. Aqnes Budiarti, M.Sc. dan apt. Emy Susanti, M.Biomed. selaku pembimbing yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran memberikan bimbingan kepada penulis selama penyusunan skripsi.
3. Dosen Penguji yang bersedia meluangkan waktu dan memberikan saran, masukan dan koreksi terhadap skripsi ini.
4. Seluruh dosen di Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim yang telah memberikan bekal ilmu pengetahuan sebagai dasar penulisan skripsi ini.

5. Seluruh Staf Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Kimia Analisis Universitas Wahid Hasyim yang telah membantu untuk penelitian di Laboratorium.
6. Teman seperjuangan Melissa Oktavia yang saling membantu dan memberi semangat hingga penyusunan skripsi ini selesai.
7. Sahabatku Aprillia Sulistiyaningtyas, S.E yang telah memberikan doa dan dukungannya dalam segala hal.
8. Dan semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah banyak membantu pada penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dan jauh dari sempurna skripsi ini, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi dunia farmasi yang sebagai mana mestinya .

Semarang, 27 Januari 2021

A handwritten signature in black ink, featuring a stylized 'W' and 'S' with a small star above the 'S'.

Wahyu Setyaningsih

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
INTISARI.....	ii
<i>ABSTRACT</i> .....	iii
PENGESAHAN SKRIPSI .....	iv
SURAT PERNYATAAN.....	v
PERSEMBAHAN .....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	3
C. Tujuan Penelitian .....	3
D. Manfaat Penelitian .....	3
E. Tinjauan Pustaka .....	4
1. Daun Bidara Laut ( <i>Strychnos ligustrina</i> Blume).....	4
a. Definisi .....	4
b. Klasifikasi Tanaman.....	4
c. Morfologi Daun Bidara Laut .....	5
d. Kandungan Daun Bidara Laut .....	5
2. Ekstraksi .....	5
3. Kuersetin .....	6
4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) .....	7
a. Wadah fase gerak .....	8
b. Pompa.....	9
c. Injektor .....	9
d. Kolom.....	9
e. Detektor .....	10
5. Validasi.....	10
a. Linieritas.....	10
b. Sensitivitas.....	11

c. Selektivitas .....	11
d. Presisi (Ketelitian) .....	11
e. Akurasi (Ketepatan) .....	12
F. Landasan Teori.....	13
G. Hipotesis.....	14
BAB II. METODE PENELITIAN .....	15
A. Bahan dan Alat Penelitian .....	15
1. Bahan.....	15
2. Alat .....	15
B. Jalannya Penelitian.....	15
1. Determinasi Tanaman.....	15
2. Preparasi Daun Bidara Laut.....	16
a. Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Bidara Laut .....	16
b. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Bidara Laut (EEDBL) .....	17
3. Identifikasi Senyawa Flavonoid .....	18
a. Uji Shinoda.....	18
b. Uji Kromatografi Lapis Tipis .....	18
4. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin .....	19
5. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	19
6. Pembuatan Fase Gerak .....	19
7. Optimasi Fase Gerak .....	20
8. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin .....	20
9. Validasi.....	21
a. Uji Linieritas.....	21
b. Uji Sensitivitas .....	21
c. Uji Selektivitas .....	21
d. Uji Presisi (Ketelitian).....	22
e. Uji Akurasi (Ketepatan) .....	22
10. Penetapan Kadar Kuersetin Ekstrak Etanol Daun Bidara Laut .....	24
C. Analisis Data .....	24
BAB III. PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....	25
A. Determinasi Tanaman .....	25
B. Pengumpulan dan Pengeringan Daun Bidara Laut .....	25
C. Pengumpulan Serbuk dan Ekstraksi Daun Bidara Laut .....	26

D. Identifikasi Senyawa Flavonoid.....	27
1. Uji Shinoda.....	27
2. Uji Kromatografi Lapis Tipis .....	28
E. Optimasi Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin.....	29
F. Optimasi Fase Gerak .....	30
G. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin .....	32
H. Validasi Metode Analisis .....	34
1. Uji linieritas .....	34
2. Uji Sensitivitas .....	34
3. Uji Selektivitas .....	35
4. Uji Presisi (Ketelitian).....	36
5. Uji Akurasi (Ketepatan) .....	37
I. Penetapan Kadar Kuersetin Ekstrak Etanol Daun Bidara Laut.....	39
BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN .....	41
A. Kesimpulan .....	41
B. Saran.....	41
DAFTAR PUSTAKA .....	42
LAMPIRAN.....	45

## DAFTAR TABEL

Tabel I. Hasil optimasi komposisi fase gerak. ....	32
Tabel II. Hasil kurva baku kuersetin. ....	33
Tabel III. Hasil uji presisi kadar kuersetin. ....	37
Tabel IV. Hasil uji akurasi kadar kuersetin. ....	38
Tabel V. Hasil uji kadar kuersetin pada EEDBL. ....	40

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Daun bidara laut ( <i>Strychnos ligustrina</i> Blume).....	4
Gambar 2. Struktur kuersetin (Harizon dkk., 2016). .....	7
Gambar 3. Diagram blok sistem KCKT (Ardianingsih, 2009). .....	8
Gambar 4. Reaksi flavonoid dengan logam Mg dan HCl (Ergina dkk., 2014).....	28
Gambar 5. Hasil KLT identifikasi senyawa kuersetin. ....	29
Gambar 6. Hasil <i>scanning</i> optimasi panjang gelombang larutan induk kuersetin.	30
Gambar 7. Hasil kromatogram optimasi komposisi fase gerak. ....	31
Gambar 8. Hasil grafik kurva baku kuersetin. ....	34
Gambar 9. Hasil kromatogram kuersetin dengan fase gerak metanol:air (59:41).	36
Gambar 10. Hasil kromatogram kuersetin pada EEDBL.....	39

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Determinasi Daun Bidara Laut.....	46
Lampiran 2. Perhitungan Simplisia dan Ekstrak Daun Bidara Laut.....	49
Lampiran 3. Perhitungan Larutan Induk Kuersetin.....	50
Lampiran 4. Perhitungan Sampel EEDBL.....	52
Lampiran 5. Perhitungan Uji Kromatografi Lapis Tipis.....	53
Lampiran 6. Contoh Kromatogram Kurva Baku Kuersetin.....	54
Lampiran 7. Contoh Kromatogram Sampel EEDBL.....	56
Lampiran 8. Perhitungan LOD dan LOQ Kuersetin.....	58
Lampiran 9. Contoh Perhitungan Perolehan Kembali Kuersetin.....	61
Lampiran 10. Contoh Perhitungan Kadar Sampel EEDBL.....	63
Lampiran 11. Dokumentasi Penelitian.....	64

## **BAB I. PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Daun bidara laut (*Strychnos ligustrina* Blume) adalah suatu jenis tanaman yang bisa digunakan sebagai obat tradisional (Marwat dkk., 2009). Daun bidara laut diketahui memiliki kandungan fitokimia seperti fenolik, flavonoid, alkaloid, tanin maupun saponin (Setiawan dkk., 2014). Saat ini banyak penelitian yang dilakukan terhadap senyawa antioksidan dari bahan alam. Sumber antioksidan alami berasal dari tumbuhan dan umumnya mengandung senyawa fenolat dan flavonoid. Senyawa ini berperan sebagai antioksidan dengan cara menghambat terbentuknya radikal bebas dengan mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuan menangkap logam dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Redha, 2010).

Kuersetin merupakan golongan flavonoid yang menunjukkan beberapa aktivitas biologi. Aktivitas ini dikaitkan dengan sifat antioksidan kuersetin yang memiliki kemampuan menangkap radikal bebas dan spesi oksigen reaktif seperti anion superoksida dan radikal hidroksil (Moektiwardoyo dkk., 2011). Flavonoid adalah salah satu golongan fenol alam terbesar. Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksi yang tidak tersubstitusi atau tersubstitusi suatu gula. Flavonoid larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dan air (Markham, 1988). Flavonoid sebagai senyawa antioksidan berfungsi menetralkan radikal bebas (Madiyahati dkk., 2017).

Nugraha dan Ghozali (2014) melakukan validasi metode penetapan kadar kuersetin ekstrak etanol kulit buah apel menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Pengembangan metode menggunakan fase diam yaitu C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm) dan fase gerak metanol:air (59:41), kecepatan alir : 1,2 mL/menit, detektor : UV pada panjang gelombang 371,50 nm. Optimasi dalam analisis senyawa kuersetin didapatkan hasil waktu retensi 6,138 menit. Penelitian ini diperoleh hasil bahwa uji kualitatif dan kuantitatif kuersetin dapat dilakukan dengan menggunakan KCKT fase terbalik dilengkapi detektor spektrofotometer UV. Senyawa kuersetin diperoleh kadar rata-rata sebesar 0,014%.

Sukmawati dkk. (2019) melakukan penelitian analisis kadar kuersetin ekstrak etanol daun miana secara KCKT dengan menggunakan fase diam kolom C<sub>18</sub> dan fase gerak metanol:air (59:41). Detektor UV-Vis pada panjang gelombang 369,11 nm. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun miana memiliki kadar kuersetin yaitu 0,312%.

KCKT adalah teknik pemisahan yang paling banyak digunakan karena memiliki kelebihan dalam hal sederhana, praktis dan sensitif. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Validasi metode analisis dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (Gandjar dan Rohman, 2007).

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dilakukan penelitian tentang analisis kuersetin ekstrak etanol daun bidara laut (EEDBL) menggunakan metode KCKT.

## **B. Rumusan Masalah**

1. Apakah validasi metode analisis kuersetin pada EEDBL dapat dilakukan dengan KCKT dan aplikasinya?
2. Berapa kadar kuersetin pada EEDBL yang ditetapkan menggunakan metode analisis yang telah tervalidasi?

## **C. Tujuan Penelitian**

1. Melakukan validasi metode analisis kuersetin pada EEDBL dengan KCKT dan aplikasinya.
2. Mengetahui kadar kuersetin menggunakan KCKT yang telah tervalidasi.

## **D. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan bermanfaat sebagai sumber pengetahuan ilmu baru yang memberikan informasi kepada masyarakat tentang kadar kuersetin pada EEDBL menggunakan KCKT.

## E. Tinjauan Pustaka

### 1. Daun Bidara Laut (*Strychnos ligustrina* Blume)

#### a. Definisi

Bidara laut (*Strychnos ligustrina* Blume) merupakan tanaman yang tumbuh di daerah tropis dan subtropis. Bagian dari tanaman ini digunakan sebagai obat tradisional pada berbagai penyakit (Marwat dkk., 2009). Daun bidara laut dalam kehidupan sehari-hari dapat digunakan sebagai pohon ruqyah dan obat-obatan herbal (Taufiq, 2018).



Gambar 1. Daun bidara laut (*Strychnos ligustrina* Blume).

#### b. Klasifikasi Tanaman

Klasifikasi bidara laut yaitu sebagai berikut (Setiawan dkk., 2014) :

Kingdom : Plantae

Devisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Gentianales

Famili : Loganiaceae

Genus : *Strychnos*

Spesies : *Strychnos ligustrina* Blume

Synonim: *Strychnos lucina* R.Br

### c. Morfologi Daun Bidara Laut

Daun bidara laut merupakan pohon kecil yang diameter batang dapat mencapai 30 cm dengan tinggi rata-rata 12 m, bagian daun mempunyai ukuran sekitar 2,6-6,1 cm x 1,7-3,7 cm dan bagian bawah daun pada umumnya mempunyai warna yang lebih pucat daripada bagian atasnya. Bidara laut yang masih muda mempunyai duri dan batang membengkok, bertulang daun 3 dan bergerigi lemah. Mempunyai buah yang bisa dimakan berbentuk bulat dengan diameter 20-30 mm (Setiawan dkk., 2014).

### d. Kandungan Daun Bidara Laut

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa daun bidara laut diketahui memiliki kandungan fitokimia seperti fenolik, flavonoid, alkaloid, tanin maupun saponin. Bidara laut digunakan untuk mengobati berbagai penyakit seperti malaria, sakit perut, mual, sakit gigi, darah tinggi dan demam. Daun bidara laut berkhasiat sebagai anticacing dan antioksidan, serta daun banyak digunakan untuk bahan baku kosmetik (Setiawan dkk., 2014). Hasil fitokimia yang dilakukan bahwa pada daun bidara terdapat senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan fenol (Noviyanti dkk., 2019).

## **2. Ekstraksi**

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dari proses mengekstraksi senyawa aktif simplisia nabati atau simplisia hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Pelarut diuapkan agar memperoleh ekstrak kental. Ekstrak didapatkan dari hasil ekstraksi. Ekstraksi adalah suatu proses penarikan kandungan kimia yang

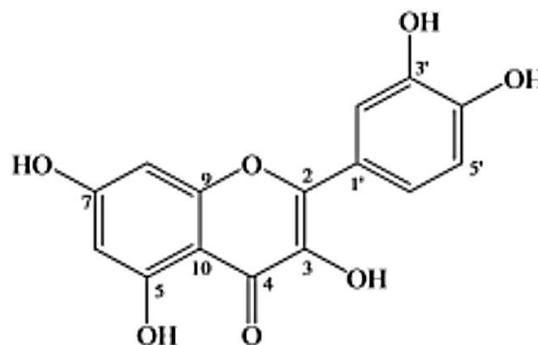
dapat larut sehingga dapat terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair (Depkes RI, 2000).

Maserasi merupakan proses pengekstrakan simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Pengadukan yang dilakukan pengadukan kontinu (terus-menerus). Prinsip metode maserasi yaitu mencapai konsentrasi pada keseimbangan dalam senyawa terlarut. Remaserasi dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama (Depkes RI, 2000). Kelebihan metode maserasi adalah prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, tidak dipanaskan sehingga bahan alam tidak menjadi terurai (Nurhasnawati dkk., 2017).

### **3. Kuersetin**

Kuersetin merupakan golongan flavonoid yang menunjukkan beberapa aktivitas biologi. Aktivitas ini dikaitkan dengan sifat antioksidan kuersetin yang memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas dan spesi oksigen reaktif seperti anion superoksida dan radikal hidroksil (Moektiwardoyo dkk., 2011). Kuersetin digunakan sebagai larutan standar karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keto pada C-4 dan memiliki gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol (Azizah dkk., 2014). Kuersetin termasuk senyawa polifenol yang bersifat polar dan memiliki banyak gugus kromofor yang bisa terdeteksi pada panjang gelombang di atas 360 nm (Dijk dkk., 2000).

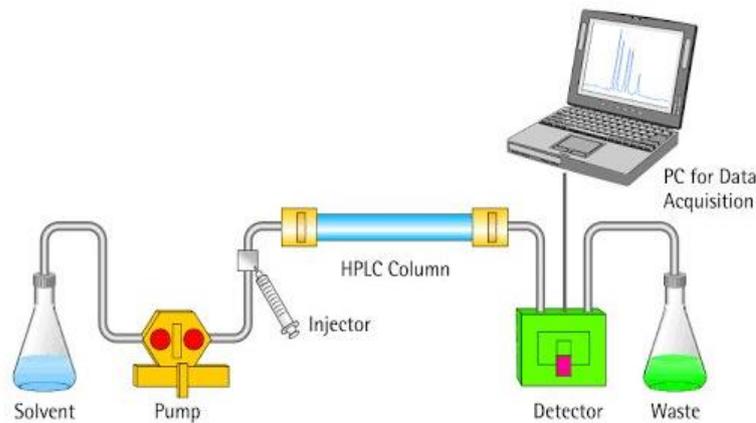
Flavonoid merupakan suatu senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksi yang tidak tersubstitusi atau tersubstitusi suatu gula. Flavonoid larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton dan air (Markham, 1988). Flavonoid terdiri dari beberapa golongan yaitu antosianin, flavon, flavonol, biflavonil, khalkon, auron, flavanon dan isoflavon (Harborne, 1996). Flavonoid sebagai senyawa antioksidan dan berfungsi menetralkan radikal bebas, dengan demikian meminimalkan efek kerusakan pada sel dan jaringan tubuh juga sangat baik untuk pencegahan kanker, meningkatkan efektivitas vitamin C, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotik (Madiyawati dkk., 2017).



Gambar 2. Struktur kuersetin (Harizon dkk., 2016).

#### 4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik dan anorganik, senyawa biologis, analisis ketidakhayuan dan analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap. KCKT juga sering digunakan untuk penetapan kadar senyawa tertentu seperti asam amino, asam nukleat dan protein-protein dalam cairan biologis, menentukan kadar senyawa-senyawa aktif obat dan lain-lain (Gandjar dan Rohman, 2007).



Gambar 3. Diagram blok sistem KCKT (Ardianingsih, 2009).

Instrumental KCKT pada dasarnya terdiri atas delapan komponen pokok yaitu: wadah fase gerak, sistem penghantaran fase gerak, alat untuk memasukkan sampel, kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, tabung penghubung dan suatu komputer atau integrator atau perekam (Gandjar dan Rohman, 2007).

Instrumental yang terdapat dalam KCKT terdiri dari :

a. Wadah fase gerak

Wadah fase gerak harus bersih dan lembam (*inert*). Wadah ini biasanya dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan *degassing* (penghilangan gas), adanya suatu gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis. Saat membuat pelarut untuk fase gerak, maka sangat dianjurkan untuk menggunakan pelarut, buffer dan reagen dengan kemurnian yang sangat tinggi. Fase gerak sebelum digunakan harus disaring terlebih dahulu untuk menghindari partikel-partikel kecil. Adanya pengotor dalam reagen dapat menyebabkan gangguan pada sistem kromatografi (Gandjar dan Rohman, 2007).

b. Pompa

Syarat pompa untuk KCKT yaitu pompa harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/menit. Tujuan penggunaan pompa untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduisibel, konstan dan bebas dari gangguan (Gandjar dan Rohman, 2007).

c. Injektor

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel internal atau eksternal. Saat pengisian sampel, sampel digelontor melewati keluk sampel dan kelebihanya dikeluarkan ke pembuang. Saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak mengalir melewati keluk sampel dan menggelontor sampel ke kolom (Gandjar dan Rohman, 2007).

d. Kolom

Kolom merupakan bagian sangat penting dari kromatografi. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor. Dalam prakteknya kolom mikrobor ini tidak setahan kolom konvensional (Gandjar dan Rohman, 2007).

e. Detektor

Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu detektor universal (mendeteksi zat secara umum dan tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrofotometri massa dan golongan detektor spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV, Visibel, detektor fluoresensi dan elektrokimia (Gandjar dan Rohman, 2007).

## 5. Validasi

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter suatu prosedur untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan dan didefinisikan sebagaimana cara penentuannya (Harmita, 2004). Parameter tersebut antara lain :

a. Linieritas

Linieritas adalah suatu kemampuan untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Rentang atau kisaran disebut sebagai konsentrasi terendah dan tertinggi yang mana suatu metode analisis menunjukkan linieritas, presisi dan akurasi yang telah terpenuhi. Kisaran konsentrasi yang diuji bergantung pada jenis metode dan kegunaannya, akan tetapi pada pengujian komponen utama, maka konsentrasi baku harus diukur mendekati atau sama dengan konsentrasi analit yang diharapkan (Gandjar dan Rohman, 2007).

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi  $r$  pada analisis regresi linier  $Y = bx + a$ . hubungan linier ideal dicapai jika nilai  $b = 0$

dan  $r = +1$  atau  $-1$  bergantung pada arah garis, sedangkan nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Harmita, 2004).

b. Sensitivitas

Batas deteksi (LOD) merupakan konsentrasi terendah dalam sampel yang masih terdeteksi, namun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit berada di atas atau di bawah nilai tertentu. Batas kuantitasi (LOQ) merupakan suatu konsentrasi analit paling terendah pada sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang telah digunakan. LOD dan LOQ diekspresikan sebagai konsentrasi (Gandjar dan Rohman, 2007). Batas deteksi dan kuantitasi bisa dihitung secara statistik dengan garis regresi linier dan kurva kalibrasi (Harmita, 2004).

c. Selektivitas

Selektivitas atau spesifitas suatu metode adalah suatu kemampuan untuk mengukur zat tertentu secara cermat dan seksama dengan adanya campuran senyawa lain yang ada. Selektivitas sering disebut dengan derajat penyimpangan (*degree of bias*) yang dapat dilakukan pada sampel. Metode analisis yang digunakan yaitu kromatografi serta selektivitas ditentukan pada perhitungan daya resolusi ( $R_s$ ) (Harmita, 2004).

d. Presisi (Ketelitian)

Presisi dari suatu metode analisis adalah derajat kesesuaian antara masing-masing hasil uji, jika prosedur diterapkan berulang kali pada sejumlah cuplikan yang diambil dari sampel homogen. Presisi dinyatakan sebagai simpangan baku

atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Presisi dapat dinyatakan sebagai keterulangan (repeatability) atau reproduibel. Pengujian KCKT, presisi yang baik jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi tidak lebih atau sama dengan 2% (Harmita, 2004).

Nilai RSD dirumuskan dengan : variasinya dengan persamaan :

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

Keterangan :

SD = Standar Deviasi

$\bar{x}$  = Kadar rata-rata sampel

e. Akurasi (Ketepatan)

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil pengujian dengan hasil yang sebenarnya. Ketepatan diukur dengan persen perolehan kembali (recovery) menggunakan metode penambahan standar.

Perolehan kembali ditentukan menggunakan rumus:

$$\text{Perolehan Kembali (\%)} = \frac{A-B}{C} \times 100\%$$

Keterangan:

A = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

B = konsentrasi sampel

C = konsentrasi analit yang ditambahkan (Harmita, 2004).

Nilai perolehan kembali bergantung pada matriks sampel, prosedur proses sampel dan konsentrasi analit. Batas penerimaan perolehan kembali adalah 98-102% (Harmita, 2004).

## F. Landasan Teori

Bidara laut merupakan suatu jenis tanaman yang bisa digunakan sebagai obat tradisional (Marwat dkk., 2009). Daun bidara laut diketahui memiliki kandungan fitokimia seperti fenolik, flavonoid, alkaloid, tanin maupun saponin (Setiawan dkk., 2014).

Nugraha dan Ghozali (2014) melakukan validasi metode penetapan kadar kuersetin ekstrak etanol kulit buah apel menggunakan KCKT, fase diam yaitu C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm) dan fase gerak metanol:air (59:41), kecepatan alir : 1,2 mL/menit, detektor : UV pada panjang gelombang 371,50 nm. Penelitian ini diperoleh hasil bahwa uji kualitatif dan kuantitatif kuersetin dapat dilakukan dengan menggunakan KCKT fase terbalik dilengkapi detektor spektrofotometer UV. Senyawa kuersetin diperoleh kadar rata-rata sebesar 0,014%.

Sukmawati dkk. (2019) melakukan penelitian analisis kadar kuersetin ekstrak etanol daun miana secara KCKT dengan menggunakan fase diam kolom C<sub>18</sub> dan fase gerak metanol:air (59:41). Detektor UV-Vis pada panjang gelombang 369,11 nm. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun miana memiliki kadar kuersetin yaitu 0,312%.

Refilda dkk. (2019) melakukan penentuan kuersetin pada ekstrak aseton daun ekor naga dengan metode KCKT menggunakan fase diam C<sub>18</sub> dan fase gerak asetonitril:asam asetat 1% (10:90), laju alir 0,7 mL/menit pada panjang gelombang 272 nm. Penelitian ini diperoleh kadar kuersetin 0,172 mg/gram.

## **G. Hipotesis**

Berdasarkan tinjauan pustaka dan landasan teori, maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

1. Metode analisis kuersetin pada EEDBL dapat tervalidasi.
2. EEDBL memiliki kadar kuersetin dalam jumlah tertentu.

## **BAB II. METODE PENELITIAN**

### **A. Bahan dan Alat Penelitian**

#### **1. Bahan**

Bahan yang digunakan adalah daun bidara laut (*Strychnos ligustrina* Blume) yang diperoleh dari Meteseh, zat standar kuersetin, etanol 70%, metanol dan aqua p.a sebagai fase gerak, etanol p.a, amil alkohol, HCl pekat, Mg serbuk, asam asetat glasial, butanol dan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub>.

#### **2. Alat**

Alat yang digunakan dalam maserasi adalah tampah, kertas payung, blender, oven, *moisture balance*, corong *buchner*, *rotary evaporator* dan alat-alat gelas.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah KCKT (Jasco) terdiri dari pompa (PU 2080 plus), injektor manual, kolom C<sub>18</sub> Lichrospher 100 RP – (125 mm x 4 mm ID, 5µm), detektor UV-Vis (2070 plus) dan pengolahan data pada komputer (Ezchrom elite), spektrofotometer UV (1800 Shimadzu), syringe (Hamilton), digital ultrasonic cleaner (Jeken), mikropipet (Socorex), *membrane filter* 0,45 µm (Whatman), chamber (Camag) dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di Laboratorium Kimia Analisis.

### **B. Jalannya Penelitian**

#### **1. Determinasi Tanaman**

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui identitas tanaman yang digunakan pada penelitian yaitu tanaman daun bidara laut. Determinasi tanaman

dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Diponegoro.

## 2. Preparasi Daun Bidara Laut

### a. Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Bidara Laut

Daun bidara laut segar berwarna hijau dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel. Daun bidara laut sebanyak 3000 gram dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C sampai kering dengan ditandai daun mudah hancur bila diremas dengan tangan. Simplisia disortasi kering untuk memastikan tidak ada pengotor atau memisahkan bagian simplisia yang sudah rusak atau gosong akibat pengovenan. Simplisia kering dibuat serbuk dengan menggunakan alat penyerbuk elektrik untuk mendapatkan derajat halus yang sama.

Persyaratan kadar air simplisia kering sebelum dilakukan proses penyaringan yaitu kurang dari 10% (Depkes RI, 1985). Prosedur pemeriksaan kadar air yaitu dengan menimbang kurang lebih 1 gram serbuk daun bidara laut dan dihitung kadar airnya menggunakan alat *moisture balance* didapatkan kadar air 5,0%. Setelah diperoleh hasil kadar air, susut pengeringan serbuk simplisia dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{berat sortasi basah} - \text{berat sortasi kering}}{\text{berat sortasi basah}} \times 100\%$$

Serbuk daun bidara laut disimpan di tempat yang tidak terkena sinar matahari supaya tidak terjadi dekomposisi kandungan senyawa dan diberi silika gel agar dapat tahan lama (Depkes RI, 1985).

b. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Bidara Laut (EEDBL)

Serbuk daun bidara laut sebanyak 200 gram diekstraksi menggunakan metode maserasi. Maserasi serbuk simplisia dimasukkan ke dalam toples kaca yang bersih, ditambahkan cairan penyari etanol 70% sebanyak 1500 mL. Toples kaca ditutup rapat diletakkan pada tempat yang terlindung dari cahaya dan dilakukan selama 3 hari, diaduk 2 kali dalam sehari hingga homogen. Setelah 3 hari dilakukan proses penyaringan, hasil penyaringan ini disebut maserat I. Ampas hasil penyaringan diremaserasi dengan menambahkan etanol 70% sebanyak 500 mL dan diletakkan pada tempat yang terlindung dari cahaya selama 2 hari dengan perlakuan yang sama diaduk 2 kali dalam sehari hingga homogen dan setelah 2 hari dilakukan proses penyaringan. Hasil penyaringan ini disebut maserat II.

Hasil filtrat maserasi dan remaserasi dicampur dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 54°C dengan kecepatan 70 rpm sampai diperoleh ekstrak kental. Setelah diperoleh ekstrak kental daun bidara laut, rendemen ekstrak kental dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental}}{\text{Bobot serbuk simplisia}} \times 100\%$$

Ekstrak kental yang didapatkan kemudian disimpan guna mempertahankan kualitas fisik dan kestabilan kandungan senyawa aktif daun bidara laut sehingga tetap memenuhi persyaratan mutu (Depkes RI, 1985).

### **3. Identifikasi Senyawa Flavonoid**

#### **a. Uji Shinoda**

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan uji shinoda. Ekstrak kental daun bidara laut ditimbang sebanyak 2 gram secara seksama, dilarutkan menggunakan etanol p.a sebanyak 10 mL, kemudian disaring. Larutan ditambahkan Mg serbuk dan amil alkohol 1 mL, kemudian ditambahkan HCl pekat 3 tetes melalui dinding. Dinyatakan positif flavonoid ditunjukkan adanya warna merah, jingga dan hijau (Kristanti dkk., 2008).

#### **b. Uji Kromatografi Lapis Tipis**

Identifikasi senyawa kuersetin dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Adapun cara kerja KLT sebagai berikut (Yuda dkk., 2017):

- 1). Ditimbang EEDBL sebanyak 100 mg dilarutkan menggunakan etanol p.a, kemudian disaring.
- 2). Ditimbang kuersetin sebanyak 100 mg dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dilarutkan menggunakan metanol sampai tanda batas.
- 3). Fase gerak butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5 v/v) dimasukkan ke dalam chamber dan dijenuhkan.
- 4). Disiapkan Fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub> dengan panjang 8 cm dan lebar 5 cm, diaktivasi dengan oven pada suhu 100°C selama 1 jam.
- 5). Ditotolkan EEDBL dan zat pembanding kuersetin pada lempeng KLT yang sudah diaktivasi.
- 6). Lempeng KLT yang sudah ditotolkan sampel dan zat pembanding kuersetin dimasukkan ke dalam chamber yang sudah dijenuhkan, ditunggu hingga berelusi

sampai tanda batas atas. Lempeng dikeluarkan, di hair dryer hingga kering, kemudian diuapi dengan ammonia. Hasil elusi diamati dengan sinar UV 366 nm.

7). Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna kuning coklat setelah diuapi ammonia diamati dengan sinar tampak. Noda yang dihasilkan berwarna kuning atau hijau lembayung yang menandakan adanya senyawa flavonoid. Proses selanjutnya menganalisa Rf.

#### **4. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin**

Kuersetin ditimbang sebanyak 100 mg secara seksama dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. Kuersetin dilarutkan dengan pelarut metanol sampai tanda batas (Kadar kuersetin menjadi 1 mg/mL atau 1000 µg/mL). Larutan induk 1000 µg/mL diambil sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Kuersetin dilarutkan dengan pelarut metanol sampai tanda batas (Kadar kuersetin menjadi 100 µg/mL). Larutan induk 100 µg/mL diambil sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Kuersetin dilarutkan dengan pelarut metanol sampai tanda batas (Kadar kuersetin menjadi 10 µg/mL).

#### **5. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum**

Penentuan panjang gelombang larutan induk kuersetin menggunakan spektrofotometer UV dibuat dengan konsentrasi 4,8 µg/mL. Serapan dibaca pada rentang panjang gelombang 300–400 nm. Dipilih panjang gelombang yang optimal.

#### **6. Pembuatan Fase Gerak**

Fase gerak dari campuran metanol dan air perbandingan (59:41). Pembuatan fase gerak untuk 250 mL diambil 147,5 mL metanol dimasukkan ke dalam labu

takar 250 mL dan ditambahkan 102,5 mL air. Campuran fase gerak disonikasi selama 15 menit (Nugraha dan Ghozali, 2014).

## **7. Optimasi Fase Gerak**

Optimasi komposisi fase gerak yang digunakan terdiri dari campuran fase gerak metanol:air dengan perbandingan metanol:air (55:45 v/v), metanol:air (59:41 v/v), metanol:air (65:35 v/v). Laju alir yang digunakan yaitu 1,2 mL/menit. Perbandingan fase gerak dipilih yang memberikan data paling optimal (Nugraha dan Ghozali, 2014).

## **8. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin**

Kurva baku kuersetin dibuat dengan prosedur (Nugraha dan Ghozali, 2014):

- a. Larutan kuersetin konsentrasi 10 µg/mL dipipet 150; 300; 600; 1200 dan 2400 µL, masing-masing dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL.
- b. Masing-masing labu takar ditambahkan pelarut metanol sampai tanda batas (kadar larutan kuersetin menjadi 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 dan 4,8 µg/mL).
- c. Masing-masing larutan diinjeksikan ke dalam sistem KCKT sebanyak 20 µL dideteksi pada panjang gelombang 371 nm dan laju alir 1,2 mL/menit.
- d. Data luas area kromatogram dibuat persamaan regresi linier  $Y = bx + a$  dengan  $x$  = konsentrasi dan  $y$  = luas area.
- e. Replikasi masing-masing kurva baku sebanyak 3 kali.
- f. Kurva baku dipilih yang memiliki nilai koefisien korelasi ( $r$ ) paling terbesar. Persamaan kurva baku terpilih ini digunakan untuk uji linieritas, sensitivitas dan untuk menetapkan kadar kuersetin pada EEDBL.

## 9. Validasi

### a. Uji Linieritas

Uji linieritas dilakukan dengan menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh dari pembuatan kurva baku. Nilai koefisien korelasi ( $r$ ) dibandingkan dengan persyaratan validasi. Koefisien korelasi ( $r$ ) yang dapat diterima yaitu lebih besar dari 0.99 (Miller dan Miller, 2005).

### b. Uji Sensitivitas

Kepekaan dapat diukur dengan nilai limit deteksi (LOD) dan limit kuantitatif (LOQ), LOD merupakan batas deteksi suatu analit, kadar terkecil analit dalam sampel yang dapat terdeteksi dan masih memberikan respon berbeda dengan respon blanko. Nilai LOD diperoleh dari persamaan  $Y = YB + 3 SB$ . LOQ merupakan kuantitas terkecil dalam sampel yang masih dapat menunjukkan pengukuran secara teliti dan tepat. Nilai LOQ diperoleh dari persamaan  $Y = YB + 10 SB$ . Semakin kecil nilai LOD dan LOQ maka semakin peka suatu metode (Gandjar dan Rohman, 2007).

### c. Uji Selektivitas

Larutan induk kuersetin diinjeksikan sebanyak 20  $\mu$ L ke alat KCKT. Berdasarkan kromatogram dapat dilihat puncak analit standar kuersetin terpisah dengan sempurna. Selektivitas metode dapat ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya ( $R_s$ ) dengan persamaan:

$$R = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

Keterangan :

R = resolusi

$t_{R_1}$  = waktu retensi puncak pertama

$t_{R_2}$  = waktu retensi puncak kedua

$W_1$  = lebar dasar puncak pertama

$W_2$  = lebar dasar puncak kedua

Nilai resolusi digunakan sebagai parameter untuk menunjukkan selektivitas metode analisis berdasarkan pemisahan antar puncak (peak) dengan nilai yang baik  $\geq 2$  (Gandjar dan Rohman, 2007).

d. Uji Presisi (Ketelitian)

Penentuan presisi dilakukan dengan mengukur larutan induk kuersetin dengan seri konsentrasi 0,6; 1,2 dan 2,4 direplikasi sebanyak 6 kali. Presisi ditentukan dengan menghitung standar deviasi masing-masing seri konsentrasi larutan induk kuersetin. Presisi dinyatakan dengan %RSD (Relative Standard Deviation) dan persyaratan  $\%RSD \leq 2$  (Harmita, 2004).

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

Keterangan :

SD = Standar Deviasi

$\bar{x}$  = Kadar rata-rata sampel

e. Uji Akurasi (Ketepatan)

Uji akurasi metode analisis ditentukan dengan parameter persen perolehan kembali dengan metode penambahan baku (*Standard Addition Method*). Sampel ditambahkan bahan baku dengan konsentrasi (80; 100 dan 120% dari kadar

kuersetin). Direplikasi masing-masing sebanyak 3 kali. Uji akurasi dilakukan dengan cara:

- 1). Sampel EEDBL sebanyak 100 mg ditimbang secara seksama.
- 2). Dilarutkan menggunakan metanol ke dalam labu takar 100 mL sampai tanda batas.
- 3). Larutan sampel EEDBL disaring menggunakan *membrane filter* 0,45  $\mu\text{m}$  sebanyak 5 kali hingga bening.
- 4). Larutan sampel ditetapkan kadarnya.
- 5). Larutan sampel ditambah larutan baku kuersetin 80; 100 dan 120%.
- 6). Diinjeksikan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  ke sistem KCKT.
- 7). Masing-masing direplikasi sebanyak 3 kali.
- 8). Perolehan kembali dihitung dengan membandingkan jumlah sampel dengan masing-masing penambahan baku terhadap sampel. Uji ketepatan dilakukan dengan cara sebagai berikut :

$$\text{Perolehan Kembali (\%)} = \frac{A-B}{C} \times 100\%$$

Keterangan:

A = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

B = konsentrasi sampel

C = konsentrasi analit yang ditambahkan (Harmita, 2004).

Nilai perolehan kembali bergantung pada matriks sampel, prosedur proses sampel dan konsentrasi analit. Batas penerimaan perolehan kembali adalah 98-102% (Harmita, 2004).

## **10. Penetapan Kadar Kuersetin Ekstrak Etanol Daun Bidara Laut**

Penetapan kadar kuersetin dilakukan dengan cara:

- a. Sampel EEDBL sebanyak 100 mg ditimbang secara seksama.
- b. dilarutkan dengan metanol ke dalam labu takar 100 mL sampai tanda batas.
- c. Larutan sampel disaring menggunakan *membran filter* 0,45  $\mu\text{m}$  sebanyak 5 kali hingga bening.
- d. Sampel diinjeksikan ke dalam sistem KCKT sebanyak 20  $\mu\text{L}$ .
- e. Dilakukan replikasi sebanyak 6 kali.

### **C. Analisis Data**

Hasil penelitian validasi metode analisis kuersetin pada EEDBL menggunakan metode KCKT dianalisis data secara deskriptif.

**HALAMAN INI TIDAK TERSEDIA**

**BAB III**

**DAPAT DIAKSES MELALUI**

**UPT PERPUSTAKAAN UNWAHAS**

## **BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **A. Kesimpulan**

1. Validasi metode analisis kuersetin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan fase diam kolom C<sub>18</sub> (Lichrospher), fase gerak berupa metanol:air (59:41 v/v) dapat divalidasi dan dapat diaplikasikan untuk menetapkan kadar kuersetin dalam ekstrak etanol daun bidara laut (EEDBL) dan didapatkan hasil uji linieritas dengan nilai korelasi ( $r$ ) = 0,9997, LOD sebesar 0,104 µg/mL dan LOQ 0,348 µg/mL, selektivitas baik, uji presisi dengan %RSD  $\leq$  2% dan uji akurasi sebesar 99,968%-100,149%.
2. Kadar rata-rata senyawa kuersetin pada EEDBL yang dianalisis dengan KCKT sebesar 0,192%.

### **B. Saran**

Perlu dilakukan penelitian tentang kandungan yang lain yang terdapat pada daun bidara laut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anwarulloh, T., Supandi., dan Situmorang, A., 2014, Optimasi dan Validasi Metode Analisis Identifikasi Orto, Meta, dan Para Fenilendiamin dalam Sediaan Pewarna Rambut Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, *Jurnal Pharmacy*, **11**, 49-61.
- Ardianingsih, R., 2009, Penggunaan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) Dalam Proses Analisa Deteksi Ion, *Berita Dirgantara*, **10**, 101-104.
- Asra, R., Azni, N.R., Rusdi., dan Nessa, 2019, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Fraksi Heksan, Fraksi Etil Asetat dan Fraksi Air Daun Kapulaga (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton), *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, **2**, 30-37.
- Azizah, D.N., Kumolowati, E., dan Faramayuda, F., 2014, Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl<sub>3</sub> Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.), *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, **2**, 45-49.
- Backer, C.A., Backhuizen van den Brink, R.C., 1965, *Flora of Java*, Spermatophytes only, Volume I, N.V.P. Noordhoff, Gronigen, The Netherlands.
- Depkes RI., 2000, *Parameter Standard Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Cetakan Persehatan Indonesia, Jakarta.
- Depkes RI., 1985, *Cara Pembuatan Simplisia*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dijk, C. Van., Drissen, A. J., and Kees, R., 2000, The Uncoupling Efficiency and Affinity of Flavonoids for Vesicles, *Biochemical Pharmacology*, **60**, 1593–1600.
- Ergina., Nuryanti, S., dan Puspitasari, I.D., 2014, Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) Yang Diekstraksi Dengan Pelarut Air dan Etanol, *Jurnal Akademika Kimia*, **3**, 165-172.
- Fauzia., dan Larasati, A., 2008, Uji Efek Ekstrak Air dari Daun Avokad (*Persea gratissima*) terhadap Streptococcus Mutans dari Saliva dengan Kromatografi Lapisan Tipis (TLC) dan Konsentrasi Hambat Minimum (MIC), *Majalah Kedokteran Nusantara*, **4**, 173-178.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Cetakkan 1, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.

- Harborne, J. B., 1996, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Ed II. Diterjemahkan oleh Padmawinata K, Sudiro I, Institut Teknologi Bandung.
- Harizon., Pujiastuti, B., Kurnia, D., Sumiarsa, D., Supratman, U., dan Shiono, Y., 2016, Kuersetin dan Kuersetin-3-O-Glukosida dari Kulit Batang *Sonneratia Alba* (*Lythraceae*), *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia*, **1**, 33-38.
- Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya., *Majalah Ilmu Kefarmasian*, **1**, 117-135.
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid III*, Jakarta: Badan Litbang Kehutanan, Departemen Kehutanan.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., dan Kurniadi, B., 2008, *Buku Ajar Fitokimia*, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kusnadi, K., dan Devi, E.T., 2017, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) dengan Metode Refluks, *Pancasakti Science Education Journal*, **2**, 56-67.
- Madiyahawati, M., Penyang., Fauzi, F., dan Triyadi, A., 2017, Karakteristik dan Uji Fitokimia 5 (Lima) Jenis Tumbuhan Buah Eksotik dari Kabupaten Barito Utara Kalimantan Tengah, *Jurnal Daun*, **4**, 47-54.
- Markham, K.R., 1988, *Techniques of Flavonoids Identification*, diterjemahkan oleh Padwanita, K., Penerbit ITB, Bandung.
- Marliana, S.D., Suryanti, V., dan Suyono., 2005, Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol, *Biofarmasi*, **3**, 26-31.
- Marwat, S. K., Khan, M.A., Rehman, F., Ahmad, M., Zafar, M., and Sultana, S., 2009, *Salvadora persica*, *Tamarix aphylla* and *Ziziphus mauritiana* Lam Three Woody Plant Species Mentioned in Holy Quran and Ahadith and Their Ethnobotanical Uses in North Western Part (D. I. Khan) of Pakistan, *Pakistan Journal of Nutrition*, **8**, 542-547.
- Miller, J.C and Miller, J.N., 2005, *Statistik And Chemometrics For Analytical Chemistry*, 5<sup>th</sup> Edition, Pearson Education Limited, Edinburg Gate, England, 111.
- Moektiwardoyo, M., Levita, J., Sidiq, S.P., Ahmad, K., Mustarichie, R., Subarnas, A., dan Supriyatna., 2011, Penentuan Kuersetin dari Ekstrak Metanol Daun

- Jawer Katok dan Studi In Siliconya pada Reseptor Histamin H4, *Majalah Farmasi Indonesia*, **22**, 191–196.
- Noviyanti., Sativa, N., dan Perdana, F., 2019, Uji Parameter Spesifik dan Non Spesifik Daun *Ziziphus Nummularia* (Burm.F.) Wight&Arn serta Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder, *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, **10**, 197-204.
- Nugraha, A., dan Ghozali, M.T., 2014, Penetapan Kadar Flavonoid Kuersetin Ekstrak Kulit Buah Apel Hijau (*Pyrus malus* L.) dengan Menggunakan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, *Skripsi*, Farmasi FKIK, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Nurhasnawati, H., Sukarmi., dan Handayani, F., 2017, Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Bol (*Syzygium malaccense* L.), *Jurnal Ilmiah Manuntung*, **3**, 91-95.
- Redha, A., 2010, Flavonoid : Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis, *Jurnal Bellian*. **9**, 197-202.
- Refilda., Hamman, H., Salim, E., 2019, Penentuan Kuersetin pada Ekstrak Aseton Daun Ekor Naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl) dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), *Jurnal Kimia Unand*, **8**, 24-29.
- Setiawan, O., Wahyuni, N., Susila, W.W., Rahayu, A.D., dan Rostiawati, T., 2014, *Bidara Laut (Strychnos ligustrina Blume) syn. S. lucida* R. Br: *Sumber Bahan Obat Potensial di Nusa Tenggara Barat dan Bali*, FORDA press, Bogor.
- Sukmawati., Widiastuti, H., dan Miftahuljanna., 2019, Analisis Kadar Kuersetin pada Ekstrak Etanol Daun Miana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br.) Secara HPLC (High Performance Liquid Chromatography), *As-Syifaa Jurnal Farmasi*, **11**, 38-44.
- Supriningrum, R., Fatimah, N., dan Wahyuni, S.N., 2018. Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis* L.) Berdasarkan Perbedaan Cara Pengeringan, *Jurnal Ilmiah Manuntung*, **4**, 156-161.
- Taufiq., 2018, Aktifitas Efek Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Bidara Laut (*Ziziphus mauritiana* Lam.) Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* Dan *Escherichia coli*, *Skripsi*, Akademi Farmasi Yamasi Makassar.
- Yuda, P.E.S.K., Cahyaningsih, E., dan Winariyanthi, N.L.P.Y., 2017, Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Tanaman Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L.), *Medicamento*, **3**, 61-70.