

**OPTIMASI DAN PENETAPAN KADAR KUERSETIN DALAM EKSTRAK
BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea* L) DENGAN METODE
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

(Optimization and Determination of Quercetin in Telang Flowers Extract (*Clitoria ternatea* L) with High Performance Liquid Chromatography Method)

SKRIPSI



Oleh :

**HANGGAWATI PUSPITA MAYANGSARI
4161019**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL
SURAKARTA
2020**

**OPTIMASI DAN PENETAPAN KADAR KUERSETIN DALAM EKSTRAK
BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea* L) DENGAN METODE
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

(Optimization and Determination of Quercetin in Telang Flowers Extract (*Clitoria ternatea* L) with High Performance Liquid Chromatography Method)

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana
Farmasi (S. Farm) pada Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu
Kesehatan Nasional di Surakarta**

Oleh :

**HANGGAWATI PUSPITA MAYANGSARI
4161019**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL
SURAKARTA
2020**

PENGESAHAN SKRIPSI

**OPTIMASI DAN PENETAPAN KADAR KUERSETIN DALAM EKSTRAK
BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea* L) DENGAN METODE
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**(Optimization and Determination of Quercetin in Telang Flowers Extract
(*Clitoria ternatea* L) with High Performance Liquid
Chromatography Method)**

Oleh .

HANGGAWATI PUSPITA MAYANGSARI

4161019

Dipertahankan di hadapan Penguji Skripsi Program Studi S1 Farmasi Sekolah
Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional Pada tanggal : 11 September 2020

Pembimbing Utama



apt. Novena Yety Lindawati, S. Farm., M. Sc.

Mengetahui,

Program Studi S1 Farmasi
Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional
Ketua Program Studi,



Pembimbing Pendamping

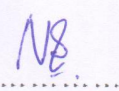


C. E. Dhurhanian, S. Farm., M. Sc

apt. Lusia Murtisiwi, S. Farm., M.Sc


Tim Penguji

Ketua : Nastiti Utami, S. Si., M. Sc

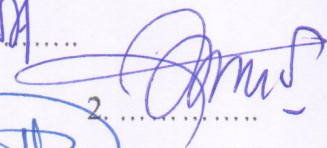


Anggota :

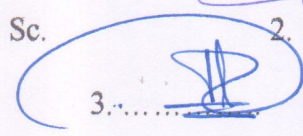
1. Tesia Aisyah Rahmania, S. Si., M. Pharm. Sci

1. 

2. apt. Novena Yety Lindawati, S. Farm., M. Sc.

2. 

3. C. E. Dhurhanian, S. Farm., M. Sc

3. 

HALAMAN PERSEMBAHAN

*Dengan Menyebut Nama Allah SWT
Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang*

“Dan orang-orang yang berjihad untuk (mencari keridhaan) Kami, benar-benar akan Kami tunjukkan kepada mereka jalan-jalan Kami. Dan sesungguhnya Allah SWT benar-benar beserta orang-orang yang berbuat baik.”

(Al-Ankabuut: 69)

Karya ini saya persembahkan kepada
Ayah Ibu dan Kakak Tercinta

HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul :

OPTIMASI DAN PENETAPAN KADAR KUERSETIN DALAM EKSTRAK BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea* L) DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Yang dibuat untuk melengkapi persyaratan menyelesaikan Jenjang Pendidikan S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, sejauh pengetahuan saya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan tidak terdapat tiruan atau duplikasi karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surakarta, 11 September 2020



Hanggawati Puspita Mayangsari
NIM. 4161019

PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan yang Maha Pengasih dan Penyayang atas segala karunia dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul “OPTIMASI DAN PENETAPAN KADAR KUERSETIN DALAM EKSTRAK BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea* L) DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI” sebagai salah satu syarat menyanggah gelar Sarjana Farmasi di Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional. Dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. apt. Lusia Murtisiwi, S.Farm., M.Sc., selaku Ketua Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional.
2. apt. Novena Yety Lindawati, S.Farm., M.Sc., selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, nasehat serta bantuan dalam penyelesaian skripsi.
3. C. E. Dhurhanian, S.Farm., M.Sc., selaku pembimbing pendamping yang selalu memberikan motivasi, pengarahan, bimbingan, nasehat dan teladan selama penyelesaian skripsi.
4. Nastiti Utami, S.Si., M.Sc., selaku dosen penguji atas saran dan masukan yang diberikan.
5. Tesia Aisyah Rahmania, S.Si., M.Pharm. Sci., selaku dosen penguji atas saran dan masukan yang diberikan.

6. Sugeng Sugiarto (Ayah), Sri Ningsih Handayani (Ibu), dan Agung Hertoto (Kakak) yang selalu mendoakan, memberikan nasehat dan memberikan semangat dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi.
7. Dhea Ayu Karina Ristaningrum, Devi Ernawati, Criste Mareta Ardika Sari, Riski Asih Dwi Lestari, M. Dienulloh Qasyfur Rohman yang selalu memberikan semangat, dukungan, dan nasehat dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi.
8. Teman-teman S1 Farmasi angkatan 2016 yang memberikan bantuan dan semangat dalam menyelesaikan penelitian.
9. Staf dan Karyawan Program Studi S1 Farmasi STIKES Nasional, Laboran-laboran yang telah membantu pelaksanaan praktikum dalam proses skripsi.
10. Pihak-pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan, baik moral maupun material.

Akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan penelitian, ilmu pengetahuan maupun dunia medis. Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Surakarta, 11 September 2020

PENULIS

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
SAMPUL DALAM.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
PRAKATA.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
<i>ABSTRACT</i>	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Bunga Telang (<i>Clitoria ternatea</i> L).....	5
B. Kuersetin.....	7
C. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	9

D. Optimasi Metode KCKT	18
E. Presisi.....	20
F. Linieritas.....	20
G. Spesifisitas.....	21
H. Sensitifitas.....	22
I. Landasan Teori.....	23
J. Kerangka Konsep Penelitian.....	25
BAB III METODE PENELITIAN.....	26
A. Desain Penelitian.....	26
B. Alat dan Bahan.....	26
C. Jalannya Penelitian.....	27
D. Analisis Data.....	33
E. Alur Penelitian.....	35
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
A. Preparasi Sampel.....	36
B. Uji Susut Pengeringan.....	37
C. Ekstraksi Bunga Telang.....	38
D. Uji Kualitatif Flavonoid dan Kromatografi Lapis Tipis.....	39
E. Penentuan Panjang Gelombang (λ) Maksimal Kuersetin.....	43
F. Optimasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	45
G. Penetapan Kadar Kuersetin.....	50
H. Presisi.....	53
I. Linieritas.....	53

J. Spesifisitas.....	54
K. Sensitifitas.....	55
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	56
A. Kesimpulan.....	56
B. Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA.....	57
LAMPIRAN.....	61

DAFTAR TABEL

Tabel 1. UV <i>Cutoff Solvent</i> yang Digunakan sebagai Fase Gerak.....	14
Tabel 2. Perbandingan Komposisi Optimasi Fase Gerak.....	29
Tabel 3. Uji Susut Pengeringan Serbuk Bunga Telang.....	37
Tabel 4. Rendemen Ekstrak Kental Bunga Telang.....	39
Tabel 5. Data Panjang Gelombang Maksimal Kuersetin dari 3 Seri Konsentrasi.....	45
Tabel 6. Nilai Resolusi dari Berbagai Perbandingan Fase Gerak.....	47
Tabel 7. Nilai <i>Tailing Factor</i> 10 % dari Berbagai Perbandingan Fase Gerak...	48
Tabel 8. Nilai Waktu Retensi dari Berbagai Perbandingan Fase Gerak.....	48
Tabel 9. Data Kadar Sampel Ekstrak Bunga Telang.....	52
Tabel 10. Data Nilai Resolusi Kuersetin di dalam Ekstrak Bunga Telang.....	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Tanaman Telang (<i>Clitoria ternatea</i> L.).....	5
Gambar 2.	Struktur Kuersetin.....	8
Gambar 3.	<i>Quercetin-3-O-β-Glucoside</i>	9
Gambar 4.	Diagram Sistem KCKT.....	12
Gambar 5.	Skema Pompa Piston Resiprok Tunggal.....	16
Gambar 6.	Skema Pompa Dual Piston dengan Pompa Paralel.....	17
Gambar 7.	Kerangka Konsep Penelitian.....	25
Gambar 8.	Alur Penelitian.....	35
Gambar 9.	Uji Kualitatif (Uji Shinoda).....	39
Gambar 10.	Mekanisme Reaksi Senyawa Flavonoid dengan Mg dan HCl.....	40
Gambar 11.	Uji Senyawa Kuersetin pada Kromatografi Lapis Tipis.....	42
Gambar 12.	Reaksi antara Senyawa Kuersetin dengan Pereaksi AlCl ₃	42
Gambar 13.	Kromofor dan Auksokrom Senyawa Kuersetin	44
Gambar 14.	Panjang Gelombang Maksimal Kuersetin.....	44
Gambar 15.	Kromatogram Larutan Baku Kuersetin	49
Gambar 16.	Kromatogram Larutan Sampel Ekstrak Bunga Telang	50
Gambar 17.	Kurva Kalibrasi Kuersetin.....	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Ekstrak Kental Bunga Telang.....	61
Lampiran 2. Perhitungan Pembuatan Larutan Baku Kuersetin dan Larutan Sampel Ekstrak Kental Bunga Telang	62
Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Larutan Baku Kuersetin untuk Penentuan Panjang Gelombang Maksimal	63
Lampiran 4. Perhitungan Kurva Kalibrasi.....	64
Lampiran 5. Perhitungan Kadar Kuersetin dalam Bunga Telang.....	65
Lampiran 6. Analisis Data LOD dan LOQ.....	72
Lampiran 7. <i>Certificated of Analysis Quercetin</i>	74
Lampiran 8. Surat Keterangan Determinasi Tanaman Telang.....	75
Lampiran 9. Preparasi Sampel.....	78
Lampiran 10. Uji Susut Pengeringan.....	79
Lampiran 11. Ekstraksi.....	80
Lampiran 12. Uji Kualitatif dan Kromatografi Lapis Tipis.....	82
Lampiran 13. Pembuatan Fase Gerak.....	83
Lampiran 14. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin.....	85
Lampiran 15. Larutan Kurva Baku.....	86
Lampiran 16. Larutan Sampel Ekstrak Bunga Telang.....	87
Lampiran 17. Kromatogram Optimasi KCKT.....	88
Lampiran 18. Kromatogram Kurva Kalibrasi.....	94
Lampiran 19. Kromatogram Kuersetin dalam Sampel Ekstrak Bunga Telang....	99

INTISARI

Kuersetin merupakan senyawa flavonoid golongan flavonol yang terdapat di dalam ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L). Kuersetin memiliki aktivitas farmakologi yang potensial, sehingga perlu dilakukan penetapan kadar. Preparasi sampel dilakukan dengan teknik ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 70%. Metode KCKT yang dikembangkan untuk penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak bunga telang telah dioptimasi terlebih dahulu dengan berbagai perbandingan metanol:akuabides sebagai fase gerak dengan parameter nilai resolusi, *tailing factor* 10%, dan waktu retensi.

Desain penelitian adalah penelitian deskriptif. Sistem KCKT yang digunakan yaitu KCKT fase terbalik, kolom oktadesil (C₁₈) ukuran 250 mm x 4,6 µm, fase gerak metanol:akuabides yang dioptimasi pada perbandingan 40:60; 50:50; 60:40, laju alir 1 mL/menit, dan detektor UV pada panjang gelombang 371,5 nm. Sistem KCKT hasil optimasi digunakan untuk penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak bunga telang.

Fase gerak optimal yang diperoleh pada penelitian ini yaitu campuran methanol:akuabides (50:50) dengan hasil resolusi baku kuersetin 2,152 dan kuersetin sampel 1,453, *tailing factor* 10% baku kuersetin 1,127 dan kuersetin sampel 1,031, serta waktu retensi relatif sebesar 0,953. Kadar kuersetin di dalam ekstrak bunga telang yang diperoleh pada penelitian ini sebesar $0,078 \pm 4,358 \times 10^{-3}$ %. Metode KCKT yang digunakan untuk penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak bunga telang pada penelitian ini mampu menghasilkan koefisien variasi 5,58%, koefisien korelasi 0,999, spesifisitas dengan resolusi antara 1,272 hingga 3,341, *limit of detection* 0,045 ppm, dan *limit of quantification* 0,150 ppm.

Kata Kunci: Kuersetin, Bunga Telang, KCKT, Optimasi, Flavonoid

ABSTRACT

Quercetin is a flavonoid compound in the flavonol group found in the telang flower (*Clitoria ternatea* L). Quercetin has a potential pharmacological activity, so it needs to be determined. Sample preparation was carried out by maceration extraction technique with 70% ethanol solvent. The HPLC method developed for the determination of quercetin content in the telang flower extract has been optimized in advance with various comparisons of methanol:akuabides as a mobile phase with parameters of resolution, tailing factor 10%, and retention time.

The research design is descriptive study. The HPLC systems used are reverse phase HPLC, octadesil column (C₁₈) size 250 mm x 4,6 μm, methanol mobile phase: akuabides optimized at a ratio of 40:60; 50:50; 60:40, flow rate of 1 mL / min, and detector at 371.5 nm wavelength. The optimized HPLC system was used to determine the quercetin content in the telang flower extract.

The optimal phase of motion obtained in this study was a mixture of methanol:akuabides (50:50) with a raw resolution result of 2.152 kuersetin and 1.453 sample kuersetin, 10% raw kuersetin 1.127 and 1.031 sample kuersetin, as well as a relative retention time of 0.953. The rate of kuersetin in the late flower extract obtained in this study was $0.078 \pm 4.358 \times 10^{-3}$ %. The HPLC method used to determine the levels of quercetin in the telang flower extract in this study was able to produce a coefficient of variation 5.58%, correlation coefficient 0.999, specificity with a resolution between 1.272 to 3.341, limit of detection 0.045 ppm, and limit of quantification 0.150 ppm.

Keywords: Quercetin, Telang Flowers, HPLC, Optimisation, Flavonoid

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Bunga telang merupakan bagian dari tanaman telang (*Clitoria ternatea* L) suku *Fabaceae*. Menurut penelitian yang telah dilakukan, bunga telang (*Clitoria ternatea* L) mengandung senyawa kimia seperti fenol, flavonoid, antosianin, flavonol glikosida, kaempferol glikosida, kuersetin glikosida, mirisetin glikosida, saponin, karbohidrat, triterpenoid, tanin, glikosida flavonol, protein, alkaloid, antrakuinon, glikosida jantung, stigmast-4-ene-3,6-dione, minyak atsiri dan steroid (Kazuma dkk., 2013; Al Sanafi, 2016).

Salah satu senyawa fitokimia yang berada dalam bunga telang yaitu senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid mempunyai korelasi positif dengan aktivitas antioksidan (Huda, 2009), sehingga flavonoid berpotensi menyumbangkan aktivitas sebagai senyawa antiradikal pada bunga telang (*Clitoria ternatea* L) (Apsari & Susanti, 2011). Kuersetin merupakan senyawa flavonoid golongan flavonol juga dapat sebagai senyawa antioksidan. Kuersetin pada bunga telang yang dilaporkan dapat menekan produksi berbagai mediator pro-inflamasi dari makrofag, endotel, epitel atau sel hati dengan menghambat faktor sinyal yang terlibat dalam jalur *Toll-Like Receptor* (TLR) 4 (Nair dkk, 2015). Kuersetin juga mampu menunjukkan efek proteksi terhadap tukak lambung yang diinduksi etanol, melalui penghambatan peroksidasi lipid dan peningkatan aktivitas enzim-enzim antioksidan (Coskun dkk., 2004). Senyawa flavonoid

khususnya kuersetin memiliki aktivitas farmakologi yang potensial, sehingga perlu dilakukan penetapan kadar kuersetin dalam bunga telang (*Clitoria ternatea* L).

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk penetapan kadar kuersetin dalam bunga telang (*Clitoria ternatea* L) adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), yang merupakan metode analisis kromatografi cair yang sensitif dan akurat yang berasal dari kromatografi kolom klasik. Teknik kromatografi ini semakin berkembang setelah kromatografi cair kinerja tinggi dikemas dengan teknologi kolom partikel kecil ($\sim 10\mu\text{m}$) dan memiliki sistem tekanan tinggi. Kromatografi cair kinerja tinggi sering digunakan karena memiliki kelebihan dalam penggunaannya antara lain waktu analisis lebih singkat, tingkat kepekaannya tinggi, volume sampel yang dibutuhkan sedikit, kolom yang sudah digunakan dapat digunakan kembali, identifikasi kualitatif senyawa berdasarkan parameter waktu retensi senyawa standar dan senyawa dalam sampel (Anggraena, 2018; Pramudita, 2015; Skoog dkk., 2007).

Analisis kadar kuersetin secara KCKT telah dilakukan sebelumnya oleh Sukmawati dkk (2019) terhadap ekstrak etanol daun miana. Pada penelitian tersebut digunakan fase diam C_{18} dan fase gerak metanol:akuabides dengan perbandingan 59:41, namun tidak diketahui nilai resolusi dan *tailing factor* 10% dari kromatogram yang diperoleh. Sistem kromatografi yang baik harus mampu menghasilkan kromatogram dengan resolusi dan *tailing factor* 10% yang memenuhi persyaratan dan dalam waktu analisis yang relatif singkat. Pada penelitian ini dilakukan optimasi perbandingan komposisi fase gerak

metanol:akuabides yang mampu menghasilkan kromatogram dengan waktu retensi yang relatif singkat dengan resolusi dan *tailing factor* 10% yang memenuhi persyaratan. Fase gerak atau eluen pada KCKT perlu diperhatikan penggunaannya, karena dapat mempengaruhi proses analisis, sehingga perlu dilakukan optimasi fase gerak yang dapat memisahkan beberapa senyawa yang akan dianalisis. Kuersetin merupakan senyawa yang memiliki sifat polar sehingga senyawa kuersetin dapat dianalisis dengan teknik KCKT menggunakan kolom non polar seperti C₁₈ dan fase gerak polar yaitu metanol atau air sehingga akan dihasilkan puncak pada kromatogram dengan waktu retensi yang relatif cepat (Sukmawati dkk., 2019).

B. Rumusan Masalah

1. Berapa komposisi perbandingan yang optimal dari metanol:akuabides pada fase gerak untuk penetapan kadar kuersetin dalam bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi berdasarkan parameter nilai resolusi, *tailing factor* 10%, dan waktu retensi?
2. Berapa kadar kuersetin dalam bunga telang (*Clitoria ternatea* L) yang ditetapkan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi?

C. Tujuan

1. Mengetahui komposisi perbandingan yang optimal dari metanol:akuabides pada fase gerak untuk penetapan kadar kuersetin dalam bunga telang (*Clitoria*

ternatea L) dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi berdasarkan parameter nilai resolusi, *tailing factor* 10%, dan waktu retensi.

2. Mengetahui kadar kuersetin dalam bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi.

D. Manfaat

Memberikan informasi komposisi perbandingan yang optimal dari metanol:akuabides pada fase gerak dan penetapan kadar kuersetin dalam bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain pada penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Pada penelitian ini dilakukan optimasi dan penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi. Parameter yang digunakan pada optimasi metode penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak bunga telang secara KCKT adalah komposisi metanol:akuabides pada berbagai perbandingan yang mampu menghasilkan resolusi, *tailing factor* 10%, dan waktu retensi yang baik. Metode penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L) secara kromatografi cair kinerja tinggi dilakukan uji presisi, linieritas, spesifisitas, dan sensitifitas (*limit of detection* dan *limit of quantification*)

B. Alat dan Bahan

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu LC-20 AT), kolom oktadesil atau C₁₈ (Shimadzu® Shim-pack VP-ODS 250 mm x 4,6 µm), detektor spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV mini-1280), *membran filter* PTFE (ukuran pori 0,2 µm), timbangan analitik (Ohaus dan Acis BC 500), sonikator (Branson 1510), *rotary evaporator* (IKA HB 10 basic), Lampu UV 254 nm 366 nm (Acis BC 500),

alat gelas yang digunakan untuk kimia analisis (Iwaki® dan Pyrex®), blender (Philips), plat silika GF₂₅₄ dan ayakan 40 mesh.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dari budidaya bunga telang daerah Makam Haji Surakarta, akuabides (Ikapharmindo), metanol (*for* HPLC, Merck), etanol 70 % (Sigma), baku pembanding kuersetin (pro analisis, Merck), serbuk Mg dan HCl pekat.

C. Jalannya Penelitian

1. Preparasi Sampel

Bunga telang dicuci dan dikeringkan selama dua hari pada suhu 45°C dengan oven, kemudian dihaluskan menggunakan blender sampai terbentuk serbuk, dan diayak dengan ukuran 40 mesh (Aprilia, 2019).

2. Uji Susut Pengerinan

Serbuk bunga telang ditimbang kurang lebih 5 gram ke dalam alat *moisture balance* lalu diratakan. Serbuk bunga telang akan dipanaskan hingga kelembaban menjadi hilang dan catat hasil pengukuran susut pengerinan (Pratama, 2015).

3. Ekstraksi Bunga Telang

Serbuk bunga telang (*Clitoria ternatea* L) ditimbang seksama 100,0 gram dilakukan maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 750 mL selama 3 hari dan diaduk sebanyak 3 kali, kemudian residu ditambahkan dengan pelarut etanol 70% sebanyak 250 mL selama 2 hari dan diaduk sebanyak 3 kali.

Maserat yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* dan dilanjutkan menggunakan *waterbath* pada suhu $< 65^{\circ}\text{C}$ sehingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh dihitung rendemennya. Pembuatan ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dilakukan replikasi 3 kali (Riyanto dkk., 2019).

4. Uji Kualitatif Flavonoid

a. Uji Kualitatif (Uji Shinoda)

Ekstrak bunga telang ditimbang 40 mg, ditambahkan dengan 100 mL air panas, selanjutnya disaring. Filtrat diukur sebanyak 5 mL kemudian ditambahkan 0,05 mg serbuk magnesium (Mg) dan 1 mL HCl pekat, selanjutnya dikocok kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan larutan menjadi warna merah atau jingga (Cahyaningsih dkk., 2019).

b. Uji Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak bunga telang dilakukan uji KLT dengan cara ekstrak bunga telang dilarutkan dalam etanol 70%, kemudian ditotolkan pada plat KLT dengan fase diam silica gel GF₂₅₄, lalu fase diam dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah berisi fase gerak n-butanol:asam asetat:air (4:1:5) biarkan hingga terelusi sempurna. Hasil uji KLT berupa spot bercak diamati di bawah sinar UV dan dibandingkan dengan standar kuersetin (Cahyaningsih dkk., 2019; Kusnaldi dan Egie, 2017).

5. Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Kuersetin baku ditimbang seksama 10,0 mg dan dilarutkan dalam metanol dalam labu takar 10,0 mL hingga tanda untuk mencapai

konsentrasi 1000 ppm (larutan induk). Larutan induk kuersetin dipipet 0,25 mL menggunakan mikropipet dan dilarutkan dalam metanol dalam labu takar 5,0 mL hingga tanda untuk mencapai konsentrasi 50 ppm (larutan intermediet).

6. Penentuan panjang gelombang (λ) maksimal kuersetin.

Penentuan panjang gelombang maksimal menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang dilakukan dengan cara merekam spektra larutan baku kuersetin pada konsentrasi 10, 12,5, dan 15 ppm menggunakan pelarut metanol pada rentang 200-400 nm terhadap blanko metanol. Larutan baku kuersetin konsentrasi 10, 12,5, dan 15 ppm dibuat dengan cara pemipetan menggunakan mikropipet sebanyak 1000, 1250, dan 1500 μ L dari larutan intermediet dimasukkan ke dalam labu takar 5,0 mL dan diencerkan dengan metanol hingga tanda.

7. Optimasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

a. Pembuatan Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan terdiri dari campuran metanol:akuabides dengan berbagai perbandingan (Sukmawati dkk, 2019). Larutan fase gerak disaring dengan menggunakan kertas saring *Whatman* ukuran 0,45 μ m dengan bantuan pompa vakum. Tahap selanjutnya fase gerak disonikasi selama 20 menit. Berikut perbandingan komposisi optimasi fase gerak:

Fase Gerak	Metanol	Akuabides
I	40	60
II	50	50
III	60	40

b. Penentuan Komposisi Fase Gerak Optimal untuk Larutan Baku Kuersetin

Larutan baku intermediet 50 ppm dipipet menggunakan mikropipet sebanyak 1,25 mL dimasukkan ke dalam labu takar 5,0 mL dan diencerkan dengan metanol hingga diperoleh larutan baku kuersetin 8 ppm. Larutan disaring melalui membran filter 0,2 μm dan disonikasi selama 20 menit. Larutan diinjeksikan ke dalam sistem KCKT fase terbalik sebanyak 20 μL pada kondisi suhu ruang, laju alir 1 mL/menit, dan detektor diatur pada panjang gelombang maksimal kuersetin. Data resolusi, *tailing factor* 10%, dan waktu retensi kuersetin dari kromatogram yang diperoleh dianalisis berdasarkan kesesuaian dengan persyaratan.

c. Penentuan Komposisi Fase Gerak Optimal untuk Larutan Sampel Ekstrak Bunga Telang

Sampel ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) ditimbang seksama 10,0 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga 10,0 mL. Larutan sampel disaring melalui membran filter 0,2 μm dan dilakukan sonikasi selama 20 menit. Larutan sampel diinjeksikan ke dalam sistem KCKT fase terbalik sebanyak 20 μL pada kondisi suhu ruang, laju alir 1 mL/menit, dan detektor diatur pada panjang gelombang maksimal kuersetin. Data resolusi, *tailing factor* 10%, dan waktu retensi kuersetin dari kromatogram yang diperoleh dianalisis berdasarkan kesesuaian dengan persyaratan.

8. Penetapan Kadar Kuersetin

a. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Larutan baku intermediet 50 ppm dipipet menggunakan mikropipet sebanyak 0,05, 0,075, 0,1, 0,125, dan 0,15 mL dimasukkan ke dalam labu takar 5,0 mL dan diencerkan dengan metanol hingga tanda, sehingga didapatkan seri larutan baku kerja 0,5, 0,75, 1, 1,25, dan 1,5 ppm. Masing-masing larutan disaring melalui membran filter 0,2 μm dan disonikasi selama 20 menit. Masing-masing larutan diinjeksikan ke dalam sistem KCKT fase terbalik sebanyak 20 μL pada kondisi suhu ruang dengan fase gerak optimal, laju alir 1 mL/menit, dan detektor diatur pada panjang gelombang maksimal kuersetin. Kromatogram direkam dan dibuat kurva kalibrasi antara konsentrasi dengan luas area puncak.

b. Penentuan Kadar Kuersetin dalam Sampel Ekstrak Bunga Telang

Sampel ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) ditimbang seksama 10,0 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga 10,0 mL. Larutan sampel disaring melalui membran filter 0,2 μm dan dilakukan sonikasi selama 20 menit. Larutan sampel diinjeksikan ke dalam sistem KCKT fase terbalik sebanyak 20 μL pada kondisi suhu ruang dengan fase gerak optimal, laju alir 1 mL/menit, dan detektor diatur pada panjang gelombang maksimal kuersetin. Penetapan kadar kuersetin dalam sampel ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dilakukan 6 replikasi pada penimbangan ekstrak etanol bunga telang.

9. Uji Presisi

Sampel ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) ditimbang seksama 10,0 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga 10,0 mL. Larutan sampel disaring melalui membran filter 0,2 μ m dan dilakukan sonikasi selama 20 menit. Larutan sampel diinjeksikan ke dalam sistem KCKT fase terbalik sebanyak 20 μ L pada kondisi suhu ruang menggunakan fase gerak optimal, laju alir 1 mL/menit, dan detektor diatur pada panjang gelombang maksimal kuersetin. Presisi dihitung sebagai simpangan deviasi relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV) dengan syarat ≤ 20 % pada kadar analit dalam sampel dengan konsentrasi $<0,1\%$.

10. Uji Spesifisitas

Larutan baku kerja kuersetin 0,5, 0,75, 1, 1,25, dan 1,5 ppm dan sampel ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) ditimbang seksama 10,0 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga 10,0 mL. Masing-masing diinjeksikan pada sistem KCKT fase terbalik sebanyak 20 μ L menggunakan fase gerak optimal, kecepatan alir 1 mL/menit, dan detektor diatur pada panjang gelombang maksimal kuersetin. Spesifisitas dinyatakan dalam bentuk resolusi dengan syarat harus mendekati atau lebih dari 1,5.

11. Uji Linieritas dan Sensitifitas (*Limit of detection* dan *limit of quantification*)

Larutan baku kerja kuersetin 0,5, 0,75, 1, 1,25, dan 1,5 ppm masing-masing diinjeksikan pada sistem KCKT fase terbalik sebanyak 20 μ L menggunakan fase gerak optimal, kecepatan alir 1 mL/menit, dan detektor

diatur pada panjang gelombang maksimal kuersetin. Linieritas dinyatakan dengan koefisien korelasi. Sensitifitas dinyatakan dengan *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantification* (LOQ).

D. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan memperhatikan pola pemisahan dan kenampakan noda pada kromatogram dari berbagai eluen yang digunakan. Metode penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) secara kromatografi cair kinerja tinggi dilakukan uji presisi, linieritas, spesifisitas, dan sensitifitas (*limit of detection* dan *limit of quantification*).

1. Presisi

Presisi dihitung sebagai simpangan deviasi relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV). Rumus perhitungan koefisien variasi

$$KV = \frac{\text{Simpangan deviasi}}{\text{Rata-rata (x)}} \times 100 \%$$

Keterangan: KV = koefisien variasi

SD = simpangan deviasi

x = rata-rata

Nilai presisi berdasarkan Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority (2004) yaitu $\leq 20 \%$.

2. Linearitas

Linearitas dinyatakan dengan koefisien korelasi (r). Konsentrasi larutan baku yang diperoleh diplotkan terhadap luas area pada kromatogram sehingga

diperoleh nilai koefisien korelasi (r) dari persamaan $y = bx + a$. Berdasarkan International Conference on Harmonization (2005) nilai r yang memenuhi syarat adalah \geq dari 0,999.

3. Spesifisitas

Spesifisitas menurut Harmita (2004), spesifitas ditentukan dengan parameter resolusi (R_s). Rumus perhitungan resolusi:

$$R_s = \frac{t_R}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)}$$

Keterangan: R_s = resolusi

t_R = waktu retensi

W_1 = lebar dasar puncak pertama

W_2 = lebar dasar puncak kedua

Nilai Resolusi (R_s) harus mendekati atau lebih dari 1,5 karena akan memberikan pemisahan puncak yang baik (*base line resolution*) (International Conference on Harmonization, 2005).

4. Sensitifitas

a. *Limit of Detection* (LOD)

Limit of detection dapat dihitung berdasarkan persamaan regresi linier kurva kalibrasi rerata hasil penentuan uji linieritas :

$$LOD = 3 \times \frac{S_b}{S}$$

Keterangan : LOD = *Limit of detection*

S_b = Standar deviasi residual

S = Slope dari kurva kalibrasi (Riyanto, 2014)

b. *Limit of Quantification* (LOQ)

Limit of quantification dapat dihitung melalui berdasarkan persamaan regresi linier kurva kalibrasi rerata hasil penentuan uji linieritas:

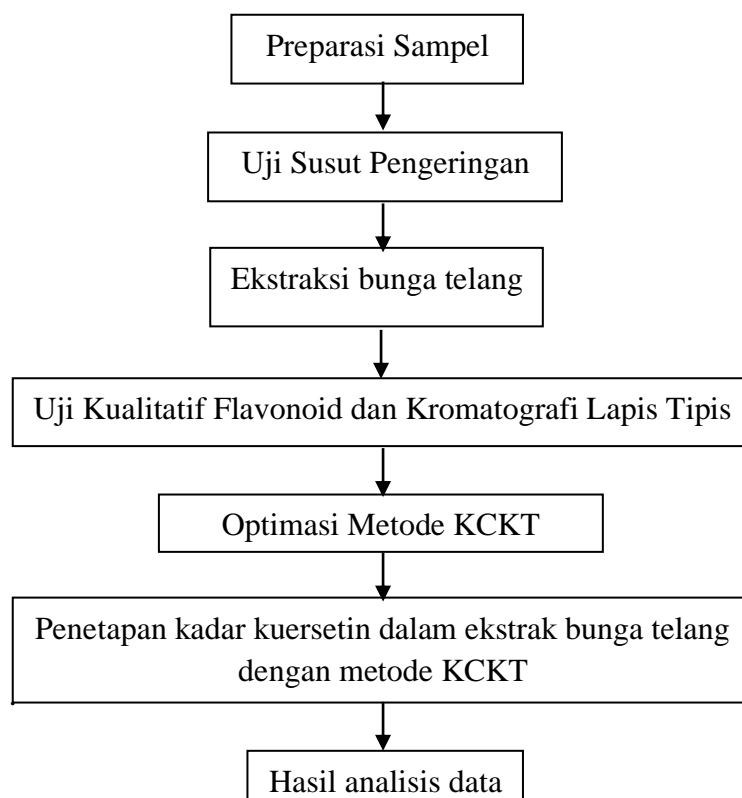
$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{S_b}{S}$$

Keterangan : LOQ = *Limit of quantification*

S_b = Standar deviasi residual

S = Slope dari kurva kalibrasi (Riyanto, 2014)

E. Alur Penelitian



Gambar 8. Alur Penelitian

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Fase gerak metanol:akuabides yang optimal untuk penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi adalah pada perbandingan 50:50.
2. Kadar kuersetin dalam ekstrak bunga telang yang diperoleh pada waktu retensi kuersetin antara 8,222-8,888 menit yaitu $0,078 \pm 4,358 \times 10^{-3} \%$ dengan koefisien variasi 5,58%, koefisien korelasi 0,999, spesifisitas dengan resolusi antara 1,272 hingga 3,341, *limit of detection* 0,045 ppm, dan *limit of quantification* 0,150 ppm.

B. Saran

Penelitian ditindaklanjuti dengan validasi metode analisis penetapan kadar kuersetin di dalam ekstrak bunga telang.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahuja, S., dan Dong, M. W., 2005, *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, Edisi Pertama, Elsevier, Inc: United Kingdom.
- Al Sanafi, A. E., 2016, Pharmacological Importance of *Clitoria ternatea*, *IOSR Journal of Pharmacy*, 6 (3) : 57-67.
- Aprilia, K., 2019, Potensi Antioksidan Ekstrak Air Kembang Telang (*Clitoria ternatea* L.) sebagai Teh Tradisional dalam Menghambat Peroksidasi Lipid, *Skripsi*, Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Apsari, P. D., dan Susanti, H., 2011, Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dengan Variasi Tempat Tumbuh secara Spektrofotometri, *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 2(1), 73-80.
- APVMA, 2004, *Guidelines for The Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Chemical Product*, Kingston APVMA, Australia.
- Anggraena, F. W., 2018, Validasi Metode Analisa Penetapan Kadar Nystatin dalam Tablet Nystatin Salut Gula 500.000 IU secara HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), *Skripsi*, Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia Yogyakarta, Yogyakarta.
- Azizah, D. N., Kumolowati, E., Faramayuda, F., 2014, Penetapan Kadar Flavonoid Metode $AlCl_3$ pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.), *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2).
- Budiasih, K. S., 2017, Kajian Potensi Farmakologis Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L). Di dalam: Sinergi Penelitian dan Pembelajaran untuk mendukung Pengembangan Literasi Kimia pada Era Global. *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Ruang Seminar FMIPA UNY: 14 Oktober 2017. Hal: 355-359.
- Cahyaningsih, E., Putu, E. S. K., Santoso, P., 2019, Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis, *Jurnal Ilmiah Medicament*, 5(1).

- Coskun, O., Kanter, M., Armutcu, F., Cetin, K., Kaybolmaz, B., and Yazgan, O., 2004, Protective Effect of Quercetin, a Flavonoid Antioxidant, in Absolute ethanol-induced Acute Gastric Ulcer. *Extr., J. Gen. Med.*, 1(3), 37-42.
- Dalimartha, S., 2008, *Atlas Tumbuhan Obat Jilid 5*, PT Pustaka Bunda, Jakarta.
- DepKes RI, 1995, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, DepKes RI, Jakarta.
- Ermer, J. H., Miller, McB. 2005, *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, A Guide to Best Practice, Wiley – Vch, Verlag GmbH and Co. KGaA: Weinheim.
- Gandjar, G. I., dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Belajar, Yogyakarta.
- Gandjar, G. I., dan Rohman, A., 2015, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Belajar, Yogyakarta.
- Guenther, E., 2011, *Minyak Atsiri*, UI Press, Jakarta.
- Gupta, V., Ajay DKJ., NS Gill, Kapil, G., 2012, Development and Validation of HPLC Method: A Review, *Int. Res., J. Pharm.*, 2(4), PP.17 – 25.
- Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3).
- Harvey, D., 2000, *Modern Analytical Chemistry*, The McGraw-Hill, Inc: USA.
- Huda, F. N., Noriham, A., Norrakiah, A. S., dan Babji, A. S., 2009, Antioxidant Activity of Plants Methanolic Extracts Containing Phenolic Compounds, *African Journal of Biotechnology*, 8 (3), 484-489.
- International Conference on Harmonization, 2005, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, <http://www.ich.org> (diakses pada 23 Oktober 2019 pukul 23.00 WIB).
- Kar, A., 2000, *Pharmaceutical Drug Analysis*, India: New Age Publication.
- Kazakevich, Y., dan Lobrutto, R., 2007., *HPLC for Pharmaceutical Scientist*, John Wiley dan Sons, Inc: New Jersey, PP. 25 – 192.
- Kazuma, K., Noda, K., Suzuki, M., 2013, Flavonoid Composition Related to Petal Color in Different Lines of *Clitoria ternatea*, *Phytochemistry*, 64 (1133-1139).
- Khopkar, S. M., 2008, *Konsep Dasar Kimia Analitik*, UI Press, Jakarta.

- Kusnaedi, K., dan Egie, T. D., 2017, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) dengan Metode Refluks, *Pancasakti Science Education Journal*, 2(1).
- Markham, K. R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, ITB, Bandung.
- Nair, V., Bang, W. Y., Schreckinger, E., Andarwulan, N., dan Zevallos, L. C., 2015, Protective Role of Ternatin Anthocyanins and Quercetin Glycosides from Butterfly Pea (*Clitoria ternatea* Leguminosae) Blue Flower Petals Against lipopolysaccharide (LPS)-induced Inflammation in Macrophage Cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 6355-6365.
- Pramudita, A. W., 2015, Validasi Metode Analisis Erdosteine secara KCKT yang Digunakan pada Validasi Pembersihan Peralatan Produksi dengan Cara Usap, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Departemen Kimia Farmasi, Surabaya.
- Pratama, A. A., 2015, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang Pohon Petai (*Parkia speciosa* Hassk.) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Riyanto, 2014, *Validasi dan Verifikasi Metode Uji*, Deepublish, Yogyakarta.
- Rohman, A., 2009, *Kromatografi Untuk Analisis Obat*, Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Rompas, R. A., Edy, H. J., Yudistira, A., 2014, Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dalam Lamun (*Syringodium* L.), *Jurnal FMIPA UNSRAT Manado Program Studi Farmasi*.
- Sastrohanmidjoyo, H., 2001, *Kromatografi*, UGM Press, Yogyakarta.
- Savic, I. M., Nikolic, V. D., Nikolic, L. B., and Stankovic, M. Z., 2013, Development and Validation of a New RP-HPLC Method for Determination of Quercetin in Green Tea, *Journal of Analytical Chemistry*, 68(10).
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R., 2007, *Principles of Instrumental Analysis*. Edisi Keenam, Thomson Brooks/Cole, Canada.
- Snyder, L., Kirkland, J., and Dolan, J., 2010, *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Sudjaji, 1988, *Metode Pemisahan*, Kanisius, Yogyakarta.

- Sukmawati, Widiastuti, H., dan Miftahuljanna., 2019, Analisis Kadar Kuersetin Pada Ekstrak Etanol Daun Miana (*Plectranthus scutellaroides* (L.)R.Br.) Secara HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), *As-Syifaa Jurnal Farmasi*, 11(01): 38-44.
- Vogel, 1978, *The Book of Practical Organic Chemistry 4th Edition*, Longman Group Limited, London.
- Voight, R., 1995, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandhi, UGM Press, Yogyakarta.
- Waji, R. A., 2009, Flavonoid (*Quercetin*), *Makalah Kimia Organik Bahan Alam*, Program S2 Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Wiji, H., Mudzakir, A., Zakiyah, F. S., Siswaningsih., 2010, *Penuntun Praktikum Kimia Analitik Instrumen*, Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.
- Yuwono, M. and Indrayanto, G., 2005, Validation of Chromatographic Methods of Analysis, Profile of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, *Elseiver Inc*, 32, 243-259.