

VERIFIKASI METODE ANALISIS KUERSETIN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus* H.B.K) SECARA KLT-DENSITOMETRI

Etty Sulistyowati*¹, Bakti Nugraheni², Yuni Rusmianingsih³

^{1,2,3}Stifar Yayasan Farmasi Semarang, Indonesia

e-mail: *etty0103@gmail.com.

Article Info

Article history:

Submission Mei 2021

Accepted Juni 2021

Publish Juli 2021

Abstrak

Obat tradisional banyak digunakan di Indonesia. Parameter mutu sangat perlu untuk menjamin keamanan dan khasiat dari senyawa bioaktif yang terkandung dalam obat tradisional tersebut, salah satunya daun kenikir. Metode KLT Densitometri adalah metode sederhana, spesifik, dan tingkat kepekaannya tinggi digunakan untuk analisis kadar kuersetin fraksi etil asetat daun kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K). Daun kenikir dimaserasi menggunakan etanol 80%.

Fase gerak yang digunakan adalah toluen : etil asetat : asam formiat (5:4:0,2), fase diam silika gel F_{254} , dan panjang gelombang maksimal 372 nm. Larutan baku kuersetin pada rentang 0,7-2,0 μg didapatkan persamaan regresi linear $y = 4,9982 \times 10^{-3}x + 2,0925 \times 10^{-3}$ dengan koefisien korelasi 0,9933 dan nilai koefisien variasi fungsi (V_{x0}) 2,54%. Persen recovery didapatkan antara 98,01-101,24% dan nilai persen deviasi standar relative sebesar 1,42%. Kadar kuersetin tertinggi pada fraksi etanol 10%: etil asetat (1:1) sebesar $576,733 \pm 6,1101 \mu\text{g/mL}$.

Kata kunci: kenikir, kuersetin, KLT-Densitometri, verifikasi.

Ucapan terima kasih:

Abstract

Traditional medicine is widely used in Indonesia. Quality parameters are necessary to ensure the safety and efficacy of the bioactive compounds contained in these traditional medicines, one of which is kenikir leaves. The Densitometric TLC method is a simple, specific, and highly sensitive method used for the analysis of quercetin levels in the ethyl acetate fraction of kenikir leaves (*Cosmos caudatus* H.B.K). Kenikir leaves are macerated using 80% ethanol. The mobile phase used was toluene: ethyl acetate: formic acid (5: 4: 0.2), silica gel F_{254} stationary phase, and a maximum wavelength of 372 nm. Quercetin standard solution in the range of 0.7-2.0 μg obtained a linear regression equation $y = 4.9982 \times 10^{-3}x + 2.0925 \times 10^{-3}$ with a correlation coefficient of 0.9933 and a coefficient of variation of functions (V_{x0}) 2.54%. The percent recovery was obtained between 98.01-101.24% and the relative standard deviation percent value was 1.42%. The highest quercetin content was in the 10% ethanol ethyl acetate (1:1) fraction.

Keywords: kenikir, quercetin, TLC-densitometry, verification.

©2020 Politeknik Harapan Bersama Tegal

Alamat korespondensi:

Prodi DIII Farmasi Politeknik Harapan Bersama Tegal

Gedung A Lt.3. Kampus 1

Jl. Mataram No.09 Kota Tegal, Kodepos 52122

Telp. (0283) 352000

E-mail: parapemikir_poltek@yahoo.com

p-ISSN: 2089-5313

e-ISSN: 2549-5062

A. Pendahuluan

Daun kenikir memiliki banyak kegunaan dalam kesehatan karena mengandung senyawa aktif flavonoid. Kandungan flavonoid yang terdapat dalam daun kenikir diantaranya kuersetin, kaempferol, proantosianidin, asam klorogenat, dan katekin^[1]. Daun kenikir segar mengandung flavonoid sebesar 143 mg/100 g dengan kandungan flavonoid jenis kuersetin paling tinggi sebesar 51,3±4,1 mg/100 g^[2].

Kuersetin memiliki banyak manfaat bagi kesehatan diantaranya: antidiabetes, antiobesitas, antioksidan, antivirus, antiinflamasi, antikanker^[3]. Proses ekstraksi kuersetin dilakukan dengan cara hidrolisis asam, karena kuersetin tidak hanya terdapat dalam bentuk bebasnya, tetapi juga dalam bentuk terikat sebagai glikosida, yaitu isokuersitrin^[4].

Analisis kadar kuersetin secara KLT-Densitometri menggunakan campuran pelarut kloroform: etil asetat : asam formiat (5:4:1), λ 366 nm, diperoleh koefisien korelasi (r) 0,9998, % *recovery* sebesar 98,8-99,3%^[5]. Analisis kadar kuersetin secara KLT-Densitometri menggunakan fase gerak toluene : etil asetat : asam formiat (4:3:0,4), λ 265 nm, diperoleh koefisien korelasi (r) sebesar 0,9977, % *recovery* sebesar 91,26 ± 8,79% dan presisi 1,36%^[6].

Berdasarkan uraian diatas, akan dilakukan penelitian terkait verifikasi metode KLT-Densitometri untuk analisis kuersetin pada ekstrak. Penelitian ini akan dilakukan optimasi fase gerak, kemudian dilanjutkan verifikasi metode analisis. Penelitian ini mengacu pada Ihsan *et al.* (2019) dan Adelima *et al.* (2016). Hasil verifikasi metode analisis kemudian dilanjutkan penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak etanol daun kenikir.

B. Metode

1. Optimasi fase gerak

Fase gerak dilakukan optimasi, campuran fase gerak yang dioptimasi yaitu: (a) kloroform : metanol (90:10); (b)

kloroform : etil asetat : asam formiat (5:4:1); (c) toluen : etil asetat : asam formiat (14:5:1); (d) toluen : etil asetat : asam formiat (4:3:0,4); (e) toluen : etil asetat : asam formiat (5:4:0,2).

Masing-masing fase gerak disiapkan sebanyak 20 mL dan dijenuhkan dengan kertas saring. Kemudian ditotolkan dengan baku dan sampel sebanyak 3 dan 2 μ L pada plat silika gel GF254. Noda yang terbentuk dilihat secara visual dan lampu UV 254 nm. Dihitung nilai Rf, nilai *peak asymmetry factor* (As), nilai *peak tailing factor* (Tf). Hasil kromatogram dan parameter yang terbaik, sebagai fase gerak optimal.

2. Verifikasi

a. Linearitas

Larutan baku kuersetin 400, 500, 600, 700, 800, 900 dan 1000 μ g/mL ditotolkan sebanyak 2 μ L pada plat KLT silika gel F₂₅₄ dan dielusi dengan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (5:4:0,2). Kemudian diamati noda yang diperoleh dengan densitometer dan dihitung nilai persamaan regresinya $y = bx + a$, koefisien korelasi (r), dan koefisien fungsi (V_{xo}).

b. Presisi

Digunakan baku kuersetin dengan konsentrasi 600 μ g/mL. Ditotolkan sebanyak enam kali dengan jarak masing-masing totalan 1 cm pada lempeng KLT silika gel F₂₅₄ sebanyak 2 μ L kemudian dielusi dengan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (5:4:0,2). Diamati area panjang gelombang terpilih menggunakan densitometer untuk dihitung simpangan baku (SD) dan persentase standar deviasi relatif (RSD)^[6].

c. Akurasi

Digunakan baku kuersetin konsentrasi 400, 700 dan 1000 μ g/mL dengan replikasi masing-masing konsentrasi sebanyak tiga kali. Ditotolkan masing-masing 2 μ L pada plat KLT silika gel F₂₅₄ dan dielusi dengan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (5:4:0,2). Noda yang diperoleh diamati dengan densitometer

dan dihitung persentase perolehan kembali (*recovery*).

3. Analisis Kadar Kuersetin Dalam Fraksi Etil Asetat Daun Kenikir

Serbuk daun kenikir ditimbang sebanyak 200 gram, kemudian dimasukkan ke dalam wadah toples, lalu ditambahkan 1000 mL etanol 80% dan 200 mL HCl 1,2 N sebagai cairan penyari hingga simplisia terendam seluruhnya. Maserat dikumpulkan, diuapkan, dan dipekatkan dengan rotary evaporator suhu 60° sehingga diperoleh ekstrak kental [7].

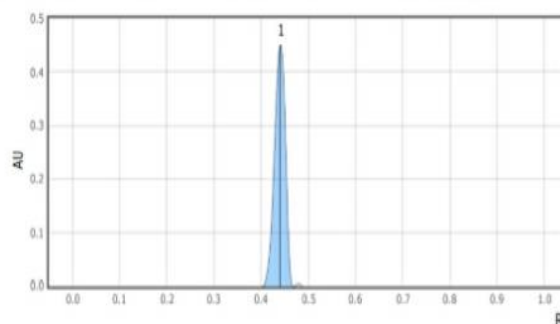
Proses fraksinasi menggunakan pelarut etanol konsentrasi 10%, 20%, 30% dan 40% : etil asetat (1:1) dilakukan 4 kali penggantian penyari (4x25 mL). Fraksi etil asetat yang diperoleh berwarna coklat kekuning dan terdapat sedikit warna hijau pada bagian atas cairan kemudian ditampung dan diuapkan diatas *water bath* pada suhu 60°C hingga diperoleh fraksi kental daun kenikir. Tujuan pemilihan fraksi etil asetat adalah salah satu pelarut yang tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas yang rendah [11]. Fraksi etil asetat daun kenikir lebih dapat menyari senyawa flavonoid yang terdapat dalam daun kenikir dibanding dengan fraksi *n*-heksan, dan fraksi air [12].

Fraksi etil asetat kental ditimbang 25 mg, dilarutkan dengan etanol 96% dan diencerkan sampai 5 mL pada labu takar. Larutan tersebut di saring dengan kertas whatman dan dimasukkan vial. Lakukan tiga kali replikasi. Kemudian sampel dan baku kuersetin masing-masing ditotolkan menggunakan alat CAMAG linomat 5 sebanyak 2 µl dan 3 µl pada plat silika gel F₂₅₄. Sampel dan baku yang sudah ditotolkan dielusi menggunakan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (5:4:0,2) yang sebelumnya telah dijenuhkan. Ditunggu sampai proses elusi selesai, plat silika gel F₂₅₄ diangkat dan dikeringkan. Selanjutnya dimasukkan ke alat densitometer tipe CAMAG TLC Scanner 4 yang terinstalasi dengan software vision CATS. Pembacaan plat KLT menggunakan densitometri

dilakukan dengan *scanning* panjang gelombang maksimal 372 nm dan dihitung kadar kuersetin pada masing-masing sampel menggunakan persamaan kurva baku [6].

C. Hasil dan Pembahasan

Optimasi fase gerak bertujuan untuk mendapatkan pemisahan optimal. Parameter pada kondisi optimal sistem KLT-densitometri dapat dilihat dari nilai Rf antara 0,2-0,8 [8], nilai *peak tailing factor* (*Tf*) $0,9 \leq T \leq 1,1$ [10], nilai *peak asymmetry factor* (*As*) sama dengan 1 atau 0,95-1,1 [13] dan menghasilkan kromatogram dengan satu peak yang simetris.



Peak #	Start Rf	Start H	Max Rf	Max H	%	End Rf	End H	Area A	%	Manual peak	Substance Name
1	0.403	0.0000	0.440	0.4494	100.0	0.468	0.0000	0.01223	100.0	No	Quercetin

Gambar 1. Hasil optimasi fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (5:4:0,2)

Berdasarkan data hasil optimasi fase gerak yang diperoleh bahwa campuran fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (5:4:0,2). Fase gerak tersebut memenuhi parameter optimasi berupa hasil kromatogram peak sampel dengan nilai Rf sebesar 0,388, sedangkan nilai As sebesar 0,92 dan 1.

Serbuk daun kenikir ditimbang sebanyak 200 gram, kemudian dimasukkan ke dalam wadah toples, lalu ditambahkan 1000 mL etanol 80% dan 200 mL HCl 1,2 N sebagai cairan penyari hingga simplisia terendam seluruhnya. Toples maserasi ditutup rapat dan dilapisi menggunakan aluminium foil kemudian dilakukan maserasi selama 1 hari. Maserat kemudian dikumpulkan, untuk penyarian

berikutnya serbuk simplisia disari kembali menggunakan cairan penyari etanol 500 mL dan 100 mL HCl 1,2 N selama 1 hari. Maserat dikumpulkan, diuapkan, dan dipekatkan dengan rotary evaporator suhu 60° sehingga diperoleh ekstrak kental (Laksmiani dkk., 2020).

Penelusuran bercak akan mendapatkan hasil yang baik apabila dilakukan pada panjang gelombang maksimum, karena perubahan konsentrasi pada bercak sedikit saja sudah terdeteksi. Pengukuran dilakukan dengan menelusuri bercak yang akan ditetapkan kadarnya pada kisaran pada panjang gelombang zat tersebut (Mintarsih, 1990). Pada analisa kuantitatif dengan KLT-Densitometri, keberhasilan analisa sangat di pengaruhi oleh ketelitian volume larutan yang ditotolkan, besar titik toloan dan jarak antar toloan serta jarak elusi yang berpengaruh pada besarnya bercak.

Verifikasi ini dilakukan terhadap suatu metode standar sebelum diterapkan di laboratorium. Verifikasi sebuah metode bermaksud untuk membuktikan bahwa laboratorium yang bersangkutan mampu melakukan pengujian dengan metode tersebut dengan hasil yang valid.

Tabel 3. Hasil uji linearitas kuersetin

Konsentrasi (µg/mL)	Massa (µg)	Area
400	0,8	0,00579
500	1	0,00729
600	1,2	0,00846
700	1,4	0,00893
800	1,6	0,01013
900	1,8	0,01082
1000	2	0,01221

Hasil pengukuran diperoleh persamaan regresi linear untuk kuersetin adalah $y = 4,9982 \times 10^{-3}x + 2,0925 \times 10^{-3}$ dengan koefisien kolerasi 0,9933 dan nilai koefisien variasi fungsi (V_{xo}) 2,54%. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa metode analis yang digunakan memenuhi persyaratan linearitas yaitu dengan nilai $r \geq 0,99$ dan $V_{xo} < 5\%$ [10].

Nilai *recovery* diperoleh dengan

membagi kadar terukur dengan kadar sebenarnya dan dikalikan 100%. Pada uji akurasi konsentrasi yang digunakan antara lain 400,700 dan 1000 µg/mL dengan masing-masing 3 kali pengukuran.

Tabel 4. Hasil uji akurasi kuersetin

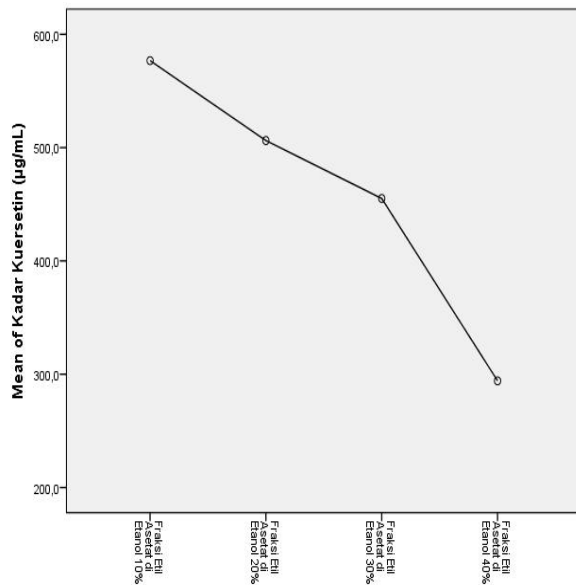
Kadar (µg/mL)	Massa (µg)	Kadar terukur (µg/mL)	Area	Recovery (%)	Rata-rata recovery (%)
400	0,7938	396,9	0,00606	99,22	99,80
400	0,7918	395,9	0,00605	98,97	
400	0,8098	404,9	0,00614	101,22	
700	1,4200	710,0	0,00919	101,43	101,24
700	1,3980	699,0	0,00908	99,86	
700	1,4340	717,0	0,00926	102,43	
1000	1,9282	964,1	0,01173	96,41	98,01
1000	1,9642	982,1	0,01191	98,21	
1000	1,9882	994,1	0,01203	99,41	

Kriteria penerimaan untuk uji akurasi dengan kadar 100 – 1000 ppm nilai *recovery* berada pada rentang 90%-107% [9]. Nilai *recovery* pada masing-masing pengukuran dengan konsentrasi yang sama dihitung nilai simpangan bakunya dan harus memenuhi syarat yaitu nilai $RSD \leq 2\%$. Berdasarkan tabel 4 nilai *recovery* yang diperoleh dari penelitian ini adalah 99,68 dengan RSD 1,35%. Hasil yang diperoleh telah memenuhi kriteria penerimaan uji akurasi yang digunakan. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode yang digunakan dapat menghasilkan hasil yang akurat.

Tabel 5. Hasil uji presisi kuersetin

Kadar µg/mL	Area	Rata-rata	SD	% RSD
600	0,00846	0,00842	1,1946x10 ⁻⁴	1,42
	0,00839			
	0,00842			
	0,00831			
	0,00829			
	0,00862			

Uji presisi dilakukan dengan menggunakan baku konsentrasi 600 µg/mL dengan pengukuran sebanyak 6 kali replikasi. Dari data yang diperoleh kemudian dihitung nilai RSD -nya. Dari Tabel 5. dapat dilihat bahwa didapatkan nilai % RSD 1,42% yang berarti memenuhi persyaratan simpangan baku relatif yaitu $\leq 2\%$ [10].



Gambar 2. Grafik Kadar Kuersetin

Berdasarkan hasil analisis kadar kuersetin dalam fraksi etil asetat daun kenikir di konsentrasi etanol 10%, 20%, 30% dan 40% didapatkan kadar kuersetin rata-rata \pm SD yang tertinggi pada fraksi etanol 10% : etil asetat (1:1) yaitu $576,733 \pm 6,1101 \mu\text{g/mL}$ dengan jumlah kuersetin dalam sampel 5,0 mL sebesar $2,884 \pm 0,0306$ mg. Dari hasil tersebut dapat dilihat bahwa semakin rendah konsentrasi etanol (10%), maka semakin banyak senyawa kuersetin yang tertarik pada fraksi etil asetat pada konsentrasi etanol tersebut. Hal ini dikarenakan etanol 10% lebih banyak mengandung air daripada etanol 40%, sehingga fraksi etil asetat pada konsentrasi etanol 10% yang lebih banyak menarik senyawa kuersetin daripada fraksi etil asetat di konsentrasi lainnya.

D. Simpulan

1. Hasil parameter-parameter verifikasi metode analisis kuersetin fraksi etil asetat daun kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K) secara KLT-Densitometri valid.
2. Hasil parameter linieritas rentang 0,7-2,0 μg didapatkan persamaan regresi linear $y = 4,9982 \times 10^{-3}x + 2,0925 \times 10^{-3}$ dengan koefisien kolerasi 0,9933 dan

nilai koefisien variasi fungsi (V_{x0}) 2,54%; persen recovery didapatkan antara 98,01-101,24% dan nilai persen deviasi standar relatifnya sebesar 1,42%.

3. Kadar kuersetin tertinggi pada fraksi etanol 10% : etil asetat (1:1) sebesar $576,733 \pm 6,1101 \mu\text{g/mL}$.

Pustaka

- [1]. Cheng SH, Barakatun-Nisak MY, Anthony J, Ismail A. Potential medicinal benefits of *Cosmos caudatus* (Ulam Raja): A scoping review. *J Res Med Sci*. Published online 2015. doi:10.4103/1735-1995.172796
- [2]. Andarwulan N, Batari R, Sandrasari DA, Bolling B, Wijaya H. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chem*. Published online 2010. doi:10.1016/j.foodchem.2010.01.033
- [3]. Kumar R, Vijayalakshmi S, Nadasabapathi S. Health Benefits of Quercetin. *Def Life Sci J*. Published online 2017. doi:10.14429/dlsj.2.11359
- [4]. Dmitrienko SG, Kudrinskaya VA, Apyari V V. Methods of extraction, preconcentration, and determination of quercetin. *J Anal Chem*. Published online 2012. doi:10.1134/S106193481204003X
- [5]. Metode V, Analisis K, Jamu P, et al. Validation Method of a TLC-Densitometry for Determination of Quercetin in Extract and Herbal Products of Leaves Guava (*Psidium guajava* L.). 2020;5(1):45-51.
- [6]. Adelima S, Darmawati A. Validasi Metode KLT-Densitometri untuk Penetapan Kadar Kuersetin dalam Sediaan Sirup Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.). 2016;5(2):15-19.
- [7]. Laksmiani NPL, Widiantra IWA, Adnyani KD, Pawarrangan ABS. Optimasi Metode Ekstraksi Kuersetin dari Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.). *J Kim*. Published online 2020. doi:10.24843/jchem.2020.v14.i01.p04

- [8]. Fatmawati A, Aji NP. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera Lam*) Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis Densitometri. *Proc Conf* Published online 2019:1-7. <http://fikes.almaata.ac.id/wp-content/uploads/2019/07/Annisa-FatmawatiNurwani-Purnama-Aji.pdf>
- [9]. Huber, L. 2007. *Validation and Qualificatio in Analitical Laboratories Second Edition*. New York : Informa Healthcare USA.
- [10]. Indrayanto, G. dan Yuwono, M. 2009. *Validation of TLC Analyses in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya: Airlangga University Indonesia.
- [11]. Rowe, R.C., Shekey, P.J., and Quinn, M.E. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients Sixth Edition*. USA : Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association.
- [12]. Vira, D. 2015. Pengaruh Fraksi *n*-Heksan, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi Air daun Kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K) terhadap Penurunan Kadar Glukosa Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Semarang : STIFAR.
- [13]. Gandjar, I. G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar,. Yogyakarta