



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

ANALISIS KUERSETIN DAN KAEMPFEROL DALAM BEBERAPA TUMBUHAN OBAT DARI KELUARGA ZINGIBERACEAE DENGAN METODA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

TESIS



**ZULFISA
06213008**

**PROGRAM STUDI FARMASI
PASCASARJANA UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2010**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Hai orang-orang yang beriman, apabila dikatakan kepadamu, "Berlapang-lapanglah dalam majelis," maka lapangkanlah, niscaya Allah akan memberikan kelapangan untukmu. Dan apabila dikatakan, "Berdirilah kamu," maka berdirilah, niscaya Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha Mengetahui apa yang kamu kerjakan. (QS. Al-Mujadilah : 11)

Sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan, Maka apabila kamu telah selesai dari suatu urusan, Kerjakanlah dengan sungguh urusan yang lain, Dan hanya kepada Tuhanlah hendaknya kamu berharap. (QS. Al-Insyirah : 6 - 8)

Saat ini kuhentikan langkahku sejenak
Untuk menyebutkan asma-Mu ya Allah...
Dalam Ridho-Mu....kubersyukur
Atas rahmat dan karunia yang Engkau limpahkan....
Kini setiapak tantangan sudah kulalui
Secerah cita dan kebahagiaan telah kuraih
Namun perjuangan ini belum usai
Perjalanan nan panjang masih terhampar...

Kupersembahkan hasil karya ini,
Kepada anak-anakku tersayang
Nico, Nici, Adhi dan Reva.....
Semoga menjadi anak yang sholeh
Teruslah mengejar cita-cita.....

Kepada teman-teman S2 Farmasi 06
Wid, Riza, Eka, Rina, Evie, dan Hendri
Juga buat warga KTO, Wid, Nova, Polo, Yuli, dan Reni
Trims atas bantuannya

fisa

ANALISIS KUERSETIN DAN KAEMPFEROL DALAM BEBERAPA TUMBUHAN OBAT DARI KELUARGA ZINGIBERACEAE DENGAN METODA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Oleh : ZULFISA

(Di bawah bimbingan Adek Zamrud Adnan dan Deddi Prima Putra)

RINGKASAN

Tumbuhan dari keluarga Zingiberaceae telah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional, seperti lengkuas (*Alpinia galanga* Linn.), kunyit (*Curcuma domestica* Val.), jahe (*Zingiber officinale* Rosc.), kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) dan kapulaga (*Amomum cardamomum* Willd.). Berbagai penelitian telah dipublikasikan tentang hubungan kandungan kimia dan aktivitas biologis dari ekstrak Zingiberaceae, salah satunya adalah sebagai antioksidan. Beberapa senyawa flavonoid diketahui berpotensi sebagai antioksidan. Senyawa flavonoid yang terkandung dalam tumbuhan Zingiberaceae diantaranya adalah kuersetin dan kaempferol yang diinformasikan mempunyai aktivitas sebagai antioksidan.

Flavonoid dapat dianalisa dengan metoda kromatografi lapis tipis, kromatografi gas, kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), elektrokromatografi kapiler, *high-speed counter-current* kromatografi dan GC-MS. Sebagai metoda pemisahan yang modern, HPLC telah dikembangkan secara luas untuk menentukan senyawa aktif yang terkandung dalam tumbuhan.

Beberapa peneliti telah melakukan analisis kandungan flavonoid dari tumbuhan Zingiberaceae dengan metoda kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan fasa gerak yang terdiri dari campuran beberapa pelarut. Dari latar belakang tersebut dilakukanlah penelitian untuk mendapatkan suatu sistem KCKT dalam menganalisis dan menentukan kadar kuersetin dan kaempferol pada

beberapa tumbuhan Zingiberaceae menggunakan sistem adsorpsi fasa terbalik dengan fasa diam C-18 dan fasa gerak yang terdiri dari campuran pelarut polar yang lebih sederhana yaitu metanol dan air.

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Biota Sumatera, Universitas Andalas pada bulan Januari sampai Juni 2010. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah flavonoid standar (kuersetin dan kaempferol), metanol p.a, Aqua-bidest, aqua-dest asam klorida p.a, asam formiat p.a, heksana, etil asetat, NH_4OH , asam askorbat dan 4 jenis rimpang yaitu lengkuas (*Alpinia galanga* Linn.), kunyit (*Curcuma domestica* Val.), jahe (*Zingiber officinale* Rosc.), kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) dan buah kapulaga (*Amomum cardamomum* Willd.).

Penelitian ini dapat dibagi 3 tahap meliputi tahap pertama penyiapan ekstrak dari beberapa tumbuhan Zingiberaceae yaitu ekstraksi tumbuhan dengan cara hidrolisis. Tahap kedua adalah menentukan kondisi kromatografi cair kinerja tinggi untuk analisa kuersetin dan kaempferol serta validasi metoda KCKT. Tahap akhir adalah analisis dan menentukan kadar kuersetin dan kaempferol dalam tumbuhan Zingiberaceae.

Analisa KCKT yang digunakan adalah sistem adsorpsi fasa terbalik dengan fasa diam C-18 dan fasa gerak campuran metanol dalam air dengan sistem gradien elution (20-100%), kecepatan alir fasa gerak 1 mL/menit dan detektor UV diatur dengan panjang gelombang 341 nm, telah dapat menganalisa kuersetin dan kaempferol.

Validasi metoda yang dilakukan meliputi, linieritas terhadap kuersetin standar diperoleh koefisien korelasi (r) 0,9997, batas deteksi 0,279 $\mu\text{g/mL}$ dan

batas kuantisasi 4,279 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan linieritas terhadap kaempferol standar diperoleh koefisien korelasi (r) 0,9998, batas deteksi 3,155 $\mu\text{g/mL}$ dan batas kuantisasi 14,264 $\mu\text{g/mL}$, presisi sistem didapat RSD sebesar 1,18%, presisi metoda dengan RSD 0,7%, serta akurasi dan *recovery* sebesar 99,98%.

Hasil analisis senyawa flavonoid pada tumbuhan Zingiberaceae diperoleh kuersetin pada buah kapulaga yang berasal dari Bukittinggi, Batusangkar dan Alahan Panjang berturut-turut adalah 0,0205; 0,0170; 0,0085 % sampel kering, sedangkan pada rimpang kencur Bukittinggi, Alahan Panjang dan Batusangkar, adalah 0,0115; 0,0060; 0,0040% sampel kering. Kadar kaempferol yang diperoleh pada rimpang Lengkuas yang berasal dari Bukittinggi, Batusangkar dan Alahan Panjang adalah 0,0225; 0,0160; 0,0075% sampel kering, pada rimpang jahe Bukittinggi, Batusangkar dan Alahan Panjang adalah 0,0205; 0,0175; 0,0070 % sampel kering, dan pada rimpang kencur yang berasal dari Batusangkar, Alahan Panjang dan Bukittinggi adalah 0,0260; 0,0175; 0,0160 % sampel kering.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sistem KCKT yang digunakan dapat memisahkan senyawa flavonoid yang diuji, dan perbedaan tempat tumbuh berpengaruh pada kadar flavonoid yang terkandung dalam tumbuhan Zingiberaceae.

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa isi Tesis yang ditulis dengan judul :

**“ANALISIS KUERSETIN DAN KAEMPFEROL DALAM BEBERAPA
TUMBUHAN OBAT DARI KELUARGA ZINGIBERACEAE DENGAN
METODA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI”.**

Adalah hasil kerja/karya saya sendiri dan bukan merupakan jiplakan hasil kerja/karya orang lain, kecuali kutipan pustaka yang sumbernya dicantumkan. Jika di kemudian hari pernyataan ini tidak benar, maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

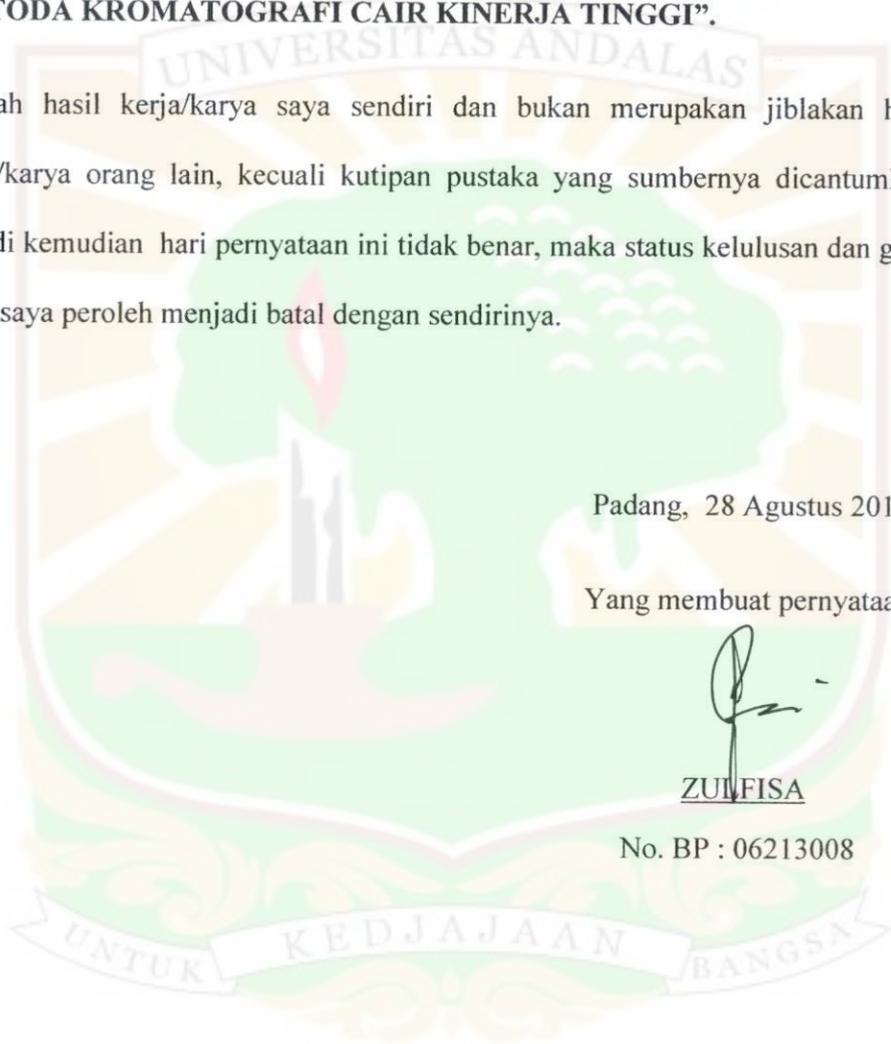
Padang, 28 Agustus 2010

Yang membuat pernyataan,



ZULFISA

No. BP : 06213008



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 24 Desember 1964 di Bukittinggi, sebagai anak pertama dari ayah Syahwir dan ibu Zuwirda. Penulis menamatkan SD pada tahun 1976, di SD Fransiskus Bukittinggi, SMP pada tahun 1980 di MTsN II Bukittinggi dan SMA tahun 1983 di SMAN 3 Bukittinggi. Penulis memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada jurusan Farmasi FMIPA Universitas Andalas Padang tahun 1993.

Penulis menikah pada tahun 1988 dengan Afirzon (alm) dan telah dikaruniai empat orang putra yaitu, Nico Sonisa (1989), Nici Sonisa (1991), Adhi Makayasa Sonisa (1993) dan Reva Prasetya Sonisa (1997).

Sejak tahun 1993-2001 penulis menjadi Staf pengajar pada SMF YIB Bukittinggi. Semenjak tahun 2001 sampai sekarang penulis bertugas sebagai dosen di AKFAR Dwi Farma Bukittinggi dan memperoleh kesempatan meneruskan pendidikan pada Program Pascasarjana Universitas Andalas di Padang.



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan hidayah-Nya hingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Tesis ini ditulis berdasarkan hasil penelitian yang berjudul “Analisa Kuersetin Dan Kaempferol Dalam Beberapa Tumbuhan Obat Dari Keluarga Zingiberaceae Dengan Metoda Kromatografi cair kinerja Tinggi”.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sedalam – dalamnya kepada Bapak Prof.Dr.Adek Zamrud Adnan, MS, Apt dan Dr. Deddi Prima Putra, Apt sebagai pembimbing yang telah meluangkan waktu untuk memberikan arahan dan bimbingannya selama penelitian dan penulisan sehingga tesis ini terwujud.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. H. Novirman Jamarun. M.Sc selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Andalas.
2. Bapak Prof. Dr. Dachriyanus, Apt selaku Ketua Program Studi Farmasi Universitas Andalas.
3. Bapak Prof. Dr. H. Dayar Arbain, Apt selaku Kepala Laboratorium Biota Sumatera Universitas Andalas beserta Staf yang telah memberikan fasilitas untuk pelaksanaan penelitian ini.
4. Bapak/Ibu Dosen Program Studi Farmasi Pascasarjana Universitas Andalas.

5. Ibu Dra. 'Ainun Naim, Apt selaku Direktur Akademi Farmasi Dwi Farma Bukittinggi yang telah memberikan dukungan moril maupun materil kepada penulis selama pendidikan.
6. Analis Laboratorium Biota Sumatera Universitas Andalas dan rekan-rekan mahasiswa yang membantu penulis selama kuliah dan dalam melakukan penelitian.

Akhirnya penulis berharap semoga hasil penelitian yang dituangkan dalam tesis ini akan bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang Analisis Farmasi.

Padang, Agustus 2010.

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
II. Tinjauan Pustaka	6
2.1. Tinjauan botani tumbuhan Zingiberaceae.....	6
2.1.1 Tinjauan botani tumbuhan jahe	6
2.1.2 Tinjauan botani tumbuhan kunyit	8
2.1.3 Tinjauan botani tumbuhan lengkuas	10
2.1.4 Tinjauan botani tumbuhan kencur	12
2.1.5 Tinjauan botani tumbuhan kapulaga	14
2.2. Flavonoid	16
2.2.1 Kuersetin.....	17

2.2.2 Kaempferol	19
2.2.3 Sifat fisika dan kimia flavonoid	20
2.2.4 Deteksi flavonoid	21
2.2.5 Ekstraksi flavonoid	21
2.2.6 Penentuan struktur flavonoid	21
2.2.7 Hidrolisis flavonoid	25
2.3. Kromatografi Cair kinerja Tinggi	26
2.3.1 Sejarah singkat Kromatografi Cair.....	26
2.3.2 Tipe-tipe Kromatografi.....	29
2.3.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	30
2.3.4 Aplikasi KCKT	31
2.3.5 Jenis-jenis KCKT	34
2.3.6 Peralatan KCKT	37
2.3.7 Uji kesesuaian sistem	39
2.4. Validasi Metoda	40
2.4.1 Akurasi (Ketepatan).....	42
2.4.2 Presisi.....	42
2.4.3 Selektifitas (Spesifisitas)	42
2.4.4 Linieritas	43
2.4.5 Rentang.....	43
2.4.6 Kepekaan (Sensitivitas).....	44
2.4.7 Stabilitas	44
2.4.8 Ruggedness.....	45

III. METODOLOGI PENELITIAN.....	46
3.1. Waktu dan Tempat.....	46
3.2. Alat dan Bahan.....	46
3.2.1. Alat.....	46
3.2.2. Bahan.....	46
3.3. Pelaksanaan Penelitian.....	47
3.3.1. Pengambilan sampel.....	47
3.3.2. Penyiapan sampel.....	47
3.3.3. Ekstraksi flavonoid	47
3.3.4. Penyiapan fase gerak.....	48
3.3.5. Validasi metoda.....	48
3.3.6. Penentuan kadar flavonoid	50
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	51
4.1. Hasil.....	51
4.2. Pembahasan.....	53
4.2.1 Ekstraksi sampel	53
4.2.2 Validasi Metoda KCKT.....	55
4.2.3 Standar pembanding	60
4.2.4 Analisa kuantitatif flavonoid	63
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	67
5.1. Kesimpulan.....	67
5.2. Saran.....	68
DAFTAR KEPUSTAKAAN.....	69
LAMPIRAN.....	74

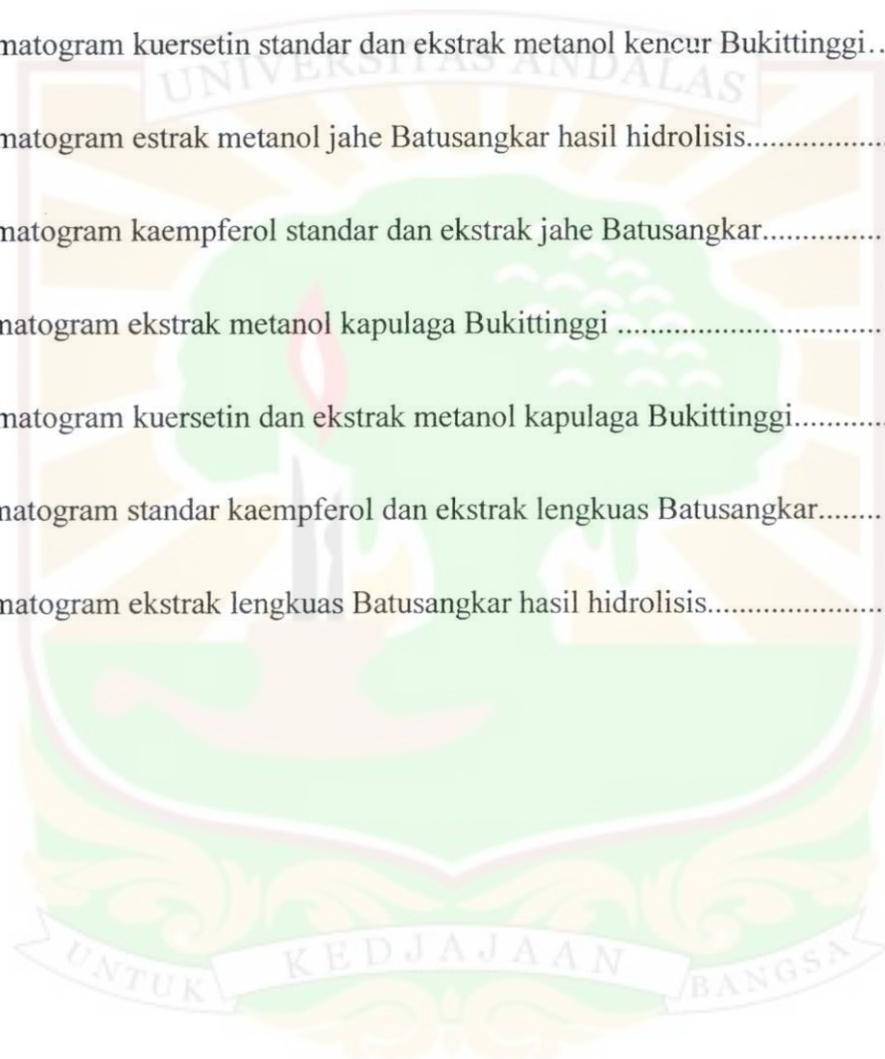
DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Klasifikasi kromatografi	29
2. Kondisi sistem gradien KCKT.....	64
3. Linieritas kaempferol standar	77
4. Linieritas kuersetin standar	80
5. Perhitungan BD dan BK kaempferol	82
6. Perhitungan BD dan BK kuersetin	84
7. Presisi sistem menggunakan standar kuersetin	86
8. Presisi metoda terhadap campuran standar kaempferol dengan ekstrak metanol. kencur Batusangkar.....	86
9. Akurasi dan <i>recovery</i> terhadap standar kuersetin	87
10. Hasil uji presisi interday terhadap larutan standar kaempferol	88
11. Data spectrum U.V kaempferol dengan pereaksi geser	94
12. Data spectrum U.V kuersetin dengan pereaksi geser	94
13. Analisis kuersetin dalam kapulaga dan kencur dengan KCKT	95
14. Analisis kaempferol dalam lengkuas, jahe dan kencur dengan KCKT	96

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Struktur umum flavonoid.....	17
2. Rumus bangun kuersetin	18
3. Rumus bangun kaempferol.....	19
4. Diagram Alir KCKT.....	39
5. Skema kerja analisa kuersetin dan kaempferol	74
6. Foto tumbuhan Zingiberaceae.....	75
7. Foto alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	76
8. Kurva kalibrasi kaempferol standar antara konsentrasi dan luas puncak...	77
9. Kurva kalibrasi kuersetin standar antara konsentrasi dan luas puncak.....	80
10. Kromatogram standar kuersetin dan kaempferol dalam metanol.....	89
11. Spektrum UV kaempferol dalam metanol.....	90
12. Spektrum UV kaempferol dengan pereaksi NaOAc/metanol.....	90
13. Spektrum UV kaempferol dengan pereaksi $AlCl_3$ / metanol	90
14. Spektrum UV kaempferol dengan pereaksi $AlCl_3$ /HCl/metanol.....	91
15. Spektrum UV kaempferol dengan pereaksi NaOAc/ As borat/metanol.....	91
16. Spektrum UV kaempferol dengan pereaksi NaOH/ metanol.....	91
17. Spektrum UV kuersetin dengan pereaksi NaOAc/ metanol	92

18. Spektrum UV kuersetin dengan pereaksi NaOAc/ H_3BO_3	92
19. Spektrum UV kuersetin dengan pereaksi NaOH/ metanol	92
20. Spektrum UV kuersetin dengan pereaksi $AlCl_3$ / metanol.....	93
21. Kromatogram ekstrak metanol hasil hidrolisis kencur Bukittinggi.....	98
22. Kromatogram kuersetin standar dan ekstrak metanol kencur Bukittinggi...	98
23. Kromatogram ekstrak metanol jahe Batusangkar hasil hidrolisis.....	99
24. Kromatogram kaempferol standar dan ekstrak jahe Batusangkar.....	99
25. Kromatogram ekstrak metanol kapulaga Bukittinggi	100
26. Kromatogram kuersetin dan ekstrak metanol kapulaga Bukittinggi.....	100
27. Kromatogram standar kaempferol dan ekstrak lengkuas Batusangkar.....	101
28. Kromatogram ekstrak lengkuas Batusangkar hasil hidrolisis.....	101



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Skema kerja analisis kuersetin dan kaempferol dari tumbuhan Zingiberaceae	74
2. Tumbuhan Zingiberaceae	75
3. Alat kromatografi cair kinerja tinggi	76
4. Linieritas dan kurva kalibrasi standar	77
5. Penentuan sensitivitas	82
6. Presisi sistem dan presisi metoda	86
7. Akurasi dan <i>recovery</i>	87
8. Ruggedness	88
9. Uji spesifisitas	89
10. Spektrum U.V kaempferol dengan pereaksi geser	90
11. Spektrum U.V kuersetin dengan pereaksi geser	92
12. Analisis flavonoid dalam tumbuhan Zingiberaceae	95
13. Kromatogram analisis kuersetin dan kaempferol dalam tumbuhan Zingiberaceae dengan KCKT	98

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Dewasa ini meski pengobatan modern sudah mengalami perkembangan yang cukup pesat namun sebahagian masyarakat Indonesia masih menggunakan warisan leluhur berupa obat tradisional. Berbagai alasan yang mendasar seperti aspek ekonomi dan keamanan bagi kesehatan menjadi pertimbangan dalam penggunaan obat tradisional, yang dipercaya tidak menimbulkan efek samping seperti obat sintetis. Beberapa jenis tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah dari keluarga Zingiberaceae, antara lain lengkuas (*Alpinia galanga* Linn.), kunyit (*Curcuma domestica* Val.), jahe (*Zingiber officinale* Rosc.), kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) dan kapulaga (*Amomum cardamomum* Willd.) (Anonim, 1980).

Zingiberaceae merupakan keluarga tumbuhan yang secara luas tumbuh didaerah tropis, terutama di Asia Tenggara yang dalam kehidupan sehari-hari selain digunakan sebagai rempah juga dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat tradisional, pewarna dan bahan dasar parfum (Perry, L.M, 1980). Tumbuhan dari keluarga Zingiberaceae ini memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder terutama golongan minyak atsiri, terpenoid dan flavonoid (Norajit, *et. al*, 2007).

Berbagai penelitian telah dipublikasikan tentang hubungan kandungan kimia dan aktivitas biologis dari ekstrak Zingiberaceae (Norajit, K *et.al*, 2007), salah satunya adalah sebagai antioksidan (Yang, R.Y *et.al*, 2008).

Senyawa antioksidan memiliki peran yang sangat penting dalam kesehatan, karena kemampuannya mengurangi resiko penyakit kronis seperti kanker dan penyakit jantung koroner. Karakter utama senyawa antioksidan adalah kemampuannya untuk menangkap radikal bebas (Lugasi, A *et.al*, 2003). Radikal bebas dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, lemak bahkan DNA sel dan menginisiasi timbulnya penyakit degeneratif (Aqil, F *et. al*, 2006). Beberapa senyawa flavonoid diketahui berpotensi mengurangi resiko terhadap penyakit degeneratif (Nuengchamnon, N *et.al*, 2004).

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder tumbuhan dari golongan polifenol. Struktur dasar dari molekul flavonoid disusun oleh dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tak dapat membentuk cincin ketiga serta dapat mengalami berbagai substitusi, termasuk glikosilasi, hidrogenasi, hidroksilasi, malonilasi, metilasi dan sulfasi (Yang, R .Y *et. al*, 2008). Flavonoid dibagi dalam beberapa kelas sesuai dengan tingkat substitusi dan oksidasi pada cincin tengah. Subklas yang utama adalah anthosianidin, flavanol, flavon, flavonol, flavanon dan isoflavon (Tokusoqlu, O *et al*, 2003).

Flavonoid memiliki aktivitas farmakologi yang beragam seperti antioksidan, antibakteri, antifungi, antivirus, antiinflamasi, antihepatotoksik, dan antikanker (Chen, X.Q & Xiao, J.B, 2005). Golongan Flavonol (kuersetin, kaempferol dan myrisetin) dan flavon (luteolin dan apigenin) merupakan senyawa yang penting sebagai antioksidan dan kemampuannya menetralkan radikal bebas (Gang, Z,Y *et. al*, 2006).

Faktor lingkungan seperti iklim, cuaca, lokasi tumbuh dan derajat kematangan sangat berpengaruh terhadap komponen kandungan kimia dalam tumbuhan, termasuk flavonoid dan golongan polifenol lainnya (Lugasi, A *et.al*, 2003). Sampai saat ini, belum ada penelitian terhadap jenis dan kandungan tumbuhan keluarga Zingiberaceae dari Sumatera Barat, maka untuk itu perlu dilakukan pengujian kandungan flavonoid tumbuhan ini yang berasal dari tiga daerah di Sumatera barat yaitu Batusangkar, Bukittinggi dan Alahan Panjang.

Flavonoid dapat dianalisa dengan berbagai metoda seperti kromatografi lapis tipis, kromatografi gas, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), elektrokromatografi kapiler, high-speed counter-current kromatografi, kromatografi gas-spektrometri massa. Sebagai metoda pemisahan yang modern, KCKT telah dikembangkan secara luas untuk menentukan senyawa aktif yang terkandung dalam tumbuhan (Gang, Z,Y *et. al*, 2006). Disamping itu pemakaiannya sekarang secara luas telah digunakan terutama dalam identifikasi maupun penetapan kadar flavonoid dari ekstrak tumbuhan (Barbosa, W L R *et. al* 2006).

Yang dan kawan-kawan, mengekstraksi kandungan flavonoid dari beberapa tumbuhan melalui proses hidrolisis, yaitu dengan cara menambahkan asam askorbat pada campuran larutan asam klorida 1,2 M dalam metanol, kemudian direfluks pada T 80°C selama 2 jam. Hasil hidrolisis dianalisa menggunakan metoda kromatografi cair kinerja tinggi (Yang, R.Y *et.al*, 2008).

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi dari beberapa rimpang tumbuhan keluarga Zingiberaceae melalui proses hidrolisis dan dilanjutkan dengan analisis

flavonoid menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi . Validasi metoda yang dilakukan antara lain uji linieritas, sensitifitas, presisi, akurasi dan *recovery*, ruggedness dan selektifitas.

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah tumbuhan keluarga Zingiberaceae (*Alpinia galanga* Linn., *Curcuma longa* val., *Zingiber officinale* Rosc., *Kaempferia galanga* Linn., dan *Amomum cardamomum* Willd.) yang tumbuh di tiga tempat berbeda mempunyai kandungan kimia flavonoid ?
2. Apa saja jenis Flavonoid yang terdapat pada beberapa tumbuhan keluarga Zingiberaceae tersebut ?
3. Apakah metoda KCKT dapat digunakan dengan baik dalam menganalisis senyawa flavonoid dari keluarga Zingiberaceae?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan kondisi gradien sistem KCKT untuk pemisahan senyawa flavonoid serta penentuan validasi metoda menggunakan beberapa parameter uji.
2. Untuk mendapatkan informasi jenis dan kadar flavonoid yang terkandung dalam tumbuhan obat dari keluarga zingiberaceae (*Alpinia galanga* linn., *Curcuma longa* val., *Zingiber officinale* Rosc., *Kaempferia galanga* Linn. dan *Amomum cardamomum* Willd.).

1.4. Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh suatu data tentang jenis dan kadar flavonoid dari lima jenis tumbuhan obat yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan botani tumbuhan keluarga Zingiberaceae

2.1.1 Tinjauan botani tumbuhan jahe

1. Klasifikasi tumbuhan jahe

Tumbuhan jahe dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Sutrisno, 1998):

Kingdom : Plantae
Divisio : Spermatophyta
Subdivisio : Angiospermae
Klas : Monocotyledonae
Ordo : Zingiberales
Famili : Zingiberaceae
Genus : *Zingiber*
Spesies : *Zingiber officinale* Rosc.

Tumbuhan ini memiliki beberapa nama daerah seperti halia (Aceh), bening (Gayo), sipadeh (Sumatera Barat), cipakan (Bali), jae (Jawa Tengah), jahe (Sunda), bahing (Batak), lahia (Nias), jahi (Lampung) (Depkes R.I, 2001).

2. Morfologi tumbuhan jahe

Tumbuhan berbatang semu, tinggi 30 cm sampai 1 m, rimpang bila dipotong berwarna kuning atau jingga. Daun sempit, panjang 15 mm sampai 23 mm, lebar 8 mm sampai 15 mm, tangkai daun berambut, panjang 2 mm sampai 4 mm; bentuk

lidah daun memanjang, panjang 7,5 mm sampai 1 cm, tidak berambut. Perbungaan berupa malai tersembul dipermukaan tanah, berbentuk tongkat atau bulat telur sempit, 2,75 sampai 3 kali lebarnya, sangat tajam, panjang malai 3,5 cm sampai 5 cm, lebar 1,5 cm sampai 1,75 cm, gagang bunga hampir tidak berambut, panjang 25 cm, sisik pada gagang terdapat 5 buah sampai 7 buah, berbentuk lanset, letaknya berdekatan atau rapat, hampir tidak berambut, panjang sisik 3 cm sampai 5 cm. Daun pelindung berbentuk bundar telur terbalik, bulat ujungnya, tidak berambut, berwarna hijau cerah, panjang 2,5 cm, lebar 1 cm sampai 1,75 cm; mahkota bunga berbentuk tabung, panjang tabung 2 cm sampai 2,5 cm, helainya agak sempit, bentuk tajam, berwarna kuning kehijauan, panjang 1,5 mm sampai 2,5 mm, lebar 3 mm sampai 3,5 mm, berwarna ungu gelap, berbintik-bintik berwarna putih kekuningan, panjang 12 mm sampai 15 mm, lebar 13 mm; kepala sari berwarna ungu, panjang 9 mm, dan dua tangkai putik (Brink.R. C. B,V. D, 1968).

3. Kandungan kimia tumbuhan jahe

Kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan jahe terutama minyak atsiri (zingiberen, zingiberol, dan gingerol), terpenoid, dan flavonoid seperti flavon glikosida dan rutin (Ghasemzadeh, A, *et.al*, 2010).

4. Khasiat tumbuhan jahe

Tumbuhan jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) merupakan salah satu rempah-rempahan yang telah lama digunakan sebagai bahan baku obat tradisional, bagian tumbuhan yang dimanfaatkan adalah rimpangnya. Tumbuhan ini dilaporkan

mempunyai bioaktivitas sebagai antioksidan (Olukemi, O.A *et. al*, 2005). Tumbuhan jahe juga berkhasiat sebagai karminatif, anti muntah, pereda kejang, anti pengerasan pembuluh darah, peluruh keringat, anti inflamasi, anti mikroba dan anti piretik (Depkes, 1978).

2.1.2 Tinjauan botani tumbuhan kunyit

1. Klasifikasi tumbuhan kunyit

Tumbuhan kunyit dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Sutrisno, 1998):

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Klas	: Monocotyledonae
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: <i>Curcuma</i>
Spesies	: <i>Curcuma domestica</i> Val.

Tumbuhan ini mempunyai beberapa nama daerah seperti kunyet (Aceh), kunit (Banjar), kunyir (Sunda), kunyit (Melayu), temu kuning (Jawa) (Depkes, 1977).

2. Morfologi tumbuhan kunyit

Terna dengan batang berwarna semu hijau atau agak keunguan, rimpang terbentuk dengan sempurna, bercabang-cabang, berwarna jingga. Setiap tanaman

berdaun 3 sampai 8 helai, panjang tangkai daun beserta pelepah daun sampai 70 cm ; tanpa lidah-lidah, berambut halus jarang-jarang, helaian daun berbentuk lanset lebar, ujung daun lancip berekor, keseluruhannya berwarna hijau atau hanya bagian atas dekat tulang utama berwarna agak keunguan, panjang 28 cm sampai 85 cm dan lebar 10 cm sampai 25 cm. Perbungaan terminal, gagang berambut, bersisik, panjang gagang 16 cm sampai 40 cm; tenda bunga, panjang 10 cm sampai 19 cm, lebar 5 cm sampai 10 cm; daun kelopak berambut, berbentuk lanset, panjang 4 cm sampai 8 cm, lebar 2 cm sampai 3,5 cm, daun kelopak yang paling bawah berwarna hijau, berbentuk bundar telur, makin keatas makin menyempit serta memanjang, warna semu putih atau keunguan, kelopak berbentuk tabung, panjang 9 mm sampai 13 mm, bergigi 3 dan tipis seperti selaput; tajuk bagian bawah berbentuk tabung, panjang lebih kurang 20 mm, berwarna krem, bagian dalam tabung berambut; tajuk bagian ujung berbelah-belah, warna putih atau merah jambu, panjang 10 mm sampai 15 mm, lebar 11 mm sampai 14 mm; bibir berbentuk bundar telur, panjang 16 mm sampai 20 mm, lebar 15 mm sampai 18 mm, warna jingga atau kuning keemasan dengan pinggir berwarna coklat dan ditengahnya berwarna kemerahan (Brink,R. C. B. V. D, 1968).

3. Kandungan kimia kunyit

Kandungan utama dalam rimpang kunyit yaitu kurkumin, desmetoksikurkumin, bidesmetoksikurkumin, minyak atsiri (ar-tumeron, α dan β -tumeron, tumerol, α -atlanton, β -kariofilen, linalol, 1,8 sineol), resin, oleoresin, flavonoid dan saponin. (Parinussa ,TMS dan Timotius, K H, 2006).

4. Khasiat tumbuhan kunyit

Kunyit (*Curcuma domestica* Val.) selain bermanfaat sebagai penyedap, juga mengandung zat warna kuning (kurkuminoid) yang berfungsi sebagai zat warna alami pada makanan. Kunyit adalah salah satu tanaman obat potensial, melalui pengujian aktivitas antiradikal bebas dilaporkan ekstrak rimpang kunyit mempunyai potensi sebagai antioksidan (Jang,H.D *et.al*, 2006). Masyarakat juga memanfaatkan rimpang kunyit sebagai antikoagulan, penurun tekanan darah, obat cacing, obat asma, obat sakit perut, penyakit hati, karminatif, stimulan, gatal-gatal, gigitan serangga, diare dan rematik (Dep Kes RI, 2001).

2.1.3 Tinjauan botani tumbuhan lengkuas

1. Klasifikasi tumbuhan lengkuas

Tumbuhan lengkuas diklasifikasikan sebagai berikut (Sutrisno, 1998):

Kingdom : Plantae

Divisio : Spermatophyta

Subdivisio : Angiospermae

Klas : Monocotyledone

Ordo : Zingiberales

Famili : Zingiberaceae

Genus : *Alpinia*

Spesies : *Alpinia galanga* Linn.

Tumbuhan ini mempunyai beberapa nama daerah seperti laos (Jawa), laju (Sunda), lengkuweneh (Gayo), langkuweh (Minangkabau), isen (Bali)(Heyne, 1987).

2.Morfologi tumbuhan lengkuas

Lengkuas merupakan tanaman terna dengan tinggi 1-2 meter. Daun lengkuas berbentuk lonjong, tipis dan berwarna hijau tidak mengkilat. Panjang daun bisa mencapai 25 – 47 cm. Bunga lengkuas berwarna putih dan keunguan terletak diujung atas batang tanaman. Lengkuas dikenal dua varietas, yaitu varietas merah dan putih. Varietas merah, rimpangnya tertutup dengan lapisan tipis berwarna merah, sedangkan varietas putih rimpangnya tertutup lapisan tipis berwarna putih. Rimpang ini sukar dipotong karena seratnya yang kasar (Brink, R. C, B. V. D, 1968)

3.Kandungan kimia lengkuas

Lengkuas mengandung minyak atsiri dengan komponen utama adalah mirsen (95%), selebihnya adalah sineol, galangol, linalool, eugenol, galangin, etil trans-sinamat dan etil 4-metoksi-trans-sinamat. Rimpang lengkuas juga mengandung senyawa galangin monometil eter, kaempferol, kuersetin dan kaempferida, senyawa diarilheptanoid yang dikenal sebagai galangol; senyawa fenilalkil keton yaitu gingerol (9); kavikol β -D-Glukopiranosida; senyawa neolignan yaitu galanganal; senyawa sesquieneolignan yaitu galanganols A, B, C; dan senyawa trans-p-kumaril alkohol (Morikawa, T *et.al*, 2005).

4. Khasiat tumbuhan lengkuas

Lengkuas (*Alpinia galanga* Linn.) merupakan salah satu jenis tumbuhan yang tersebar luas didaerah tropis, secara tradisional rimpangnya digunakan untuk mengobati berbagai penyakit kulit. Tumbuhan ini juga dilaporkan mempunyai bioaktivitas sebagai antioksidan (Tachakittirungrod, S and Chowwanapoonpohn, S., 2007).

2.1.4 Tinjauan botani tumbuhan kencur

1. Klasifikasi tumbuhan kencur

Tumbuhan kencur diklasifikasikan sebagai berikut (Sutrisna, 1998) :

- Kingdom : Plantae
 Divisio : Spermatophyta
 Subdivisio : Angiospermae
 Klas : Monocotyledonae
 Ordo : Zingiberales
 Famili : Zingiberaceae
 Genus : *Kaemferia*
 Spesies : *Kaemferia galanga* Linn.

Tumbuhan ini mempunyai beberapa nama daerah seperti kencur (Jawa), cikur (Sunda), ceuko (Aceh), kencor (Madura), cekuh (Bali), sukung (Minahasa), asauli, sauleh, umpa (Ambon), cekir (Sumba), kencur (Melayu) (Depkes RI, 2001).

2. Morfologi tumbuhan kencur

Terna yang hampir menutupi tanah, tidak berbatang, rimpang bercabang-cabang, berdesak-desakan, akar-akar berbentuk gelendong, kadang-kadang berumbi, panjang 1 cm sampai 1,5 cm. Setiap tanaman berdaun sebanyak 1 sampai 3 helai, lebar merata dan hampir menutupi tanah, daun berbentuk jorong lebar sampai hampir bundar, pangkal hampir berbentuk jantung, ujung mendadak lancip, bagian atas tidak berambut, bagian bawah berambut halus, pinggir bergelombang berwarna merah kecoklatan, bagian tengah berwarna hijau, panjang helai daun 7 cm sampai 15 cm, lebar 2 cm sampai 8 cm, tangkai pendek, berukuran 3 mm sampai 10 mm, pelepah terbenam dalam tanah, panjang 1,5 cm sampai 3,5 cm, warna putih. Perbungaan, panjang 4 cm dan mengandung 4 sampai 12 bunga. Kelopak berbentuk tabung, panjang lebih kurang 3 cm, bergerigi 2 sampai 3 buah. Tajuk berwarna putih dengan tabung panjang 2,5 cm sampai 5 cm, ujung berbelah-belah berbentuk pita mempunyai panjang 2,5 sampai 3 cm, lebar 1,5 sampai 3 mm (Brink, R. C, B. V. D, 1968).

3. Kandungan kimia kencur

Kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) merupakan salah satu rempah-rempahan yang telah lama digunakan sebagai bahan baku obat tradisional. Kencur mengandung minyak menguap seperti etil-*p*-methoksinnamat, cineol, metilsinamat, carvone, eucalyptol, pentadecana (Tewtrakul, S *et.al*, 2004) borneol, 4-carene, camphene, kaempferol dan kaemferide (Jang, H.D *et.al*, 2006).

4. Khasiat tumbuhan kencur

Tumbuhan kencur dapat mengobati berbagai macam penyakit, seperti radang lambung, radang anak telinga, influenza pada bayi, masuk angin, sakit kepala, batuk, diare, keseleo, dan untuk membersihkan darah kotor (Dep Kes RI, 2001).

2.1.5 Tinjauan botani tumbuhan kapulaga

1. Klasifikasi tumbuhan kapulaga

Tumbuhan kapulaga dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Sutrisno, 1998):

- Kingdom : Plantae
Divisio : Spermatophyta
Subdivisio : Angiospermae
Klas : Monocotyledonae
Ordo : Zingiberales
Famili : Zingiberaceae
Genus : *Amomum*
Spesies : *Amomum cardamomum* Willd.

Tumbuhan ini mempunyai beberapa nama daerah seperti ronde kardemon (Aceh), purwa palago (Sunda), kapulaga (Madura), kapulago (Minang Kabau) dan karkolaka (Makassar) (Heyne, K, 1987).

2. Morfologi tumbuhan kapulaga

Tumbuhan ini berupa herba tahunan. Tumbuhnya bergerombol dan memiliki banyak anakan. Batang semu yang tersusun oleh pelepah pelepah daun, berbentuk silendris dan berwarna hijau. Umbi Batang agak besar dan gemuk.

Daun tunggal, tersebar dan berwarna hijau tua. Helai daun licin atau agak berbulu, berbentuk lanset atau tombak, dengan pangkal dan ujung runcing dan tepi daun rata. Panjang daun sekitar 1-1,5 meter. Antara pelepah dan helai daun terdapat lidah yang ujungnya tumpul, panjang sekitar 0,5 cm.

Akar serabut dan berwarna putih kotor. Rimpang bulat panjang, bercabang dan berwarna putih kekuningan. Pada awalnya cabang-cabang rimpang ini dibungkus oleh sisik-sisik yang pendek.

Perbungaan berupa bulir (bongkol) yang kecil terletak diujung batang, berwarna putih atau putih kekuningan. Tangkai bunga muncul dari umbi batang, menjuntai, ramping. Kelopak panjang lebih kurang 1-1,5 cm, berbulu, berwarna hijau. Mahkota berbentuk tabung, panjang 1-1,5 cm, berwarna putih atau putih kekuningan. Tajuk biasanya lebih panjang dari tabungnya. Bibir bunga berwarna biru berlajur putih, tepinya kuning. Benang sari panjangnya 1-1,5 cm, kepala sari berbentuk elips, panjang sekitar 2 mm. Tangkai putik tidak berbulu, kepala putik berbulu, berbentuk mangkok. Buah berbentuk buah kotak, terdapat dalam tandan kecil-kecil dan pendek. Buah bulat memanjang, berlekuk, bersegitiga, agak pipih, kadang berbulu, berwarna kelabu. Buah beruang tiga, setiap ruang dipisahkan oleh selaput tipis setebal kertas. Tiap ruang berisi 5-7 biji kecil-kecil, berbentuk bulat telur berdiameter 2-3 mm, berwarna coklat atau hitam, beraroma harum yang khas. Dalam

ruang biji ini tersusun memanjang 2 baris, melekat satu sama lain (Brink, R. C, B. V. D, 1968).

3. Kandungan kimia kapulaga

Kapulaga memiliki aroma yang sedap yang berasal dari kandungan minyak atsirinya. Disamping itu, buah kapulaga juga mengandung saponin, flavonoid, dan senyawa-senyawa polifenol (Van Valkenburg, J.L.C.H and Bunyapraphatsara, N, 2002).

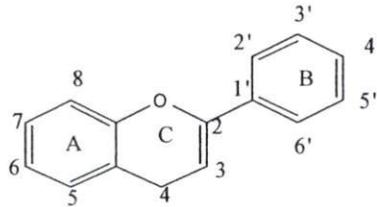
4.Khasiat tumbuhan kapulaga

Kapulaga (*Amomum cardamomum* Willd.) selama ini dikenal sebagai rempah untuk masakan dan lebih banyak digunakan untuk campuran jamu. Tumbuhan ini dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Bhattacharjee, S, *et. al*, 2007).

2.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan suatu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada semua jenis tumbuhan kecuali alga. Flavonoid tersebar pada seluruh bagian tumbuhan seperti pada daun, bunga, buah, biji, akar, kayu, kulit kayu, tepung sari, batang dan getah batang. Flavonoid juga terdapat pada sayap kupu-kupu, sekresi lebah (propolis) dan dalam kelenjar bau berang-berang dengan anggapan bahwa flavonoid tersebut berasal dari tumbuh-tumbuhan yang menjadi makanan bagi hewan tersebut dan tidak dibiosintesa di dalam tubuh mereka (Harborne, J.B, 1967).

Struktur umum flavonoid dan cara penomorannya adalah sebagai berikut:



Gambar 1. Struktur umum flavonoid

Senyawa ini mengandung 15 atom karbon pada inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi $C_6-C_3-C_6$ yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid dibagi dalam beberapa kelas sesuai dengan tingkat substitusi dan oksidasi pada cincin tengah. Subklas yang utama adalah anthosianidin, flavanol, flavon, flavonol, flavanon dan isoflavon (Markham, K.R., 1988).

Tumbuhan yang secara taksonomi mempunyai hubungan dekat, misalnya satu famili atau satu suku cenderung menghasilkan flavonoid yang sama. Angiospermae merupakan tumbuhan yang paling banyak mengandung flavonoid, kemudian Gymnospermae, serta sedikit fungi dan paku. Pada umumnya flavonoid terdapat dalam tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida, dalam satu tumbuhan mungkin saja terbentuk beberapa kombinasi glikosida (Cody, V *et.al.*, 1987).

2.2.1 Kuersetin

Kuersetin adalah salah satu senyawa flavonoid, jenis flavonol. Kuersetin dikenal dengan nama kimia 2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4H-1-Benzopiran-4-one dan 3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon. Selain itu juga dikenal dengan

meletin, sopretin dan sianidelon. Kuersetin mempunyai bobot molekul 203,23 dengan rumus molekul $C_{15}H_{10}O_7$.

Kuersetin terdistribusi secara luas pada tumbuhan tingkat tinggi, terutama pada bagian daun, kelopak bunga, kulit buah dan kulit kayu. Kuersetin dapat diperoleh dengan cara mengisolasi dari tumbuhan seperti *Rhododendron cinnabarium*, *Thea sinensis*, *Uncaria gambir*, *Vitex vinifera*, *Allium Sp* dan lain lain. Selain itu juga dapat diperoleh dari hasil hidrolisis rutin dan kuersitrin. Kuersetin yang terdapat dalam biasanya berada dalam bentuk glikosida (Harborne, J.B., C, 1967). Rumus bangun kuersetin seperti yang digambarkan berikut (The Merck Index, 1978) :



Gambar 2. Rumus bangun kuersetin

Kuersetin merupakan serbuk hablur, berwarna kuning pucat sampai kuning kehijauan pucat. Bentuk dihidratnya dalam alkohol encer berwarna kuning pucat dan berasa kelat. Kuersetin akan menjadi anhidrat pada suhu $95^{\circ} - 97^{\circ} C$. Satu gram kuersetin larut dalam 290 mL alkohol absolut dan larut dalam 23 mL alkohol mendidih. Kuersetin larut dalam asam asetat glasial, praktis tidak larut dalam air (The Merck Index, 1978).

Kuersetin merupakan salah satu flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, antialergi dan imunomodulator. Kuersetin memiliki kemampuan menghambat degranulasi sel mast, basofil dan netrofil (Banerjee, R.S.P.C.*et.al*,1989).

Untuk tujuan terapi kuersetin telah digunakan untuk penyakit asma, bronchitis, gout, antialergi, komplikasi diabetes, neuropati, retinopati, hipertensi karena aktivitasnya menurunkan fragilitas pembuluh darah, antivirus (herpes, para influenza, polio), menghambat perkembangan tumor dan mencegah kanker (Anonim, 2010).

2.2.2 Kaempferol



Gambar 3. Rumus bangun kaempferol

Kaempferol adalah flavonoid dari jenis flavonol. Kaempferol dikenal dengan nama kimia 3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on, mempunyai rumus kimia $C_{15}H_{10}O_6$ dan berat molekul 286,23 g/mol. Senyawa ini banyak tersebar pada tanaman, pada umumnya kaempferol yang terdapat pada tanaman ini adalah dalam bentuk glikosidanya. Glikosida kaempferol yang sudah diketahui saat ini ± 30 jenis dan sumbernya juga telah diketahui, diantaranya adalah 3-arabinosida pada

bunga *Aesculus Hippocastatum*, 3-Galaktosida pada *Trifolium pratense*, 3-glukosilglukosida pada *Nelumbo nucifera*, 3-ramnosida-4'-arabinosida pada daun *Prunus spinosa*, 3-diramnosida pada *Exocarpus Cupressiformis*, glukunorida pada daun *Phaseolus vulgaris*, sophorisida pada petal *Rosa* sp. Beberapa famili tanaman yang banyak mengandung kaempferol adalah Apocinaceae, Cruciferae, Dilleniaceae, Ranunculaceae, dan lain- lain (Harborne, J.B. and H. Baxter, 1999)

Dikehidupan sehari-hari kaempferol sering dikonsumsi terutama yang terdapat dalam sayur-sayuran dan buah-buahan seperti kulit apel merah, anggur, jeruk, frambus, bawang merah dan daun bawang (Harborne, J.B., C, 1967).

Kaempferol merupakan senyawa antioksidan kuat yang dapat mencegah bahaya oksidasi sel, lipid dan DNA. Selain itu, senyawa ini dapat mencegah arterosklerosis dengan menghambat oksidasi LDL (*Low Density Lipoprotein*) dan platelet pada darah. Kaempferol menghambat monosit kemoatraktan protein (MCP_1). MCP_1 ini berperan dalam pembentukan awal plak pada atherosklerosis (Anonim, 2010).

2.2.3 Sifat fisika dan kimia flavonoid

Umumnya flavonoid bersifat polar sehingga larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida, air dan lain-lain. Adanya gula yang terikat pada inti flavonoid menyebabkan flavonoid glikosida lebih mudah larut dalam air sehingga campuran pelarut organik diatas dengan air merupakan pelarut yang baik untuk glikosida. Sedangkan flavonoid yang berupa

aglikon seperti isoflavonoid, flavanon dan flavonol yang termetoksilasi mudah larut dalam pelarut eter dan kloroform (Markham, K.R, 1988).

2.2.4 Deteksi flavonoid

Cara sederhana mengetahui adanya flavonoid dalam suatu tumbuhan dapat dilakukan sebagai berikut, sampel segar sebanyak 4 gram dipotong halus, dididihkan dalam 25 ml etanol selama 15 menit dan saring selagi panas. Filtrat diuapkan diatas penangas air sampai setengahnya, kemudian tambahkan asam klorida pekat dan logam Mg, terbentuk warna kuning sampai merah menandakan adanya flavonoid (Harborne, J.B, 1973).

2.2.5 Ekstraksi flavonoid

Ekstraksi dapat dilakukan dengan cara maserasi, perkolasi atau sokletasi. Pelarut yang dipakai untuk mengekstraksi dipilih berdasarkan kepolaran flavonoid yang akan dianalisa. Flavonoid kurang polar seperti aglikon dengan metilasi dapat diekstraksi dengan pelarut seperti benzen, eter atau etil asetat. Flavonoid glikosida dan aglikon polar seperti hidroksiflavan, flavonol, biflavonol, auron, kalkon biasanya diisolasi dengan aseton, alkohol, air dan kombinasinya (Markham, K.R, 1988).

2.2.6 Penentuan struktur flavonoid

1. Metode kimia

Reaksi dengan besi (III) klorida menunjukkan adanya gugus fenol pada flavonoid. Dengan pereaksi asam klorida pekat dan logam magnesium menandakan

adanya gugus γ -piron. Proses asetilasi, permetilasi, metilasi serta membuat turunan lain dengan pereaksi kimia dapat memberikan informasi penentuan struktur flavonoid. Cara penguraian dengan basa atau dengan pemisahan bagian gula akan diperoleh senyawa yang lebih mudah di deteksi (Markham, K.R,1988).

2. Metode kromatografi

Adanya bercak pada kromatografi kertas dan lapis tipis dapat memberikan informasi terhadap jenis flavonoid. Bercak glikosida flavon yang khas tampak berwarna lembayung tua dengan sinar UV akan menjadi kuning atau hijau kuning bila diberi uap NH_3 . Dapat pula digunakan pereaksi penampak noda untuk kromatogram seperti aluminium (III) klorida, kompleks difenil asam borat etanolamin serta sitroborat (Harborne, J.B and T.J. Mabry, 1975)

Letak bercak pada kromatografi kertas dua arah berguna untuk penentuan struktur flavonoid dengan pengembang butanol-asam asetat-air (4:1:5) serta asam asetat 15%. Flavonoid akan tersebar sesuai dengan jenisnya. Perbandingan jarak yang ditempuh oleh suatu senyawa dengan jarak yang ditempuh pengembang (R_f) dari kromatografi kertas atau lapis tipis dapat digunakan dengan cara membandingkan dengan flavonoid yang telah diketahui nilai R_f nya. Informasi ini dapat dilanjutkan dengan mengambil spektrum dari senyawa yang diisolasi (Markham, K.R, 1988).

3. Metoda Fisikokimia

Spektrofotometer ultra violet

Spektrum serapan ultraviolet dan serapan sinar tampak dapat membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasinya. Spektrum flavonoid biasanya ditentukan dalam pelarut metanol. Spektrum khas terdiri dari dua puncak rentang 240-285 nm (pita II) dan 350-550 nm (pita I). Kedudukan yang tepat dan kekuatan nisbi puncak memberikan informasi yang berharga mengenai sifat flavonoid dan pola oksigenasinya. Kedudukan gugus hidroksifenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi geser dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Pereaksi geser yang dapat dipakai adalah natrium metoksida (NaOMe), natrium asetat (NaOAc), alumunium (III) klorida, asam klorida (HCl) dan asam borat (H_3BO_3) (Markham, K.R, 1988).

Penggunaan pereaksi geser ini berdasarkan pengetahuan bahwa pada kerangka dasar senyawa flavonoid terdapat dua sistem konjugasi yaitu cincin A (sistem konjugasi benzoil) dan cincin B (sistem konjugasi sinamoil) yang menyebabkan adanya serapan pada daerah ultraviolet dan daerah sinar tampak. Penambahan masing-masing pereaksi geser kedalam larutan cuplikan dari senyawa flavonoid menyebabkan pergeseran yang nyata (Mabry, T.J., *et al*, 1970), yaitu :

1. Pergeseran spektrum yang dihasilkan oleh natrium hidroksida (NaOH) atau NaOMe.

Natrium hidroksida adalah basa kuat yang dapat mengionisasi semua gugus hidroksil pada cincin flavonoid. Akibatnya terjadi pergeseran batokromik pada pita I dan pita II dari spektrum flavonoid. Pergeseran batokromik yang besar pada pita I (40-65nm) digunakan untuk mendeteksi gugus OH pada posisi 3' dan 4'. Terbentuknya pita baru pada pita I digunakan untuk mendeteksi gugus OH pada posisi 7.

2. Pergeseran spektrum yang dihasilkan oleh natrium asetat (NaOAc)

Natrium asetat merupakan basa lemah dibandingkan natrium hidroksida. Natrium asetat mengionisasi gugus OH yang sangat asam yang terdapat pada posisi 7 yang nantinya akan memberikan efek batokromik yaitu bila terjadi pergeseran batokromik pita II sebesar 5-20 nm.

3. Pergeseran spektrum yang dihasilkan oleh natrium asetat dan asam borat (NaOAc/ H_3BO_3)

Asam borat dengan adanya natrium asetat akan membentuk kompleks dengan gugus orto dihidroksi pada semua kedudukan dalam inti flavonoid kecuali pada kedudukan C_3 dan C_6 . Bila terjadi pergeseran batokromik sebesar 12-30 nm pada pita I akan menunjukkan adanya O-diOH pada cincin B. Apabila terjadi pergeseran batokromik sebesar 10-15 nm pada pita II akan menunjukkan adanya O-diOH pada cincin A (posisi 6,7 atau 7,8).

4. Pergeseran spektrum yang dihasilkan aluminium (III) klorida dan asam klorida (AlCl_3/HCl)

AlCl_3 membentuk kompleks dengan C_4 -keto dan hidroksi pada C_5 atau C_3 yang stabil terhadap asam dan menyebabkan pergeseran batokromik pada pita I dan pita II. Sebaliknya gugus OH yang letaknya *orto* akan membentuk kompleks yang tidak stabil, akibatnya akan terjadi pergeseran hipsokromik terhadap penambahan asam. Penambahan AlCl_3/HCl digunakan untuk mendeteksi adanya gugus orto-dihidroksi pada cincin B dan gugus OH posisi 3 atau 5.

2.2.7 Hidrolisis Flavonoid

Hidrolisis berguna untuk membantu penentuan struktur glikosida dari flavonoid O-glikosida. Dengan cara ini dapat memutuskan aglikon dengan gula. Berbagai jenis glikosida dapat saling dibedakan dan bila terjadi pemutusan gula dan aglikon dapat dipisahkan serta diidentifikasi (Markham, K.R, 1988).

a. Hidrolisis dengan asam

Asam yang biasa digunakan adalah asam klorida 2N dicampur dengan metanol (1:1), dipanaskan pada suhu tertentu. Waktu yang digunakan untuk hidrolisa sempurna suatu flavonoid tergantung pada kekuatan asam dan sifat gula. Menentukan apakah sudah terjadi hidrolisis dapat diketahui dengan melihat R_f senyawa. Bila nilai R_f berbeda dengan senyawa awal maka hidrolisis sudah terjadi. Pada struktur aglikon yang tidak tahan asam, hidrolisa dapat dilakukan memakai asam klorida yang lebih encer yaitu 0,2N.

b. Hidrolisis dengan enzim

Enzim yang paling banyak digunakan adalah β -glukosidase, enzim lain juga dapat digunakan sesuai dengan jenis gula dan aglikon seperti β -galaktosidase, β -glukoronidase, pektinase, antosianase, naringinase dan lain-lain. Hidrolisis enzim berguna untuk menentukan sifat ikatan antara gula dan flavonoid, apakah α atau β . Merupakan cara untuk memutuskan monosakarida khas dari flavonoid O-glikosida .

2.3.Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)

2.3.1 Sejarah singkat kromatografi cair

Istilah kromatografi telah di aplikasikan secara luas sebagai teknik pemisahan yang didasarkan atas partisi solut antara dua pergerakan fasa, misal fasa gerak berupa gas atau cairan sedangkan fasa diam berupa cair atau padat (Johnson, 1977).

Kromatografi cair pertama kali diperkenalkan oleh Tswett pada tahun 1903 yang menggunakan kolom kapur untuk memisahkan pigmen- pigmen dari daun- daun hijau (Johnson, 1977). Pita-pita warna yang dihasilkan pada adsorben menginspirasi istilah kromatografi untuk menggambarkan proses pemisahan yang berasal dari bahasa Jerman *chromos* berarti warna dan *grafe* berarti menulis. Penentuan warna sudah jarang dilakukan dengan kromatografi modern sekarang, meskipun tidak relevan istilah itu masih dipakai untuk menggambarkan seluruh teknik pemisahan yang menggunakan fasa gerak dan fasa diam (Scott, 1994).

Willstater dan stoll mencoba mengulangi kerja Tswett tetapi gagal. Tiga puluh tahun kemudian Kohn dan kawan- kawan mengulangi sukses kerja Tswett dengan memisahkan lutein dan xanthine dari ekstrak tanaman. Dengan kesuksesan Kohn dan

validasi percobaan Tswett membuat kromatografi sedikit lebih maju (Scott, 1994). Martin dan Synge tahun 1941 memperkenalkan kromatografi cair- cair. Untuk hal ini mereka memenangkan hadiah Nobel (Johnson, 1977).

Pada tahun 1952 Martin dan James mempublikasikan karya pertama mereka tentang kromatografi gas. Antara 1952 sampai akhir 1960, kromatografi gas berkembang dan menjadi era penting dalam perkembangan kromatografi. (Scott, 1994 dan Johnson, 1977). Antara tahun 60-an dan 70-an dasar teori kolom kromatografi diletakkan yang akan menuntun perkembangan kromatografi cair (Scott, 1994). Sekarang kromatografi cair merupakan teknik pemisahan yang lebih baik dan aplikasi jauh lebih banyak dibandingkan dengan kromatografi gas (Scott, 1994).

1. Teori "Plate" (Scott, 1994)

Teori *Plate* pertama kali diperkenalkan oleh Martin dan Synge, yang didasarkan atas konsep *plate* yang digunakan dalam kondisi destilasi. Teori ini kemudian dimodifikasi oleh Said. Dengan *plate* teori diperkirakan bahwa solut secara keseluruhan berada dalam keadaan setimbang dalam fasa gerak dan fasa diam. Pertukaran yang kontiniu dari solut di antara 2 fasa yang sama terjadi saat ia melalui kolom tetapi sesungguhnya keseimbangan secara benar tidak pernah tercapai.

Di dalam teori *plate*, diimajinasikan bahwa suatu kolom kromatografi terdiri dari sejumlah besar *plate* teori dan tebal dari setiap *plate* teori dalam kolom dinyatakan sebagai *HETP* (*Height Equivalent Theoretical Plate*). Semakin kecil nilai *HETP* maka akan semakin baik efisiensi suatu kolom (Scott, 1994).

Hubungan antara *HETP* dengan jumlah pelat teori (*N*) dinyatakan dengan rumus sebagai berikut :

$$HETP = \frac{L}{N}$$

Dimana *L* = panjang kolom, biasanya dinyatakan dalam milimeter (Johnson, 1977).

$$N = \left[\frac{tR}{\sigma} \right]^2 = 16 \left[\frac{tR}{W} \right]^2 = 5,5 \left[\frac{tR}{W_{1/2}} \right]^2$$

Dimana *W* = lebar puncak pada baseline

*W*_{1/2} = lebar puncak pada 1/2 tinggi puncak.

Secara umum, perhitungan menggunakan lebar 1/2 lebar puncak jauh lebih baik terutama sekali bila resolusi sempurna atau sedikit berekor (tailing). Tetapi pengukuran *N* ini akan menjadi kesalahan serius jika puncak yang dihasilkan asimetri (Johnson, 1977).

2. Proses pemisahan (Scott, 1994).

Secara klasik kromatografi didefinisikan sebagai proses pemisahan yang dicapai dengan terjadinya retribusi zat antara 2 fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak. Solut akan didistribusikan secara istimewa dalam fasa diam. Jadi solut akan dielusikan pada saat peningkatan koefisien distribusi mereka saat mengenai fasa diam. Meskipun definisi ini sedikit usang, konsep fasa gerak dan fasa diam karakteristik esensial dalam pemisahan kromatografi. Solut didistribusikan diantara 2 fasa sebagai hasil dari kekuatan molekular yang ada dalam molekul diantara dua fasa. Kekuatan yang lebih kuat antara molekul solut dengan yang ada di fasa diam akan menyebabkan

jumlah solut tertahan dalam fasa diam lebih besar dibawah kondisi setimbang. Sebaliknya bila interaksi lebih kuat antara molekul solut dengan fasa gerak maka lebih besar jumlah solut yang ditahan dalam fase gerak.

2.3.2. Tipe- tipe kromatografi (Scott, 1994; Johnson, 1977)

Dua kelas utama kromatografi dibedakan berdasarkan wujud fasa gerak. Kromatografi gas (*GC*) istilah yang diberikan pada seluruh pemisahan yang menggunakan gas sebagai fasa gerak. Bila seluruh sistim kromatografi menggunakan cairan sebagai fasa gerak dimasukkan kedalam kelas kromatografi cair.

Klasifikasi kromatografi dapat dilihat dalam tabel 1 berikut ini:

Tabel 1. Klasifikasi kromatografi

FASA GERAK	FASA DIAM
GAS Kromatografi Gas (<i>GC</i>)	CAIRAN Kromatografi GAS-CAIR (<i>GLC</i>)
	SOLID/ PADAT Kromatografi GAS- PADAT (<i>GSC</i>)
CAIR Kromatografi Cair K.C. (<i>LC</i>)	CAIRAN Kromatografi CAIR- CAIR (<i>LLC</i>)
	PADAT Kromatografi Cair Padat (<i>LSC</i>)

Jika fasa gerak gas dan fasa diam cair, diistilahkan sistim kromatografi gas- cair (*GLC*), bila fasa diam padat disebut kromatografi gas padat (*GSC*). Dengan cara yang sama ada 2 bentuk kromatografi cair yaitu: kromatografi cair-cair (*LLC*) ; dimana fasa diam cairan dan kromatografi cair padat (*LSC*) bila fasa diam padat.

Mayoritas sistem kromatografi cair modern memakai silika gel atau derivat silika gel sebagai fasa terikat pada fasa diam. Adsorpsi pelarut pada permukaan kedua silika dan fasa terikat karakteristik dengan sifat fisika kimia dari pemisahan dan hubungannya bersamaan dengan sistem distribusi cair-cair daripada sistem cair padat. Meskipun kebanyakan fasa diam modern adalah padat, distribusi solut biasanya secara teoritis sebagai sistem cair-cair.

2.3.3. Kromatografi cair kinerja tinggi

Seiring kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi dan detektor sensitif telah menyebabkan perubahan kromatografi kolom cair menjadi suatu sistem pemisahan dengan kecepatan serta efisiensi yang tinggi. Metoda ini lebih dikenal dengan nama kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan menggunakan kolom berlubang kecil (diameter dalam antara 2mm hingga 5mm) dan isi kolom berupa partikel kecil ($3\mu\text{m}$ hingga $50\mu\text{m}$) yang memungkinkan tercapainya keseimbangan secara cepat antara fasa gerak dengan fasa diam (Dep Kes RI, 1991).

Penggunaan kolom partikel kecil memerlukan pompa tekanan tinggi yang mampu mengalirkan fasa gerak pada tekanan tinggi sampai 300 atmosfer agar tercapai laju aliran beberapa ml/menit. Karena itu sering dipergunakan jumlah zat uji yang kecil (umumnya lebih kecil dari $20\mu\text{g}$) serta diperlukan detektor yang sejenis (Johnson, 1977).

2.3.4. Aplikasi kromatografi cair kinerja tinggi

Menurut Skoog dan kawan-kawan (1998) kromatografi dapat digunakan untuk identifikasi kualitatif dan penentuan secara kuantitatif dari pemisahan solut tertentu.

1. Analisa kualitatif

Sebuah kromatogram akan memberikan informasi kualitatif tunggal terhadap solut tertentu dalam suatu sampel. Hal ini dapat dilihat dari waktu retensi atau posisi pada fasa diam sesudah masa elusi tertentu. Data tambahan hanya dimungkinkan jika diturunkan dari kromatogram dalam fasa gerak atau fasa diam dan variasi elusi temperatur. Sejumlah informasi kromatogram dapat juga dibandingkan dengan spektrum *IR* tunggal, *NMR* atau massa. Selain itu panjang gelombang atau frekwensi data dapat menentukan presisi yang lebih tinggi dari kromatogram mereka.

Jika sampel tidak menghasilkan puncak pada waktu retensi yang sama dengan standar, yang dijalankan dalam kondisi indentik tertentu maka dapat diasumsikan senyawa itu tidak ada atau ada dalam kadar di bawah batas deteksi dari prosedur.

2. Analisa kuantitatif (Skoog *et.al.*, 1998 ; Scott, 1994)

Analisa kuantitatif dari masa solut dalam suatu sampel dapat dilakukan berdasarkan perbandingan tinggi puncak atau luas puncak dari solut dengan puncak standar referensi pada konsentrasi yang diketahui.

a. Analisa berdasarkan tinggi puncak

Tinggi puncak kromatogram didapat dengan menghubungkan *baseline* pada sisi puncak dengan garis tegak yang di ukur sampai mengenai puncak (Skoog *et.al*,

1998). Tinggi puncak berbanding terbalik dengan lebar puncak. Jika tinggi puncak akan digunakan untuk tujuan analitik maka seluruh parameter yang dapat mempengaruhi lebar puncak harus dipertahankan konstan. Selain itu komposisi pelarut harus dipertahankan stabil dan temperatur juga harus diatur konstan (Scott *et al.*, 1994). Kecepatan alir fasa gerak dan injeksi sampel harus dipertahankan konstan. Pengaruh injeksi sampel merupakan masalah penting dalam puncak awal dari kromatogram. Kesalahan relatif 5% sampai 10% didapat jika dipergunakan injeksi syringe yang tidak biasa (Skoog *et al.*, 1998).

b. Analisa berdasarkan luas puncak

Luas puncak merupakan integrasi dari tinggi puncak (konsentrasi) terhadap waktu (aliran volume dari fasa gerak), nilainya sebanding dengan nilai total massa solut yang dielusi. Luas puncak yang mempunyai puncak asimetri atau *tailing* akan menghasilkan hasil pengukuran yang kurang akurat. Keakuratan pengukuran akan berkurang jika faktor *tailing* bertambah, hal ini disebabkan karena sulitnya bagi integrator untuk menentukan akhir suatu puncak, sehingga bila suatu zat yang mempunyai puncak yang asimetris beberapa alternatif harus dipertimbangkan, antara lain mencakup penggantian kolom dan pengurangan volume penyuntikan (Scott, 1994).

Kebanyakan alat kromatografi modern dilengkapi dengan integrator elektronik digital yang akan memberikan penilaian presisi luas puncak (Skoog *et al.*, 1998).

Ada tiga metoda dasar yang digunakan dalam analisa kuantitatif :

1. Metoda Standar Internal

Dalam metoda ini digunakan standar internal yang mungkin akan memberikan hasil lebih akurat secara kuantitatif. Dengan metoda standar internal prosedur bergantung pada zat yang akan dielusi dan ditambahkan standar referensi yang mempunyai struktur kimia yang mirip tetapi tidak mempengaruhi komponen asli dari sampel sehingga kesalahan injeksi sampel dapat dicegah. Jika memungkinkan standar internal harus dipisahkan dari puncak seluruh komponen sampel ($R_s > 1,25$) ; juga dari puncak standar (Skoog *et. al*, 1998).

2. Metoda Standar Eksternal

Metoda ini membutuhkan standar eksternal yang dilakukan kromatografi secara terpisah dari sampel dengan kondisi kromatografi yang harus dipertahankan konstan. Standar eksternal yang digunakan adalah zat yang diduga sebagai komponen sampel yang akan diuji. Keuntungan utama metoda ini standar referensi dapat diidentikkan ke analit yang dicari dalam sampel (Scott, 1994).

3. Metoda Normalisasi

Metoda Normalisasi paling mudah digunakan tetapi sayang sekali paling sedikit yang cocok untuk kromatografi cair (Scott, 1994). Seluruh komponen sampel dielusi dengan sempurna, seluruh luas puncak yang dielusi dihitung sesudah pengoreksian luas tersebut dengan detektor respon ke tipe senyawa yang lain, konsentrasi analit didapat dari perbandingan puncak terhadap total luas seluruh puncak (Skoog *et. al*, 1998).

2.3.5. Jenis-Jenis KCKT

Pemisahan dengan HPLC dapat dilakukan dengan fasa normal (jika fasa diamnya lebih polar dibanding dengan fasa geraknya) atau fasa terbalik (jika fasa diamnya kurang non polar dibanding dengan fasa geraknya). Berdasarkan pada kedua pemisahan ini, sering kali HPLC dikelompokkan menjadi HPLC fasa normal dan HPLC fasa terbalik. Selain klasifikasi di atas, HPLC juga dapat dikelompokkan berdasarkan pada sifat fasa diam dan atau berdasarkan pada mekanisme sorpsi solut, dengan jenis-jenis HPLC sebagai berikut :

1. Kromatografi Adsorpsi

Prinsip kromatografi adsorpsi telah diketahui sebagaimana dalam kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis. Pemisahan kromatografi adsorpsi biasanya menggunakan fasa normal dengan menggunakan fasa diam silika gel dan alumina, meskipun demikian umumnya kromatografi ini memakai silika sebagai fasa diamnya. Pada silika dan alumina terdapat gugus hidroksi yang akan berinteraksi dengan solut.

2. Kromatografi fasa terikat

Kebanyakan fasa diam kromatografi ini adalah silika yang dimodifikasi secara kimiawi atau fasa terikat. Sejauh ini yang digunakan untuk memodifikasi silika adalah hidrokarbon-hidrokarbon non-polar seperti dengan oktadesilsilana, oktasilana, atau dengan fenil. Fasa diam yang paling populer digunakan adalah oktadesilsilan (ODS atau C-18) dan kebanyakan pemisahannya adalah fasa terbalik. Sebagai fasa gerak adalah campuran metanol atau asetonitril dengan air atau dengan

larutan buffer. Untuk solut yang bersifat asam lemah atau basa lemah, peranan pH sangat krusial karena kalau pH fasa gerak tidak diatur maka solut akan mengalami ionisasi atau protonasi. Terbentuknya spesies yang terionisasi ini menyebabkan ikatannya dengan fasa diam menjadi lebih lemah dibanding jika solut dalam bentuk spesies yang tidak terionisasi karenanya spesies yang mengalami ionisasi akan terelusi lebih cepat.

3. Kromatografi penukar ion

KCKT penukar ion menggunakan fasa diam yang dapat menukar kation atau anion dengan suatu fasa gerak. Ada banyak penukar ion yang beredar di pasaran, meskipun demikian yang paling luas penggunaannya adalah polistiren resin. Kebanyakan pemisahan kromatografi ion dilakukan dengan menggunakan media air karena sifat ionisasinya. Dalam beberapa hal digunakan pelarut campuran misalnya air-alkohol dan juga pelarut organik. Kromatografi penukar ion dengan fasa gerak air, retensi puncak dipengaruhi oleh kadar garam total atau kekuatan ionik serta oleh pH fasa gerak. Kenaikan kadar garam dalam fasa gerak menurunkan retensi solut. Hal ini disebabkan oleh penurunan kemampuan ion sampel bersaing dengan ion fasa gerak untuk gugus penukar ion pada resin.

4. Kromatografi pasangan ion

Kromatografi pasangan ion juga dapat digunakan untuk pemisahan sampel-sampel ionik dan mengatasi masalah-masalah yang melekat pada metode penukaran ion. Sampel ionik ditutup dengan ion yang mempunyai muatan yang berlawanan.

5. Kromatografi eksklusi ukuran

Kromatografi ini disebut juga dengan kromatografi permiasi gel dan dapat digunakan untuk memisahkan atau menganalisis senyawa dengan berat molekul > 2000 dalton. Fasa diam yang digunakan dapat berupa silika atau polimer yang bersifat porus sehingga solut dapat melewati porus (lewat diantara partikel), atau berdifusi lewat fasa diam. Molekul solut yang mempunyai BM yang jauh lebih besar, akan terelusi terlebih dahulu, kemudian molekul-molekul yang ukuran medium, dan terakhir adalah molekul yang jauh lebih kecil. Hal ini disebabkan solut dengan BM yang besar tidak melewati porus, akan tetapi lewat diantara partikel fasa diam. Dengan demikian, dalam pemisahan dengan eksklusi ukuran ini tidak terjadi interaksi kimia antara solut dan fasa diam seperti tipe kromatografi yang lain.

6. Kromatografi afinitas

Dalam kasus ini, pemisahan terjadi karena interaksi-interaksi biokimiawi yang sangat spesifik. Fasa diam mengandung gugus-gugus molekul yang hanya dapat menyerap sampel jika ada kondisi-kondisi yang terkait dengan muatan dan sterik tertentu pada sampel yang sesuai (sebagaimana dalam interaksi antara antigen dan antibodi). Kromatografi jenis ini dapat digunakan untuk mengisolasi protein (enzim) dari campuran yang sangat kompleks. (Edward, L.J and G. Robert, 1997).

2.3.6. Peralatan KCKT

Komponen utama dari peralatan KCKT adalah sebagai berikut (Tahir, S, 1997):

a. Pompa

Pompa pada KCKT diperlukan untuk mendorong fasa gerak kedalam kolom dan untuk mengkonstantakan volume fasa gerak. Karena partikel fasa diam didalam kolom mempunyai ukuran kecil maka tekanan pompa yang diperlukan harus tinggi. Pompa harus terbuat dari stainless steel atau teflon. Biasanya pompa dilengkapi dengan katup pengatur kecepatan aliran fasa gerak dapat di atur. Waktu retensi dan luas area sangat bergantung pada ini, karenanya spesifikasi dari pompa sangat berpengaruh pada pengukuran sampel secara kualitatif dan kuantitatif.

b. Injektor

Injektor merupakan bagian yang tidak bisa diabaikan. Penentuan kadar suatu zat selain dipengaruhi oleh kolom yang baik juga dipengaruhi oleh banyak zat yang diinjeksikan kedalam alat KCKT melalui injektor. Penginjeksian sampel yang terlalu banyak kedalam injektor akan mengakibatkan terjadinya “over loading” sehingga puncak semakin lebar , meskipun kromatogramnya lebih tinggi.

c. Kolom

Untuk mendapatkan pemisahan yang efektif, ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam memilih kolom, yaitu:

1. panjang kolom, hal ini berkaitan dengan resolusi dan bilangan lempeng teoritik.
2. tekanan kolom timbul oleh adanya hambatan kolom terhadap fasa gerak.
3. isi kolom, fasa diam yang mengisi kolom akan dihubungkan dengan sifat analit yang diperiksa dan juga jenis pemisahan yang dipakai.
4. parameter lain, seperti diameter, bahan kolom dan cara pembersihan.

d. Detektor

Detektor berguna untuk mendeteksi fasa gerak yang keluar dari kolom. Keluaran dari detektor berkaitan langsung dengan sifat-sifat fasa gerak dan zat terlarut yang terbawa fasa gerak. Pemilihan detektor didasarkan pada sifat zat yang dianalisa. Beberapa detektor yang dapat digunakan pada KCKT, diantaranya adalah detektor U.V, detektor fluoresensi, detektor indek bias, dan detektor daya hantar listrik (konduktivitas).

e. Recorder/ perekam

Pada peralatan KCKT yang canggih, rekorder dilengkapi dengan pengolahan data yang dapat menghitung secara langsung waktu retensi, luas puncak dan konsentrasi zat.

dan linieritas menggunakan metode yang tertulis. Rentang dinyatakan dengan satuan yang sama seperti hasil uji yaitu persen (%).

2.4.6. Kepekaan (Sensitivitas)

a. Batas Deteksi (LOD)

Batas Deteksi (LOD) adalah jumlah analit terkecil yang dapat memberikan respon yang signifikan dibandingkan blangko. Dalam kromatogram, batas deteksi adalah jumlah yang diinjeksikan menghasilkan puncak dengan tinggi paling sedikit tiga kali "noise" garis dasar.

b. Batas Kuantisasi (LOQ)

Batas kuantisasi adalah jumlah yang diimplikasikan menghasilkan pengukuran luas puncak yang reproduibel (ekuivalen terhadap puncak). Tinggi puncak yang dipersyaratkan lebih kurang 10-20 kali lebih tinggi dari "noise" garis dasar.

2.4.7. Stabilitas

Banyak zat langsung dapat terurai sebelum analisa yaitu selama penyiapan larutan sampel, selama ekstraksi, pemurnian, fasa transfer dan selama penyimpanan obat jadi. Dalam hal ini stabilitas harus di uji, stabilitas sistem dikatakan sesuai jika deviasi baku relatif yang dihitung dari hasil percobaan pada interval waktu berbeda harus tidak melebihi 20% dari harga presisi sistem.

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Pengambilan sampel

Sampel berupa lima jenis tumbuhan Zingiberaceae yaitu rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* Linn.), kunyit (*Curcuma domestica* Val.), jahe (*Zingiber officinale* Rosc.), kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) dan buah kapulaga (*Amomum cardamomum* Willd.), diambil dari tiga daerah di Sumatera Barat yaitu Bukittinggi, Alahan Panjang dan Batusangkar.

3.3.2 Penyiapan sampel

Sampel segar dengan berat tertentu, dirajang, kemudian dikeringkan dalam oven pada T 50°C selama 2 hari . Masing-masing sampel yang telah dikeringkan, dihaluskan sampai membentuk serbuk.

3.3.3 Ekstraksi flavonoid

Sampel yang sudah dikeringkan dan diserbuk, ditimbang masing-masing 5 g dan diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan *n*-heksana untuk menghilangkan lemak dan senyawa non polar lainnya. Pisahkan filtrat, ampas dikeringkan, diekstraksi kembali dengan cara berikut:

Timbang sampel yang sudah dihilangkan lemaknya sebanyak 100 mg ditambahkan asam askorbat 10 mg, dilakukan hidrolisis dengan HCl 1,2 N dalam metanol sampai volume 10 mL, kemudian direfluks selama 1 jam. Hasil hidrolisis ditambahkan NH₄OH sampai pH netral kemudian uapkan. Sisanya

ditambahkan aqua-dest dan etil asetat, pisahkan lapisan etil asetat dan aqua-dest melalui corong pisah. Fraksi etil asetat diuapkan, sisanya dilarutkan dengan metanol p.a hingga 5 mL dan injeksikan 100 μ L kedalam sistem KCKT (Yang, R.Y *et.al*, 2008).

3.3.4 Penyiapan fasa gerak

Fasa gerak metanol (B) dan aqua-bidest (A) masing-masingnya ditambahkan asam formiat 1% , saring melalui membran filter dengan porositas 0,45 μ m. Sebelum digunakan fasa gerak diawagaskan dulu untuk menghilangkan gas yang terlarut didalamnya.

3.3.5 Validasi metoda

a.Pembuatan kurva kalibrasi dan linieritas

Flavonoid standar (kuersetin dan kaempferol) dilarutkan didalam metanol yang masing-masingnya dibuat menjadi 5 konsentrasi, yaitu larutan kuersetin standar dengan konsentrasi 3,125; 6,25; 12,5; 25 dan 50 μ g/mL, sedangkan untuk kaempferol standar dibuat dengan konsentrasi 18,4375; 36,875; 73,75; 147,5 dan 295 μ g/mL. Sebelum digunakan larutan standar tersebut disaring dengan penyaring membrane millipore 0,45 μ m, kemudian larutan diinjeksikan 100 μ L kedalam sistem KCKT. Fasa gerak yang digunakan adalah metanol dan aqua-bidest. Dari hasil pengukuran kromatogram dibuat kurva kalibrasi antara luas area dan kosentrasi terhadap kuersetin dan kaempferol standar.

b. Sensitivitas

Penentuan batas deteksi (BD) dan batas kuantisasi (BK) merupakan parameter sensitivitas untuk alat yang digunakan. Dari luas kromatogram larutan standar pada berbagai konsentrasi, dimulai dari konsentrasi rendah sampai tinggi, dihitung melalui persamaan regresi. Berdasarkan persamaan regresi tersebut dihitung BD dan BK dengan rumus sebagai berikut:

$$BD = \frac{3xS_b}{b} \quad \text{dan} \quad BK = \frac{10xS_b}{b}$$

c. Presisi sistem dan Presisi Metoda

Presisi sistem dilakukan dengan cara menyuntikan secara berulang larutan standar kuersetin yang diketahui kadarnya ($6,25\mu\text{g/mL}$) sebanyak 5 kali penyuntikan kedalam alat KCKT. Data akan memenuhi persyaratan apabila diperoleh batas presisi $RSD \leq 2\%$, sedangkan presisi metoda dilakukan dengan cara penyuntikan berulang campuran standar yang diketahui kadarnya dengan sampel uji. Hasil pengujian presisi metoda dari campuran standar dan sampel uji memenuhi persyaratan apabila diperoleh $RSD \leq 2\%$

d. Akurasi dan *Recovery*

Akurasi adalah ukuran kedekatan hasil uji terhadap nilai yang sebenarnya yang dapat diterima, hasil yang diperoleh dihitung sebagai persentase *recovery* yang merupakan penilaian ketepatan. Pengukuran dilakukan melalui penyuntikan larutan standar kuersetin secara berulang sebanyak 3 kali.

e. Ruggedness

Analisa dilakukan dengan memvariasikan waktu pengukuran. Pengaruh perbedaan waktu dihitung terhadap kadar standar kuersetin yang diketahui kadarnya pada hari 1, 2 dan 3. Adanya pengaruh perbedaan waktu pengukuran dapat diketahui dari hasil perhitungan nilai RSD.

f. Spesifisitas

Spesifisitas dapat dilihat dari kromatogram standar yang ditambahkan zat lain yang mungkin mirip secara kimia dan dilakukan kromatografi seperti prosedur uji sampel. Dalam penelitian ini kuersetin dan kaempferol digabung dan diperlakukan cara sama seperti sampel kemudian diinjeksikan kedalam sistem KCKT.

3.3.6 Penentuan Kadar Flavonoid

Metoda penetapan kadar flavonoid pada ekstrak metanol tumbuhan famili Zingiberaceae menggunakan metoda standar adisi, menambahkan baku pembanding (kuersetin atau kaempferol) dengan konsentrasi tertentu pada ekstrak sampel yang ditentukan. Kemudian luas area yang dihasilkan dihitung dengan penambahan baku pembanding dan baku pembanding saja. Selisih dari kedua pengujian tersebut diperoleh kadar flavonoid (kuersetin atau kaempferol) didalam ekstrak metanol tumbuhan famili Zingiberaceae yang diuji. Masing-masing sampel dilakukan pengulangan pengukuran sebanyak tiga kali.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

1. Analisis kuersetin dan kaempferol telah dilakukan menggunakan KCKT sistem adsorpsi fasa terbalik dengan fasa diam C-18 dan fasa gerak adalah gradien elution (20-100%), yaitu aqua-bidest (A) dan metanol (B) dengan perubahan konsentrasi (B) per waktu; pada 0,01 - 5,00 menit (20%); 10 - 15 menit (40%); 20 - 25 menit (80%); 30 - 35 menit (100%), 37,50 - 40 menit (20%). Pada kecepatan alir 1 mL/menit dan waktuambat (tR) 40 menit diperoleh waktu retensi kuersetin 25,058 menit dan waktu retensi kaempferol 25,892 menit.
2. Validasi metoda KCKT terhadap standar kuersetin, kaempferol dan ekstrak metanol tumbuhan Zingiberaceae diperoleh hasil sebagai berikut :
 - a. Dari data kurva kalibrasi standar kuersetin didapatkan persamaan regresi linier yaitu, $y = -16762,8 + 27311,38x$ dengan koefisien korelasi $(r) = 0,9997$ (Lampiran 4, gambar 9). Persamaan regresi linier standar kaempferol diperoleh $y = 15044,05 + 19252,8x$ dengan koefisien korelasi $(r) = 0,9998$ (Lampiran 4, gambar 8),
 - b. Sensitifitas metoda terhadap standar kuersetin didapat nilai batas deteksi $0,279\mu\text{g/mL}$ dan batas kuantisasi $4,279\mu\text{g/mL}$ (Lampiran 5, tabel 6). Sedangkan batas deteksi untuk standar kaempferol $3,155\mu\text{g/mL}$ dan batas kuantisasi adalah $14,264\mu\text{g/mL}$ (Lampiran 5, tabel 5).

- c. Presisi sistem, hasil uji presisi sistem terhadap larutan standar kuersetin $6,25\mu\text{g/mL}$ yaitu untuk waktu retensi (t_R) harga RSD = 0.007%, untuk luas puncak harga RSD = 1,18 % (Lampiran 6, tabel 7) .
 - d. Presisi metoda terhadap campuran standar kaempferol dengan ekstrak metanol kencur Batusangkar dengan metoda KCKT diperoleh RSD = 0,7% (Lampiran 6, tabel 8) .
 - e. Untuk parameter akurasi dan *recovery* yang dilakukan terhadap kuersetin standar pada konsentrasi $50\mu\text{g/mL}$, diperoleh *recovery* sebesar 99,98% (Lampiran 7, tabel 9).
 - f. Uji ruggedness (pengukuran *inter day*) terhadap larutan standar kaempferol pada konsentrasi $21,07\mu\text{g/mL}$ didapat harga RSD 0,977 % (lampiran 8, tabel 10).
3. Deteksi senyawa kuersetin dan kaempferol pada tumbuhan keluarga Zingiberaceae yang berasal dari tiga daerah penghasil di Sumatera Barat, yang mengandung kuersetin adalah kapulaga dan kencur, sedangkan yang mengandung kaempferol adalah lengkuas, jahe dan kencur. Tumbuhan yang mengandung kuersetin dan kaempferol adalah kencur.
 4. Kadar kuersetin yang diperoleh pada kapulaga Bukittinggi, Batusangkar, dan Alahan Panjang berturut-turut adalah 0,0205; 0,0170; 0,0085% sampel kering, sedangkan pada kencur Bukittinggi, Alahan Panjang dan Batusangkar berturut-turut adalah 0,0115; 0,0060; 0,0040% sampel kering (lampiran 12, tabel 13).
 5. Kadar kaempferol yang diperoleh pada lengkuas Bukittinggi, Batusangkar, dan Alahan Panjang adalah 0,0225; 0,0160; 0,0075% sampel kering; pada jahe

Bukittinggi, Batusangkar, dan Alahan Panjang berturut-turut adalah 0,0205; 0,0175; 0,0070% sampel kering; pada kencur Batusangkar, Alahan Panjang dan Bukittinggi adalah 0,0260; 0,0175 ; 0,0160% sampel kering (lampiran 12, tabel 14).

4.2 Pembahasan

4.2.1 Ekstraksi Sampel

Sampel berupa lima jenis tumbuhan Zingiberaceae yaitu rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* Linn.), kunyit (*Curcuma domestica* Val.), jahe (*Zingiber officinale* Rosc.), kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) dan buah kapulaga (*Amomum cardamomum* Willd.) diambil dari tiga daerah penghasil di Sumatera Barat yaitu Batusangkar, Bukittinggi dan Alahan Panjang.

Sampel dengan berat tertentu, dirajang, kemudian dikeringkan dalam oven pada $T50^{\circ}\text{C}$ (2-3 hari). Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kandungan air dari sampel, sehingga proses ekstraksi selanjutnya relatif lebih mudah. Apabila sampel banyak mengandung air, suhu penguapan pelarut relatif lebih tinggi sehingga dapat merusak kandungan flavonoid didalamnya. Kemudian dilakukan proses penghalusan yang bertujuan untuk memperluas permukaan kontak antara pelarut dengan sampel yang akan mempermudah penetrasi pelarut ke dalam membran sel dan proses pelarutan senyawa-senyawa yang terkandung di dalam sampel menjadi lebih sempurna.

Sampel yang telah dihaluskan ditimbang dalam jumlah tertentu dibungkus dengan kertas Whatman dan dimaserasi dengan pelarut *n*-heksana selama 24 jam

yang bertujuan agar senyawa-senyawa yang bersifat non polar terlarut kedalamnya, sehingga tidak akan mengganggu proses pemisahan selanjutnya. Pelarut *n*-heksana bersifat non polar karena terdiri dari rantai karbon alifatik yang cukup panjang . Fraksi sisa heksana dikeringkan kembali, masing-masingnya ditimbang sebanyak 100 mg dan dilanjutkan dengan proses ekstraksi secara hidrolisis.

Flavonoid dalam tumbuhan pada umumnya berada dalam bentuk glikosida. Untuk memutus aglikon dan gulanya dapat dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan asam klorida didalam metanol selama waktu tertentu, dengan bantuan pemanasan dan pendingin tegak untuk mencegah penguapan. Waktu yang digunakan untuk hidrolisis sempurna suatu flavonoid tergantung pada kekuatan asam dan sifat gula. Struktur aglikon yang tidak tahan asam, hidrolisa menggunakan asam yang lebih encer yaitu 0,2 N (Markham, K.R., 1988). Pada ekstraksi secara hidrolisis, terhadap 100mg sampel ditambahkan 10 mg asam askorbat dan HCl 1,2N dalam metanol sampai volume 10 ml, di refluks selama 1jam. Penambahan asam askorbat ini bertujuan untuk mencegah oksidasi dari flavonoid yang terkandung dalam sampel selama proses ekstraksi. Untuk menghindari kerusakan kolom akibat pengaruh HCl yang merupakan asam kuat, kedalam ekstrak ditambahkan NH_4OH sampai bereaksi netral. Penambahan NH_4OH kedalam larutan HCl/metanol ini akan menghasilkan garam NH_4Cl . Pelarut metanol diuapkan dan sisanya ditambahkan dua pelarut yang tidak bercampur karena berbeda kepolarannya yaitu etil asetat dan aqua-dest, sehingga didapatkan lapisan etil asetat yang diharapkan dapat melarutkan senyawa semi polar berupa flavonoid aglikon dan lapisan aqua-dest yang melarutkan garam

NH_4Cl . Kedua larutan ini dipisahkan dalam corong pisah, lapisan etil asetat dicuci dengan aqua dest beberapa kali hingga bebas garam NH_4Cl .

Pelarut etil asetat yang mengandung flavonoid aglikon diuapkan dengan rotary evaporator. Penggunaan rotary evaporator akan memperluas daerah penguapan dan dengan adanya sumber panas akan membantu proses penguapan. Proses penguapan pelarut akan dipercepat dengan dikurangnya tekanan udara yang menyebabkan penurunan tekanan uap pelarut sehingga pelarut akan mendidih pada temperatur yang jauh lebih rendah dari titik didihnya. Kemudian sisa fraksi etil asetat ditambahkan metanol sampai volume 5 mL. Larutan metanol ini disaring dengan syringe filter yang mempunyai diameter pori-pori $0,2\mu\text{m}$ untuk menyaring partikel-partikel halus.

4.2.2 Validasi metoda KCKT

Validasi metoda KCKT untuk menganalisis senyawa flavonoid dari tumbuhan Zingiberaceae diperoleh melalui pengukuran beberapa parameter :

A. Kurva kalibrasi dan Linieritas

Pengujian linieritas dilakukan dengan menginjeksikan pada sistem KCKT kuersetin standar dengan 5 konsentrasi yaitu 3,125; 6,25; 12,5; 25 dan 50 $\mu\text{g/mL}$ dan kaempferol standar konsentrasi 18,4375; 36,875; 73,75; 147,5 dan 295 $\mu\text{g/mL}$. Luas puncak yang dihasilkan diplot terhadap konsentrasi kuersetin dan kaempferol standar sehingga diperoleh persamaan garis lurus dari kuersetin standar $y = -16762,8 + 27311,38x$ dengan koefisien korelasi $(r) = 0,9997$ dan persamaan

garis lurus kaempferol standar $y = 15044,05 + 19252,8x$ dengan koefisien korelasi $(r) = 0,9998$. Didapatkan harga koefisien korelasi dari larutan standar mendekati 1 memperlihatkan adanya hubungan linier antara konsentrasi dan luas puncak, yaitu dengan ditingkatkan konsentrasi juga terjadi peningkatan dari luas puncak dibawah kurva yang sebanding.

Pada pengukuran kadar dari sampel, konsentrasi sampel yang digunakan harus berada pada rank konsentrasi larutan standar yang dibuat, sehingga kelinieran dapat dicapai dan pengukuran akan kuantitatif, sehingga RSD yang diperoleh akan memenuhi persyaratan dari Farmakope Indonesia edisi IV yaitu $\leq 2\%$.

B. Sensitifitas

Batas deteksi dan batas kuantisasi adalah parameter sensitivitas untuk alat yang digunakan. Ada dua cara penetapan yaitu menggunakan Prosedur non instrumental dan prosedur instrumental.

Penentuan nilai sensitifitas dengan prosedur non instrumental dapat diketahui dengan mencari harga batas deteksi (BD) dan batas kuantisasi (BK) yang dapat ditentukan dari harga simpangan baku (Harmita, 2004). Batas deteksi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$Q = \frac{k \times S_b}{Sl}$$

$Q =$ BD (batas deteksi) atau BK (batas kuantisasi)

$K = 3$ untuk batas deteksi atau 10 untuk batas kuantisasi

$S_b =$ simpangan baku respon analitik dari blangko

SI = arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi
= slope (b pada persamaan garis $y = a + bx$).

Batas deteksi dan kuantisasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku (S_b) blanko sama dengan simpangan baku residual ($S_{y/x}$), maka :

$$BD = \frac{3xS_b}{b}$$

Untuk menghitung Batas Kuantisasi digunakan rumus sebagai berikut:

$$BK = \frac{10xS_b}{b}$$

Dari hasil pengujian diperoleh BK untuk Kuersetin standar = 4,279 $\mu\text{g/mL}$ dan BD untuk kuersetin standar = 0,947 $\mu\text{g/mL}$, serta pada Kaempferol standar diperoleh BK = 14,264 $\mu\text{g/mL}$ dan BD untuk kaempferol standar = 3,155 $\mu\text{g/mL}$.

Harga BD dan BK dari standar kaempferol didapatkan lebih tinggi dari harga BD dan BK standar kuersetin, hal ini disebabkan konsentrasi standar kaempferol yang digunakan lebih tinggi sehingga simpangan baku yang diperoleh juga tinggi dan akan berpengaruh terhadap harga BD dan BK. Selanjutnya hasil dari pengukuran batas deteksi dan batas kuantisasi merupakan pedoman untuk analisis sampel. Pengukuran yang kuantitatif akan diperoleh bila konsentrasi sampel uji diatas nilai batas deteksi dan batas kuantisasi.

C. Presisi

1. Presisi Sistem

Presisi sistem merupakan derajat kesesuaian dari sekelompok hasil uji secara individual jika suatu metoda analisis digunakan secara berulang terhadap beberapa sampel yang diambil dari suatu massa yang homogen. Presisi sistem dilakukan untuk mengetahui kesalahan karena sistem yang tidak bergantung pada penyiapan sampel. Penyuntikan berulang larutan standar (kaempferol) yang diketahui konsentrasinya sebanyak lima kali dengan batas presisi $RSD \leq 2\%$.

Standar deviasi Relatif (RSD) yang didapat dari penyuntikan berulang 5 kali larutan standar, nilainya adalah 1,18% (berarti memenuhi persyaratan farmakope Indonesia edisi IV, 1995) yaitu kecil atau sama dengan 2% untuk luas area yang dihasilkan.

2. Presisi metoda

Presisi metoda merupakan ukuran dari variabilitas intrinsik, termasuk kesalahan yang disebabkan oleh penyiapan sampel. Pengujian dilakukan terhadap campuran standar kaempferol dengan ekstrak metanol Kencur Batusangkar hasil hidrolisis yang mengandung kaempferol, sebanyak 3 kali pengulangan. Hasil pengujian presisi metoda campuran standar kaempferol dan ekstrak metanol kencur Batusangkar hasil hidrolisis memenuhi persyaratan yang berlaku yaitu $RSD \leq 2\%$ (Sukandar, E.Y dan Kusmardiyani, S, 1997).

D. Akurasi dan *Recovery*

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil uji terhadap nilai yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi dapat ditentukan melalui dua cara, yaitu metoda simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metoda penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metoda simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan kedalam zat yang dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan. Pada metoda penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan kedalam sampel, dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya. Akurasi dan *recovery* dilakukan terhadap kuersetin standar dengan 3 kali pengulangan. Akurasi dan *recovery* standar yang ditemukan kembali dapat dihitung dalam %.

Standar deviasi Relatif (RSD) yang didapat dari penyuntikan berulang 3 kali larutan standar kuersetin, nilainya 1,68% (berarti memenuhi persyaratan farmakope Indonesia edisi IV, 1995) yaitu kecil atau sama dengan 2% untuk luas puncak yang dihasilkan. Perolehan nilai RSD kecil dari 2%, memperlihatkan adanya kedekatan hasil uji dengan nilai sebenarnya .

E. Spesifisitas

Uji spesifisitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu metoda analisis untuk mengukur secara akurat suatu senyawa dengan keberadaan senyawa lain yang mungkin juga ada dalam matriks sampel.

Spesifisitas metoda KCKT untuk uji Flavonoid dapat dilihat dalam kromatogram kaempferol standar dan Kuersetin Standar digabung bersama saat diinjeksikan pada sistim KCKT. Kedua senyawa akan terpisah berdasarkan kepolarannya. Kolom yang digunakan pada analisis ini adalah kolom fasa terbalik dengan fasa diam yang bersifat non polar, maka kuersetin yang bersifat lebih polar akan keluar lebih dahulu dengan waktu retensi kuersetin 25,058 menit dan kaempferol dengan waktu retensi 25,892 menit . Kedua puncak kromatogram yang dihasilkan terpisah sempurna, sehingga kedua puncak dapat dibedakan, artinya metoda yang digunakan cukup spesifik.

F. Ruggedness

Parameter uji ini terjadi selama proses analisa yang dinyatakan akibat adanya pengaruh perbedaan lingkungan kerja terhadap hasil uji seperti laboratorium, instrumental, suhu dan waktu uji yang berlainan. Data uji ini terlihat jelas, dimana perbedaan hari kerja (hari 1; 2 ; 3) tidak begitu mempengaruhi kadar larutan standar kaempferol yaitu didapat nilai RSD = 0,997% yang masih memenuhi persyaratan dalam Farmakope Indonesia yaitu $\leq 2\%$.

4.2.3. Standar Pemanding

Standar pemanding merupakan syarat mutlak dalam pengujian, tetapi pada kenyataannya mengadakan atau memperoleh standar pemanding yang sesuai dengan tujuan pengujian yang akan dilakukan tidaklah mudah. Pada penelitian ini standar pemanding yang digunakan adalah hasil isolasi, setelah melalui proses pemurnian

menggunakan kolom kromatografi dengan fasa diam Sephadex diperoleh standar kuersetin dan kaempferol murni. Standar pembanding tersebut diidentifikasi dengan spektrofotometer U.V menggunakan pereaksi geser (Mabry, T.J., *et.al* , 1970).

Pada pemeriksaan standar kaempferol dengan spektrofotometer UV diketahui panjang gelombang pita I adalah 365,20 nm dan pita II adalah 266,80 nm. Hal ini memperkuat indikasi bahwa standar yang digunakan adalah kaempferol dan mempunyai kerangka 5,7 dihidroksiflavan. Untuk menentukan gugus hidroksi pada flavonol ini dilakukan penambahan pereaksi geser. Penambahan NaOH pada larutan sampel metanol menunjukkan pergeseran batokromik sebesar 61,40 nm pada pita I dan intensitasnya menaik yang mengidentifikasikan adanya 4'-OH bebas (Gambar 16, Lampiran 10) (Mabry, T.J., *et.al* , 1970).

Adanya pergeseran batokromik sebesar 58,20 nm pada pita I spektrum $AlCl_3/HCl$ terhadap metanol menunjukkan adanya gugus 3-OH bebas, sedangkan terhadap spektrum pada penambahan HCl tidak terjadi pergeseran membuktikan tidak adanya orto di-OH. Pada penambahan $AlCl_3$ terjadi ikatan chelat antara 3-OH dengan 4-keto dan penambahan HCl tidak terjadi reaksi karena tidak ada orto di-OH pada cincin B (Gambar 14, Lampiran 10) (Mabry, T.J., *et.al* , 1970).

Penambahan NaOAc menyebabkan adanya pergeseran batokromik 7,6 nm pada pita II relatif terhadap metanol membuktikan adanya 7-OH bebas (Gambar 12, Lampiran 10). Penambahan H_3BO_3 menyebabkan pergeseran batokromik sebesar 2,8 nm pada pita I relatif terhadap metanol tidak membuktikan adanya orto di-OH pada cincin B (Gambar15, Lampiran 10). Data spektrum ultraviolet ini menunjukkan

standar kaempferol yang digunakan adalah flavonol dengan gugus 3-OH dan terdapat gugus OH pada posisi 5,7,4' (Kaempferol). Pada pemeriksaan standar kuersetin dengan spektrofotometer UV diketahui panjang gelombang pita I adalah 372,60 nm dan pita II adalah 255 nm. Hal ini memperkuat indikasi bahwa standar yang digunakan adalah kuersetin dan mempunyai kerangka 5,7 dihidroksiflavon. Untuk menentukan gugus hidroksi pada flavonol ini dilakukan penambahan pereaksi geser. Penambahan NaOH pada larutan sampel metanol menunjukkan pergeseran batokromik sebesar 41,60 nm pada pita I mengidentifikasi adanya 4'-OH bebas. (Gambar 19, Lampiran 11) (Mabry, T.J., *et.al*, 1970)

Adanya pergeseran batokromik sebesar 72,40 nm pada pita I spektrum AlCl_3/HCl terhadap metanol menunjukkan adanya gugus 3-OH bebas, sedangkan terhadap spektrum pada penambahan HCl terjadi pergeseran batokromik sebesar 14,4 nm membuktikan adanya orto di-OH. Pada penambahan AlCl_3 terjadi ikatan chelat antara 3-OH dengan 4-keto dan penambahan HCl terjadi reaksi karena ada orto di-OH pada cincin B (Gambar 20, Lampiran 11) (Mabry, T.J., *et.al*, 1970).

Penambahan NaOAc menyebabkan adanya pergeseran batokromik 16,80 nm pada pita II relatif terhadap metanol membuktikan adanya 7-OH bebas (Gambar 17, Lampiran 11). Penambahan H_3BO_3 menyebabkan pergeseran batokromik sebesar 14 nm pada pita I relatif terhadap metanol membuktikan adanya orto di-OH pada cincin B (Gambar 18, Lampiran 11). Data spektrum ultraviolet ini menunjukkan standar kuersetin yang digunakan adalah flavonol dengan gugus 3-OH dan terdapat gugus OH pada posisi 5,7,3',4' (kuersetin).

4.2.4. Analisis kuantitatif flavonoid

Kadar flavonoid ekstrak metanol dari lima jenis tumbuhan Zingiberaceae diukur dengan kromatografi cair kinerja tinggi. Pada KCKT, fasa gerak didorong melalui kolom dengan tekanan dan laju sesuai dengan yang diinginkan. Setelah sistem mencapai keseimbangan, ekstrak metanol dari sampel disuntikan kedalam sistem ini. Zat yang terlarut terbawa kedalam kolom, dipisahkan dan keluar melalui detektor berdasarkan kepolarannya. Hasil ini diteruskan ke perekam, sehingga dihasilkan kromatogram. Dari kromatogram inilah dapat diperoleh luas puncak dan waktu retensi.

Fasa diam berupa kolom dengan sistem fasa terbalik (RP-C18) merupakan kolom yang bersifat non polar. Senyawa yang lebih polar akan terpisah lebih dahulu dengan waktu retensi lebih awal daripada senyawa non polar.

Fasa gerak yang digunakan adalah campuran aqua-bidest (A) dan metanol (B). Untuk mendapatkan kromatogram yang lebih tajam, kedalam fasa gerak dapat ditambahkan asam, dan asam yang biasa ditambahkan adalah asam formiat, asam triflouroasetat, dan asam asetat (Guzzetta, A, 2001). Terhadap fasa gerak yang digunakan kedalam masing-masingnya ditambahkan asam formiat 1%.

Sebelum digunakan fasa gerak disaring dengan membran filter 0,45 μ m untuk menyaring adanya partikel-partikel halus agar tidak menyumbat kolom nantinya. Fasa gerak yang telah disaring dihilangkan gas yang terdapat didalamnya menggunakan alat ultrasonik dengan bantuan vakum, karena dengan adanya gas yang tercampur dengan fase gerak dapat mengganggu proses pemisahan senyawa didalam kolom.

Sistem KCKT fasa terbalik dengan fasa diam C-18 dan fasa gerak adalah gradien (20-100%) sistem metanol dalam air (Gusniwati, R, 2009). Kecepatan alir fasa gerak ditingkatkan secara beraturan sampai mencapai 1 mL/menit dan waktu tambat (tR) 40 menit. Detektor U.V diatur dengan panjang gelombang 341 nm, sesuai serapan maksimal dari senyawa flavonoid yang berada pada panjang gelombang 340-370 nm (Hideaki, O *et.al*, 1998). Sampel yang diinjeksikan akan masuk ke sistem KCKT, dan mengalami pemisahan dalam kolom.

Berdasarkan hasil validasi metoda, yaitu dari spesifisitas metoda kondisi gradien yang dipakai dapat digunakan untuk menganalisa kuersetin dan kaempferol.

Tabel 2. Kondisi sistem gradien KCKT

No.	Time program (menit)	(B) %
1.	0,01	20
2.	05,00	20
3.	10,00	40
4.	15,00	40
5.	20,00	80
6.	25,00	80
7.	30,00	100
8.	35,00	100
9.	37,50	20
10.	40,00	20

Dari hasil pengujian ekstrak sampel cara hidrolisis, didapatkan adanya kandungan flavonoid aglikon dalam beberapa sampel seperti kuersetin pada kapulaga dan kencur serta kaempferol pada tumbuhan lengkuas, jahe dan kencur, tetapi pada sampel rimpang kunyit tidak ditemukan adanya aglikon kuersetin dan kaempferol, kemungkinan flavonoid yang terkandung pada kunyit bukan kuersetin dan kaempferol.

Penetapan kadar flavonoid pada ekstrak metanol hasil hidrolisis tumbuhan keluarga Zingiberaceae menggunakan metoda standar adisi, yaitu menambahkan baku pembanding dengan konsentrasi tertentu pada ekstrak sampel yang ditentukan. Kemudian luas puncak yang dihasilkan dihitung dengan penambahan baku pembanding dan baku pembanding saja. Selisih dari kedua pengujian tersebut diperoleh kadar flavonoid (kuersetin atau kaempferol) didalam ekstrak metanol tumbuhan keluarga Zingiberaceae yang diuji. Hal ini dilakukan karena kadar flavonoid dari zat uji rendah yaitu dibawah batas deteksi dari baku pembanding kuersetin dan kaempferol.

Faktor lingkungan seperti iklim, cuaca, lokasi tumbuh dan derajat kematangan sangat berpengaruh terhadap komponen kimia dalam tumbuhan (Lugasi, A *et.al*, 2003). Tiga daerah penghasil tumbuhan Zingiberaceae di Sumatera barat yaitu Batusangkar, Bukittinggi dan Alahan Panjang yang merupakan tempat pengambilan sampel, bila ditinjau dari letak georafis mempunyai iklim yang hampir sama, sehingga iklim berkemungkinan tidak begitu berpengaruh terhadap perbedaan kandungan flavonoid didalam sampel. Faktor lain yang diperkirakan berpengaruh terhadap kandungan flavonoid dalam sampel adalah waktu panen dari masing-masing

tumbuhan, waktu panen yang berbeda akan mempengaruhi kadar dari kandungan kimia dalam tumbuhan, pada penelitian ini diperoleh kadar kaempferol dan kuersetin yang bervariasi dari setiap jenis sampel tumbuhan Zingiberaceae yang berasal dari daerah Batusangkar, Bukittinggi dan Alahan Panjang. Perbedaan tempat tumbuh, lama waktu panen berpengaruh pada kadar flavonoid yang terkandung dalam tumbuhan Zingiberaceae.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

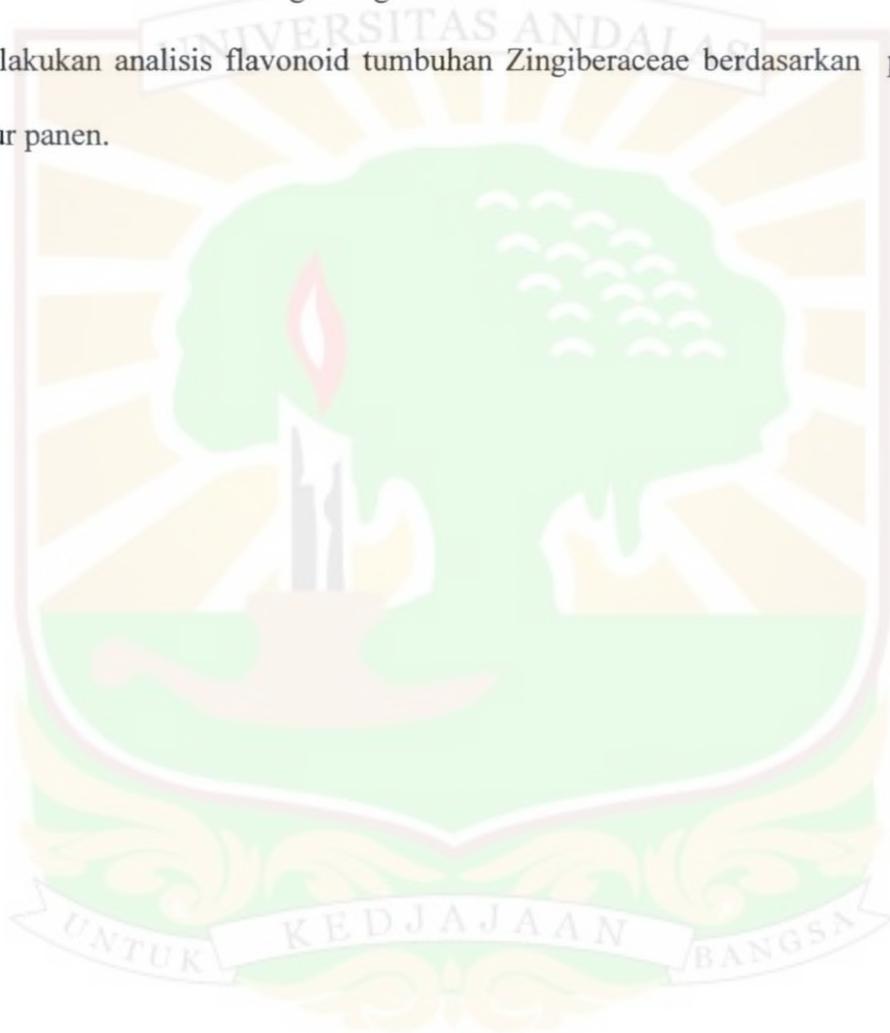
Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. a. Analisis kuersetin dan kaempferol telah dilakukan menggunakan metoda KCKT sistem adsorpsi fasa terbalik dengan fasa diam C-18 dan fasa gerak campuran pelarut aqua-bidest (A) dan metanol (B) dengan sistem gradien elution (20-100%) .
b. Validasi metoda meliputi presisi sistem, presisi metoda, akurasi dan *recovery*, linieritas, batas deteksi dan batas kuantisasi, spesifisitas, roggudness memenuhi persyaratan yang ditetapkan.
2. a. Analisis beberapa flavonoid dengan metoda KCKT terhadap rimpang tumbuhan keluarga Zingiberaceae yang berasal dari tiga daerah penghasil di Sumatera Barat yaitu Batusangkar, Bukittinggi, dan Alahan Panjang didapatkan adanya kandungan kuersetin dan kaempferol .
b. Kadar kuersetin yang diperoleh pada kapulaga Bukittinggi, Batusangkar, dan Alahan Panjang berturut-turut adalah 0,0205; 0,0170; 0,0085% sampel kering, sedangkan pada kencur Bukittinggi, Alahan Panjang dan Batusangkar berturut-turut adalah 0,0115; 0,0060; 0,0040% sampel kering .
c. Kadar kaempferol yang diperoleh pada lengkuas Bukittinggi, Batusangkar, dan Alahan Panjang adalah 0,0225; 0,0160; 0,0075% sampel kering; pada jahe Bukittinggi, Batusangkar, dan Alahan Panjang berturut-turut adalah 0,0205;

0,0175; 0,0070% sampel kering; pada kencur Batusangkar, Alahan Panjang dan Bukittinggi adalah 0,0260; 0,0175 ; 0,0160% sampel kering.

5.2. Saran

1. Disarankan untuk peneliti selanjutnya melakukan analisis aglikon flavonoid lain dari tumbuhan obat keluarga Zingiberaceae.
2. Melakukan analisis flavonoid tumbuhan Zingiberaceae berdasarkan perbedaan umur panen.



DAFTAR KEPUSTAKAAN

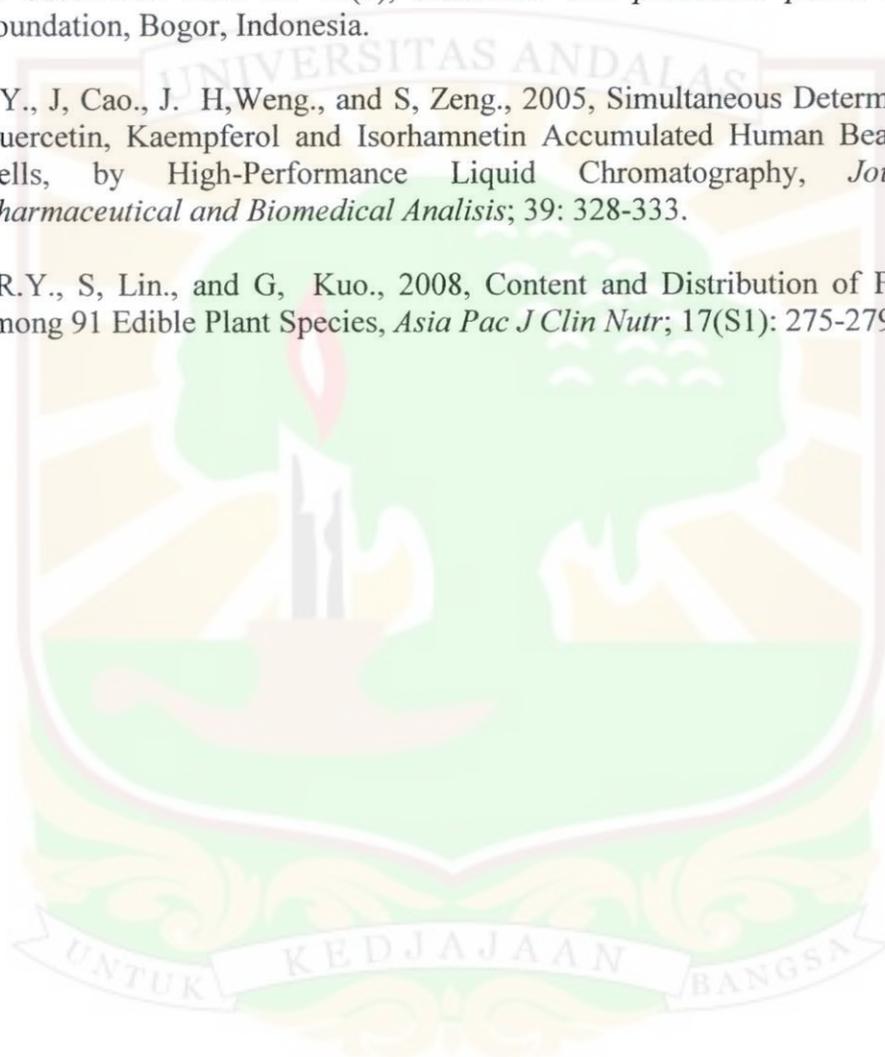
- Anand, P., A. B, Kunnumakara., C, Sundaram., K. B, Harikumar., S. T, Tharajan., O. S, Lai., B, Sung., and B. B, Anggarwal., 2008, Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes, *Pharmaceutical Research*, Vol. 25, No. 9.
- Anonim, *Quercetin*, PDR Health <http://www.PDR-health.com> -2010
- Anonim, "Kaempferol", <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals.php> -2010
- Aqil, F., I, Ahmad., and Z, Mehmood., 2006, Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of twelve Traditionally Used Indian Medicinal Plants, *Turk J Biol* (30) : 177-183.
- Banerjee, R. S., P. C. Seen, and S. S. Gambhir, 1989, "Quercetin and β -lymphocyte Reactivity", *Proceeding : 3rd International Symposium on Flavonoid in Biology and Medicine*, Singapore November 13-17, National University of Singapore, 1990
- Barbosa, W.L.R., A, Peres., S, Gallori., and F. F, Vincieri., 2006, Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco L*, *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(3) 333-337.
- Bhattacharjee, S., Rana, T and A, Sangupta., 2007, Inhibition of Lipid Peroxidation and Enhancement of GST activity by Cardamom and Cinnamon During chemically Induced Colon Carcinogenesis in Swiss Albino Mice, *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*, Vol 8
- Brink, R.C. B. V. D, 1968, *Flora of Java (Spermatophytes only)* vol III, Wolters Noordhoff N.V, Groningen, The Netherlands.
- Chen, X.Q., and J. B, Xiao., 2005, RP-HPLC-DAD Determination of Flavonoid: Separation of Quercetin, Luteolin and Apigenin in *Marchantia convoluta*, *Iranian Journal of Pharmaceutical, Research* 3: 175-181.
- Cody, V., E, Middleton., 1987, J.B. Harborne and A. Berezts., *Flavonoids in Biology and Medicinal Properties*, Alan B Less, Inc, New York.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1980, *Materia Medika Indonesia*, Jakarta.

- Departemen Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial Republik Indonesia, 2001, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia* (1) Jilid 2, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1978, *Materia Medika Indonesia*, Jilid II, Jakarta.
- Edward, L.J and S. Roberts, 1991, *Dasar Kromatografi Cair*, Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.
- Gang, Z.Y, Yu, J.F, Liu, W., L, Chun., and Y, Kong., 2006, Simultaneous Determination of four Flavonoids in Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] Leaves Using RP-LC-DAD, *Short Communication, Friedr. Vieweg & Sohn/GWV Fachverlage GmbH*.
- Ghasemzadeh, A., H.Z.A, Jaafar., and A. Rahmat., 2010, Antioxidant Activities, Total Phenolics and Flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinal* Roscoe.), *Molecules*, 15.
- Gusniwati, R., 2009, *Skripsi Isolasi dan penetapan kadar apigenin pada ekstrak seledri (Apium graveolens Linn) secara KCKT*, Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang.
- Guzzetta, A., 2001, Reverse Phase HPLC Basics for LC/MS an Ion Source tutorial.
- Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, M.C.W., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S.F., Wold, A.B., Haffner, K., Baugerod, H., Andersen, L.F., Moskaung, O., Jacobs, D.R and Blomhoff, R., 2002, A systematic screening of total Antioxidants in Dietary Plants, *The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr.* 132 : 461-471.
- Hamilton, R.J and P.A, Sewel., 1978, *Introduction to High Performance Liquid Chromatography*, second ed, Chapman and Hall, London-New York.
- Harborne, J.B., 1973, *Phytochemical Methods*, A Guide to modern Techniques of plant Analysis, Chapman and Hall, London.
- Harborne, J.B., C, 1967, *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, Academic Press, London and New York.
- Harborne, J.B., and T.J, Mabry., *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London, 1975.
- Harborne, J.B., and H. Baxter, 1999, *The Handbook of Natural Flavonoids*, vol.1, John Wiley and Sons, Chicester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto

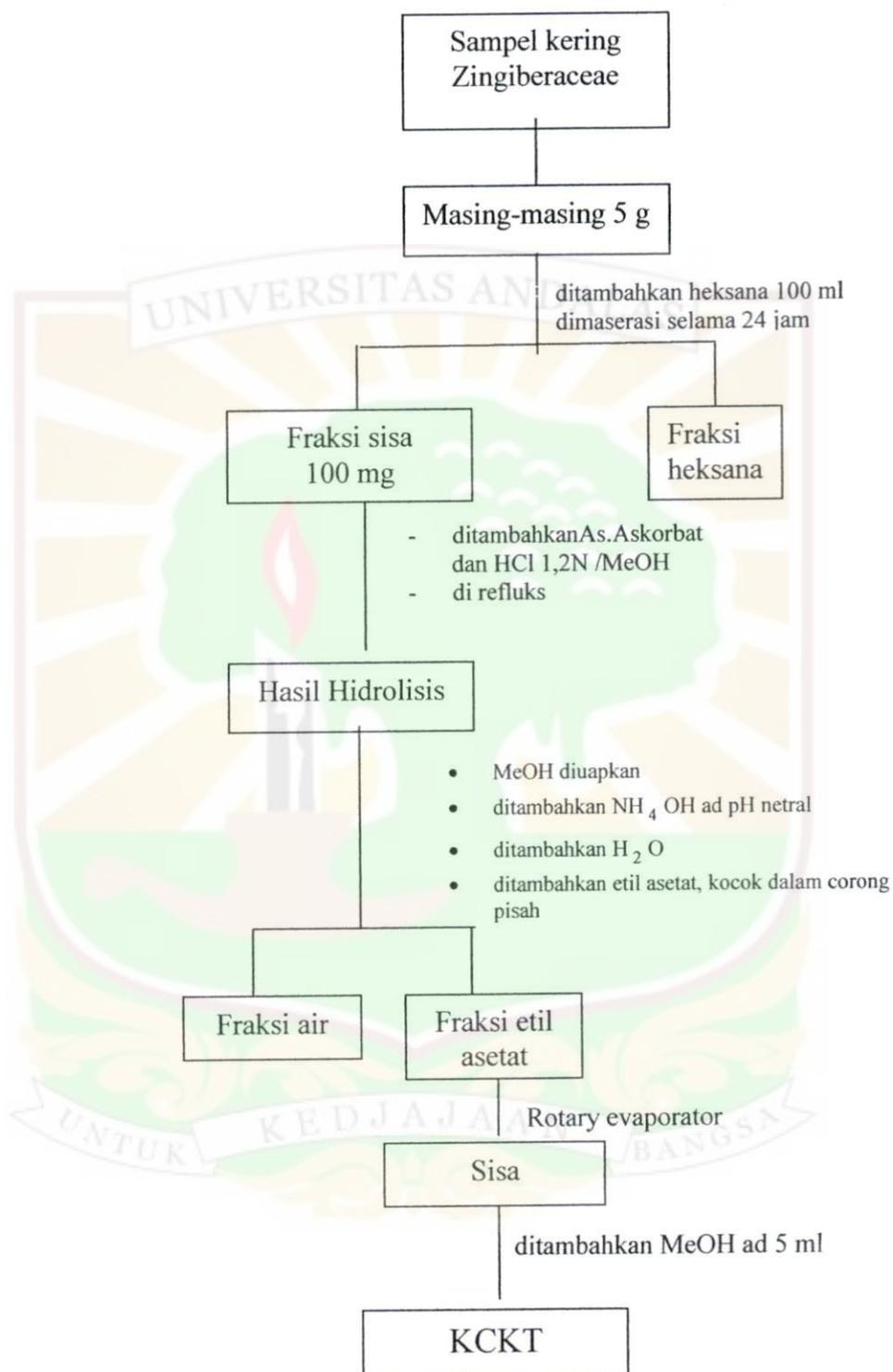
- Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metoda Dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol. 1, No.3*, Jakarta.
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia I*, Terjemahan oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan, Jakarta.
- Hideaki, O., Ying, T.S., Toshinao, I., Yoichi, N., and Kenich, K., 1998, High-performance liquid chromatographic determination of physiologically functional 5 flavonoid aglycones in Japanese plant foods materials, *ECSOC-2*
- Jang, H.D., K. S, Chang., Y. S, Huan., C, L, Hsu., S.H, Lee., and M.S, Su., 2006, Principal Phenolic phytochemicals and Antioxidant activities of three Chinese Medicinal Plants, *Food Chemistry Vol 103, Issue 3 page 749-756*
- Johnson, E.L and R, Stevenson., 1977, *Basic Liquid Chromatography*, Varian Associates, Inc, California.
- Lugasi, A., Hovari, J., Sagi and KV., Biro, L., 2003, The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases, *Acta Biologica Szegediensis Vol.47(1-4):119-125*.
- Mabry, T. J., K. R. Markham and M.B. Thomas, 1970, *The Systematic Identification of Flavonoids*, New York, Heidelberg, Berlin,: Springer-verlag.
- Markham, K. R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung.
- Miean, K. H and Mohamed., 2001, Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible tropical Plants, *J. Agric. Food chem., 49 (6), pp 3106-3112*.
- Morikawa, T., S, Ando., H, Matsuda., S, Kataoka., O, Muraoka., and M, Yoshikawa., 2005, Inhibitor of Nitric Oxide Production from the Rhizomes of *Alpinia galanga*: Structures of New 8-9' Linked Neolignans and Sesqueneolignan, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin, Vol.53, No. 6 625*.
- Norajit, K., N, Laohakunjit., and O, Kerdehoechuen., 2007, Antibacterial Effect of Five Zingiberaceae Essential Oils, *Molecules, 12, 2047-2060*.
- Nuengchamnong, N., H, Ank., and K, Ingkaninan., 2004, Separation and Detection of the Antioxidant Flavonoids, Rutin and Quercetin, Using HPLC Coupled on-line With Colorimetric Detection of Antioxidant Activity, *Naresuan University Journal; 12(2): 25-37*.

- Olukemi, O.A., I.O, Olukemi., S.M, Oluwatoyin., A. O, Austin., L.B, Mansurat., and T. A, Olufunmilola., 2005, Antioxidant activity of Nigerian dietary spices, *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem*, 4 (6)[1086-1093]
- Parinussa, TMS and KH, Timotiu., 2006, *Pengaruh Penambahan Asam terhadap Aktivitas Antioksidan Kurkumin*, Magister Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana 50711, Salatiga.
- Perry, L.M., 1980, *Medical Plants of East and Southeast Asia*, 189, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts and London.
- Scott, R. P. W, 1994, *Liquid Chromatography for The Analyst*, Marcel Dekker Inc, New York
- Skoog, D. A., F. J, Holler and T. A, Nieman., 1998, *Principles of Instrumental Analysis*, Fifth Edition, Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Sukandar, E.Y and Kusmardiyani, S., 1997, *Prosiding Temu Ilmiah Nasional Bidang Farmasi*, Volume I, Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengerahuan Alam, ITB, Bandung.
- Sutrisno, R.B., 1998, *Taksonomi Spermatophyta untuk Farmasi*, Ed I, Fak. Farmasi Univ. Pancasila, Jakarta.
- Tachakittirungrod, S and S, Chowwanapoonpohn., 2007, Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Hyptis suaveolens* and *Alpinia galanga* Growing in Northern Thailand, *CMU.J. Nat. Sci. Vol. 6(1)*.
- Tahir, S., 1997, *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*, Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Departemen Kesehatan R.I.
- Tewtrakul, S., S, Yuenyongsawad., S, Kummee., and L, Atsawajaruwan., 2005, Chemical components and biological activities of volatile oil of *Kaempferia galanga* Linn., *Songklanakarinn J. Sci. Technol, Vol. 27 Suppl.2)*
- Thalang, V., G. K, Trakoontivakorn., and Nakahara., 2001, Determination of Antioxidant Activity of Some Commonly Consumed Leafy Vegetables in Thailand, *Jircas Journal no.9:39-41*.
- The Merck Index, 1978, *An Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals*, Tenth Edition, Harper and Row, London, 5288, 8216.

- Tokusoglu, O., M. K, Unal., and Z,Yildirim., 2003, HPLC-UV and GC-MS Characterization of the Flavonol aglycons Quercetin, Kaempferol, and Myricetin in Tomato pastes and other Tomato-Based Products, *Acta Chromatographica*, no 13.
- The United States Pharmacopoeia Convention, 2005, *The United States Pharmacopoeia* 28th ed and National formulary 23th ed, Rockville.
- Van Valkenburg,J.L.C.H and Bunyapraphatsara, N. (Editors), 2002, Plant resources of South-East Asia no 12(2), *Medicinal and poisonous plants 2*, Prosea Foundation, Bogor, Indonesia.
- Wang, Y., J, Cao., J. H,Weng., and S, Zeng., 2005, Simultaneous Determination of Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin Accumulated Human Breast Cancer Cells, by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 39: 328-333.
- Yang, R.Y., S, Lin., and G, Kuo., 2008, Content and Distribution of Flavonoids among 91 Edible Plant Species, *Asia Pac J Clin Nutr*; 17(S1): 275-279.



Lampiran 1. Skema kerja analisa kuersetin dan kaempferol



Gambar 5. Skema kerja analisis kuersetin dan kaempferol dari tumbuhan Zingiberaceae

Lampiran 2. Tumbuhan Zingiberaceae



Lengkuas



Rimpang lengkuas



Jahe



Rimpang jahe



Kunyit



Rimpang kunyit



Kapulaga



Buah kapulaga



Kencur



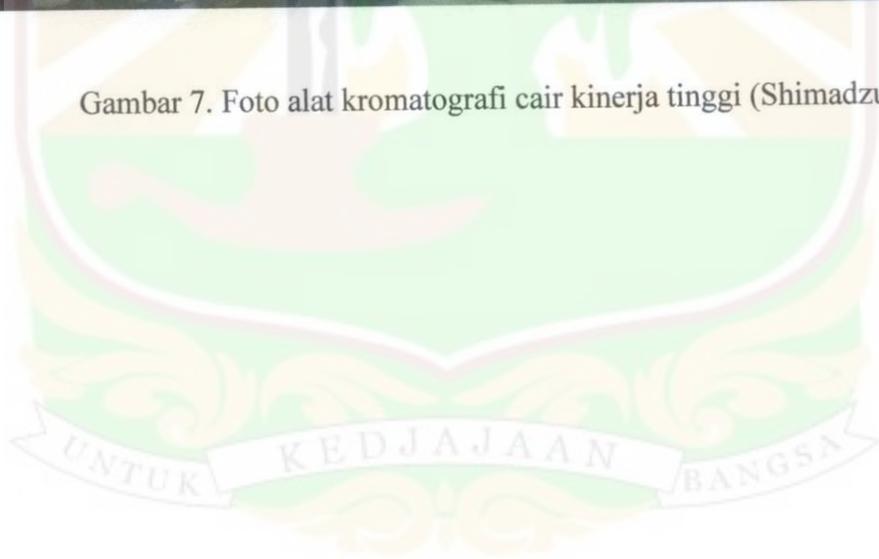
Rimpang kencur

Gambar 6. Foto tumbuhan Zingiberaceae

Lampiran 3. Alat kromatografi cair kinerja tinggi



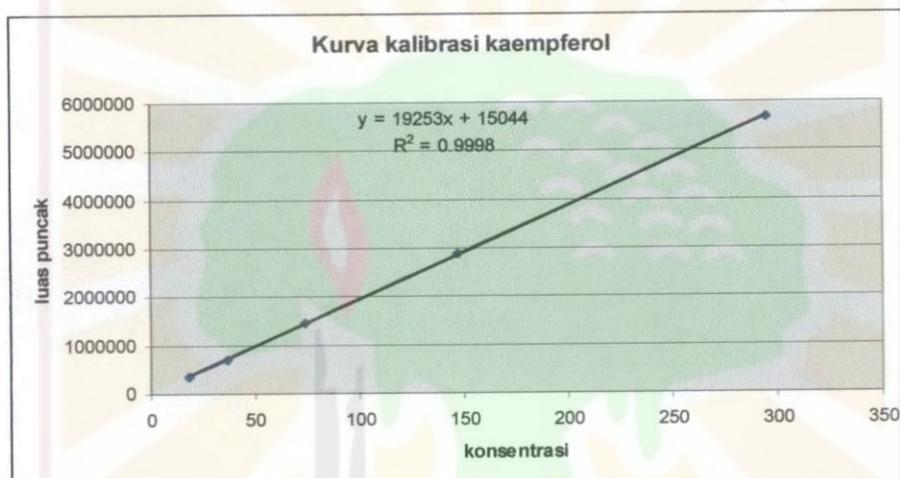
Gambar 7. Foto alat kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu).



Lampiran 4. Linearitas dan kurva kalibrasi

Tabel 3. Linearitas kaempferol

No	Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Luas puncak
1	18.4375	357701
2	36.875	696103,3
3	73.75	1464808
4	147.5	2883676
5	295	5677113



Gambar 8. Kurva kalibrasi kaempferol standar antara konsentrasi dan luas puncak

Lampiran 4. (lanjutan)

Perhitungan persamaan regresi kaempferol

no	X	Y	x ²	y ²	xy
1	18,4375	357701	339,9414	127950005401	6595112,188
2	36,875	696103,3	1359,766	484559804271	25668809,19
3	73,75	1464808	5439,063	2145662476864	108029590
4	147,5	2883676	21756,25	8315587272976	425342210
5	295	5677113	87025	32229615421037	1674748424
Σ	571,5625	11079402	115920	43303374980549	2240384145

Persamaan regresi kaempferol pembanding

$$y = a + bx$$

$$a = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$a = \frac{(11079402)(115920) - (571,5625)(2240384145)}{5(115920) - (571,5625)^2}$$

$$a = 15044,05$$

$$b = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{5(2240384145) - (571,5625)(11079402)}{5(115920) - (571,5625)^2}$$

$$b = 19252,8$$

$$y = 15044,05 + 19252,8x$$

Koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{n\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{\{n\sum x^2 - (\sum x)^2\}\{n\sum y^2 - (\sum y)^2\}}}$$

$$r = \frac{5(2240384145) - (571,5625(11079402))}{\sqrt{\{5(115920)(571,5625)^2\} \{5(43303374980549) - (11079402)^2\}}}$$

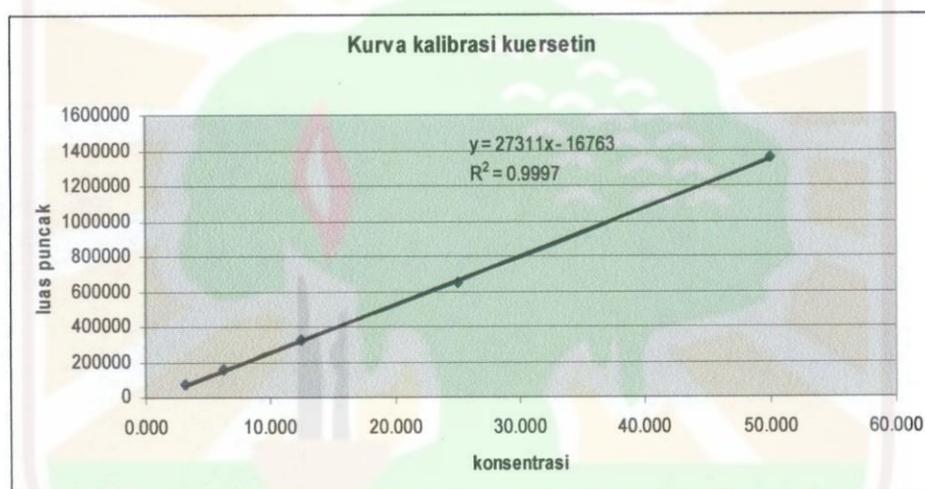
$$r = 0,9998$$



Lampiran 4. (lanjutan)

Tabel.4. Linearitas kuersetin standar

no	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Luas puncak
1	3,125	74441
2	6,25	157065,3
3	12,5	323206,3
4	25	651695,7
5	50	1355567



Gambar 9. Kurva kalibrasi kuersetin standar antara konsentrasi vs luas puncak

Lampiran 4. (lanjutan)

Perhitungan persamaan regresi kuersetin

No	X	y	x ²	y ²	xy
1	3,125	74441	9,765625	5541462481	232628,125
2	6,25	157065,3	39,0625	24669508464	981658,125
3	12,5	323206,3	156,25	104462312360	4040078,75
4	25	651695,7	625	424707246297	16292391,75
5	50	1355567	2500	1837562704829	67778365
Σ	96,875	2561976	3330,078	2396943234431	89325121,75

Persamaan regresi dari kuerstin pembeding

$$y = a + bx$$

$$a = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$a = \frac{(2561976)(3330,078) - (96,875)(89325121,75)}{5(3330,078) - (96,875)^2}$$

$$a = 16762,8$$

$$b = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{5(89325121,75) - (96,875)(2561976)}{5(3330,078) - (96,875)^2}$$

$$b = 27311,38$$

$$y = -16762,8 + 27311,38x$$

Koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{n\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{\{n\sum x^2 - (\sum x)^2\}\{n\sum y^2 - (\sum y)^2\}}}$$

$$r = \frac{5(89325121,75) - (96,875)(2561976)}{\sqrt{\{5(3330,078) - (96,875)^2\}\{5(2396943234431) - (2561976)^2\}}}$$

$$= 0,9997$$

Lampiran 5. Penentuan sensitifitas

Sensitivitas dapat dilakukan dengan mencari harga batas deteksi (BD) dan batas kuantisasi (BK) yang dapat ditentukan dari harga simpangan baku untuk

$$\text{intersep}(a) \text{ pada kurva linearitas } (S_a) = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{(n-1)}}$$

Tabel 5. Perhitungan batas deteksi (BD) dan batas kuantisasi (BK) kaempferol

x	Y	y _i	(y-y _i)	(Y-y _i) ²
18,4375	357701	370017,55	-12316,6	151697403,9
36,875	696103,3	724991,05	-28887,8	834502100,1
73,75	1464808	1434938,05	29869,95	892213913
147,5	2883676	2854832,05	28843,95	831973451,6
295	5677113,3	5694620,05	-17506,8	306486295,6
			Σ	3016873164

$$y = a + bx$$

$$y = 15044,05 + 19252,8x$$

$$SB = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{(n-1)}}$$

$$SB = \sqrt{\frac{3016873164}{5-1}}$$

$$SB = 27463,035$$

$$BD = \frac{3 \cdot SB}{b}$$

$$BD = \frac{3(27463,035)}{19252,8}$$

$$BD = 4,279 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 5. (lanjutan)

$$BK = \frac{10 \times SB}{b}$$

$$Bk = \frac{10(27463,035)}{19252,8}$$

$$BK = 14,264 \mu\text{g/mL}$$

Keterangan :

Y = Area

X = Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)

SB = Simpangan baku

BD = Batas deteksi

BK = Batas kuantisasi



Lampiran 5 . (lanjutan)

Tabel 6 . Perhitungan batas deteksi (BD) dan batas kuantisasi (BK) kuersetin

x	Y	yi	(y-yi)	(Y-yi) ²
3,125	74441	68585,2625	5855,738	34289661,67
6,25	157065,3	153933,325	3131,975	9809267,401
12,5	323206,3	324629,45	-1423,15	2025355,923
25	651695,7	666021,7	-14326	205234276
50	1355567	1348806,2	6760,8	45708416,64
			Σ	297066977,6

$$y = a + bx$$

$$y = -16762,8 + 27311,38x$$

$$S_b = \frac{\sqrt{\sum (Y - Y_i)^2}}{n - 1}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{297066977,6}{5 - 1}}$$

$$S_b = \sqrt{74266,7444}$$

$$S_b = 8617,815$$

$$BD = \frac{3xS_b}{b}$$

$$BD = \frac{3(8617,815)}{27311,38}$$

$$BD = 0,947 \mu\text{g/mL}$$

$$BK = \frac{10 \times S_b}{b}$$

$$BK = \frac{10(8617,815)}{27311,38}$$

$$BK = 3,155 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Keterangan :

Y = luas puncak

X = konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)

S_b = simpangan baku

BD = batas deteksi

BK = batas kuantisasi



Lampiran 6. Presisi sistem dan presisi metoda

Tabel 7. Presisi sistem menggunakan standar kuersetin

No	TR	Luas puncak (X)
1	24,842	165793
2	24,583	167320
3	24,908	169255
4	24,975	163943
5	24,983	166014
rata2	24,858	166465
SD	0,164	1970,443732
RSD	0,007%	1,18%

Tabel 8. Presisi metoda terhadap campuran standar kaempferol dengan ekstrak metanol kencur Batusangkar

No	Sampel	Luas puncak Std+MeOH	Luas puncak Std+sampel	Konsentrasi Std 21,07 μ g/mL	Konsentrasi Std + sample(μ g/mL) (<i>Recovery</i>)	% <i>Recovery</i>
1	K BtS hidr	428096	481674	21,454	24,237	112,97%
2			475163		23,898	111,39%
3			478852		24,090	112,28%
SD	0,7921					
RSD	0,7%					

Lampiran 7. Akurasi dan *recovery*Tabel 9. Akurasi dan *recovery* terhadap kuersetin standar

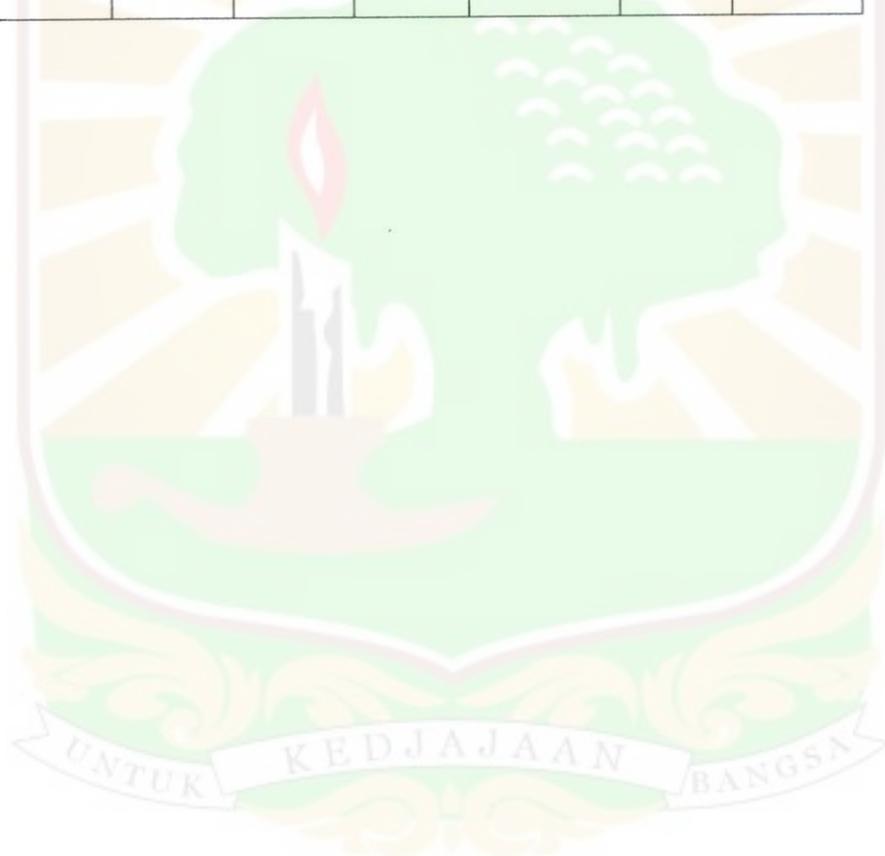
Pengulangan	konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Luas puncak	<i>Recovery</i>	% <i>Recovery</i>
1	50	1344172	49,8303	99,60%
2	50	1324881	49,1239	98,24%
3	50	1377649	51,056	102,11%
SD=1,68			$\bar{x} =$	99,98%
RSD=1,68%				



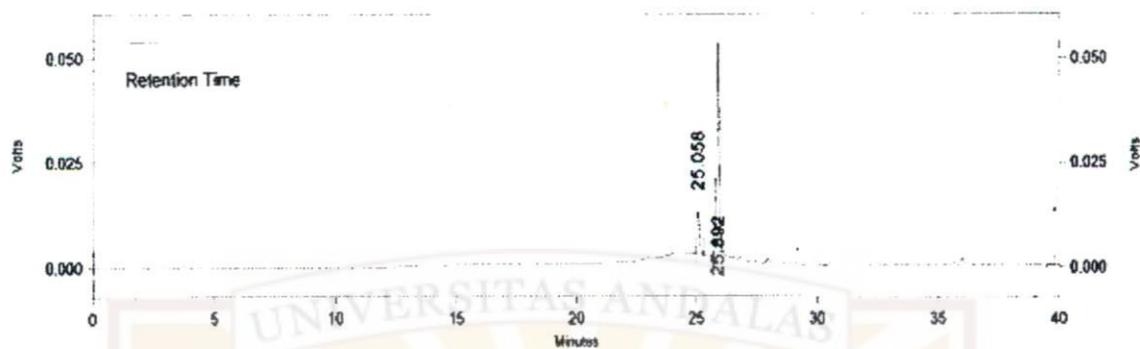
Lampiran 8. Ruggedness

Tabel 10. Hasil Uji Presisi *inter day* metoda (ruggedness) terhadap larutan standar kaempferol pada konsentrasi 21,07 $\mu\text{g/mL}$.

Sampel	kadar rata-rata ($\mu\text{g/mL}$)			Rata-rata	SD	RSD %
	Hari 1	Hari 2	hari 3			
Std kaempferol	21,9	21,7	21,454	21,685	0,2118	0,977



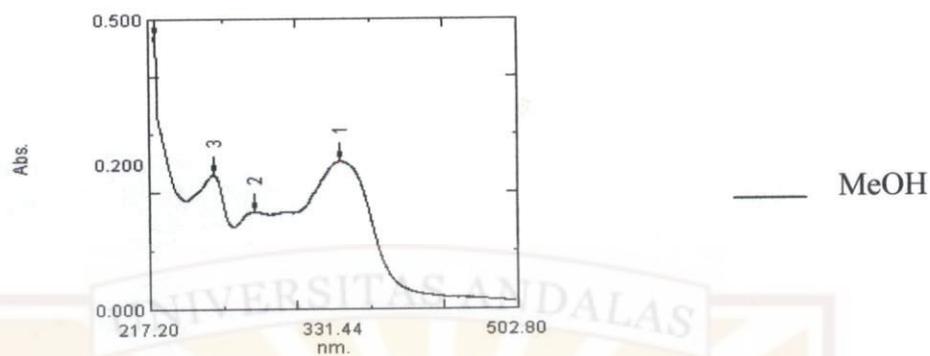
Lampiran 9. Uji spesifisitas metoda



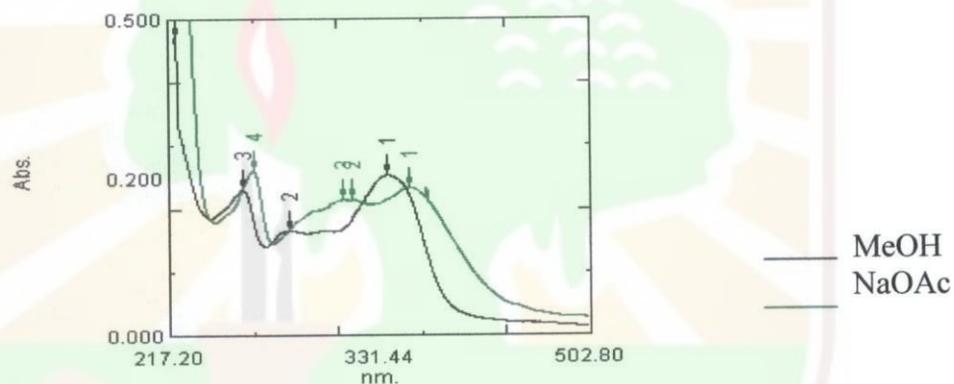
Gambar 10. Kromatogram Standar kuersetin dan standar kaempferol dalam metanol

No	Flavonoid	Waktu retensi (menit)
1	kuersetin	25,058
2	kaempferol	25,892

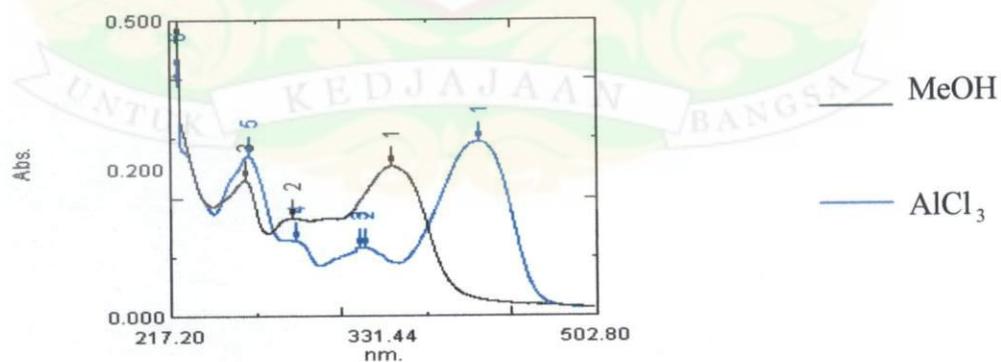
Lampiran.10. Spektrum U.V kaempferol dan pereaksi geser



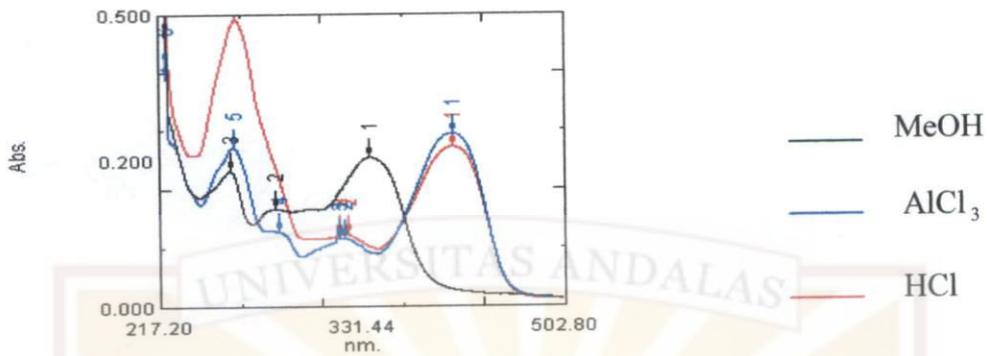
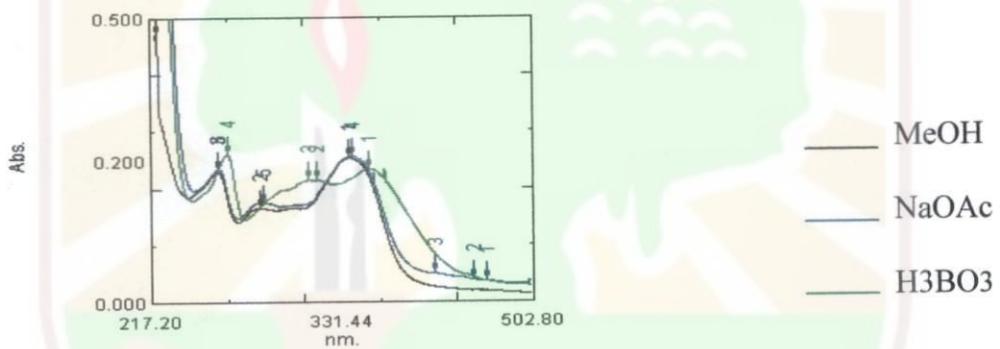
Gambar 11. Spektrum U.V kaempferol di dalam MeOH



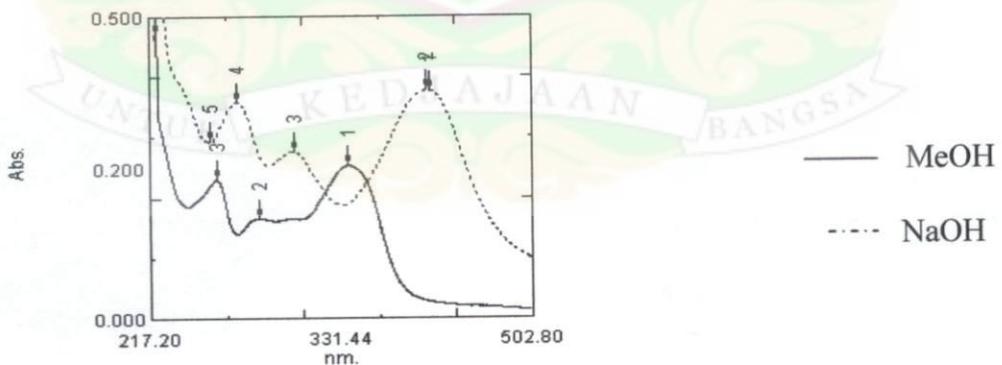
Gambar 12. Spektrum U.V kaempferol dengan pereaksi NaOAc/ MeOH

Gambar 13. Spektrum U.V kaempferol dengan pereaksi AlCl_3 / MeOH

Lampiran 10. (lanjutan)

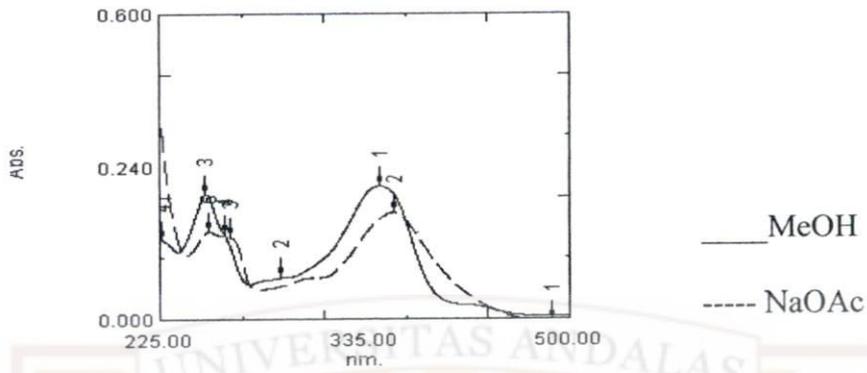
Gambar 14. Spektrum U.V kaempferol dengan pereaksi AlCl₃/ HCl / MeOH

Gambar 15. Spektrum U.V kaempferol dengan pereaksi NaOAc/ As Borat /MeOH

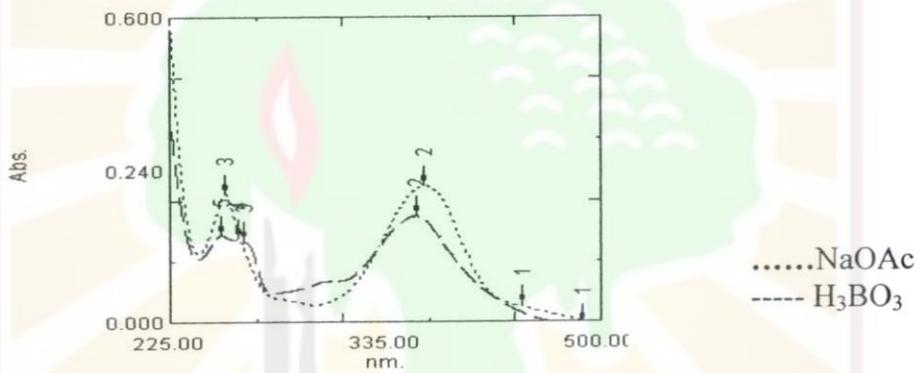
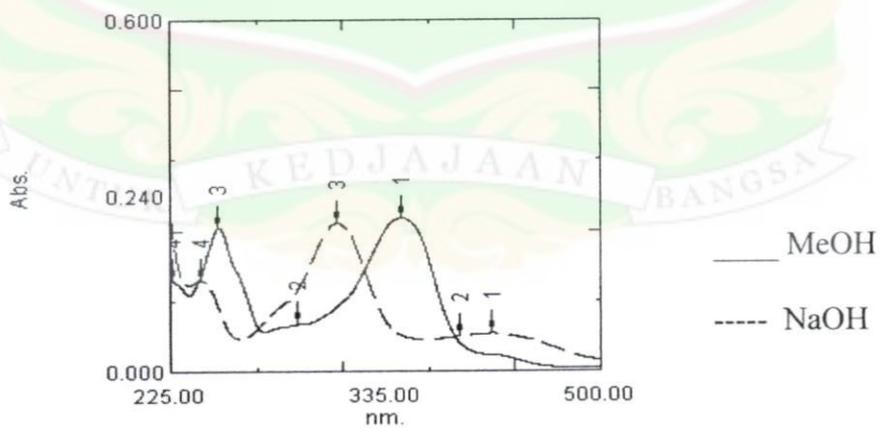


Gambar 16. Spektrum U.V kaempferol dengan pereaksi NaOH/ MeOH

Lampiran.11. Spektrum U.V kuersetin dan pereaksi gese

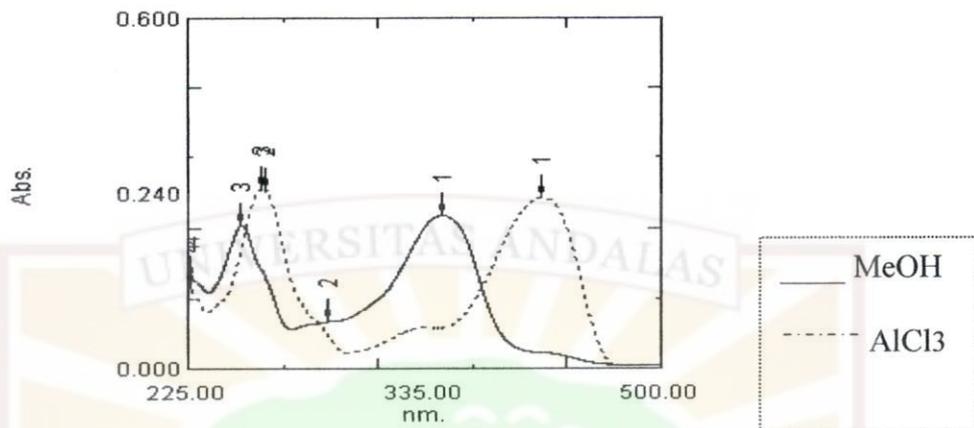


Gambar 17. Spektrum U.V kuersetin dengan pereaksi NaOAc/ MeOH

Gambar18. Spektrum U.V kuersetin dengan pereaksi NaOAc dan H₃BO₃

Gambar 19. Spektrum U.V kuersetin dengan pereaksi NaOH/ MeOH

Lampiran 11.(Lanjutan)

Gambar 20. Spektrum U.V kuersetin dengan pereaksi AlCl₃/MeOH

Lampiran 11. (lanjutan)

Tabel 11. Data spektrum U.V kaempferol dengan berbagai pereaksi geser dan referensinya.

Pereaksi / Pelarut	λ max (nm) kaempferol standar	λ max (nm) referensi (Mabry, T.J, <i>et.al</i> , 1970)
MeOH	365,20 ; 266,80	367 ; 266
NaOH/MeOH	426,60 ; 282,60	416 ; 278
AlCl ₃ / MeOH	423,40 ; 269,60	424 ; 268
AlCl ₃ /HCl/MeOH	423,40 ; 271,00	424 ; 269
NaOAc/MeOH	380,60 ; 274,40	387 ; 274
NaOAc/H ₃ BO ₃	368,00 ; 267	372 ; 267

Tabel 12. Data spektrum U.V kuersetin dengan berbagai pereaksi geser dan referensinya.

Pereaksi / Pelarut	λ max (nm) kuersetin standar	λ max (nm) referensi (Mabry, T.J, <i>et.al</i> , 1970)
MeOH	372,60 ; 255	370 ; 255
NaOH/MeOH	331	321 ;
AlCl ₃ / MeOH	445 ; 271	458 ; 272
AlCl ₃ /HCl/MeOH	430,60 ; 267,80	428 ; 265
NaOAc/MeOH	400 ; 271,80	390 ; 274
NaOAc/H ₃ BO ₃	386,60 ; 260,2	388 ; 261

Lampiran 12. Analisis flavonoid dalam tumbuhan Zingiberaceae

Tabel.13. Hasil analisis kuersetin dalam kapulaga dan kencur dengan KCKT

No	Sampel	Luas puncak Std/MeOH	Luas puncak Std+sampel	Konsentrasi Std 10 µg/mL	% Recovery std	Konsentrasi Std+sampel (µg/mL)	Konsentrasi sampel Total (µg/mL)	Kadar dalam sampel kering (µg/g)	Persentase kadar sampel (%)
1	Kplg Bts	244941	291250	9,582	95,8	11,277	3,4	170	0,0170
2	Kplg Bkt		301486			11,653	4,1	205	0,0205
3	Kplg APj		268736			10,453	1,7	85	0,0085
4	K Bts	248763	260201	9,722	97,22	10,14	0,8	40	0,0040
5	K Bkt		280782			10,89	2,3	115	0,0115
6	K APj		265254			10,33	1,2	60	0,0060

Keterangan : Kplg = kapulaga

K = kencur

Bts = Batusangkar

Bkt = Bukittinggi

APj = Alahan Panjang

Lampiran 12. (lanjutan)

Tabel 14. Hasil analisis kaempferol dalam lengkuas, jahe dan kencur dengan KCKT

No	Sampe l	Luas puncak	Luas puncak	Konsentrasi	%	konsentrasi	Kadar	Kadar dalam	Persentase
		Standar/MeOH	std+sampel	Std 21,07µg/mL	Recovery std	Std+sampel (µg/mL)	sampel Total µg/mL	sampel kering (µg/g)	Kadar sampel (%)
1	L Bts	436833	467791	21,9	103,9	23,51	3,2	160	0,0160
2	L Bkt		479551			24,126	4,5	225	0,0225
3	L APj		450375			22,61	1,5	75	0,0075
4	J Bts		470125			23,637	3,5	175	0,0175
5	J Bkt		475899			23,937	4,1	205	0,0205
6	J APj		450080			22,59	1,4	70	0,0070
7	K Bts	428096	478563	21,454	101,8	24,075	5,2	260	0,0260
8	K Bkt		458790			23,048	3,2	160	0,0160
9	K APj		461675			23,198	3,5	175	0,0175

Keterangan : K = kencur L = lengkuas J = jahe
 APj = Alahan Panjang Bkt = Bukittinggi Bts = Batusangkar

Lampiran 12.(lanjutan)

Contoh perhitungan kadar kaempferol dalam lengkuas Batusangkar:

Persamaan regresi: $y = 15044,05 + 19252,8x$

$$x = \frac{y-a}{b}$$

Luas puncak standar = 436833

Luas puncak standar + sampel = 467791

Konsentrasi standar yang diperoleh = 21,9 $\mu\text{g/mL}$

Konsentrasi standar + sampel = 23,51 $\mu\text{g/mL}$

Kadar sampel = 23,51 $\mu\text{g/mL}$ - 21,9 $\mu\text{g/mL}$ = 1,61 $\mu\text{g/mL}$

Kadar total sampel = 2 x 1,61 $\mu\text{g/mL}$ = 3,22 $\mu\text{g/mL}$ \approx 3,2 $\mu\text{g/mL}$.

100 mg sampel kering diekstraksi dengan metanol ad 5 mL

Kadar dalam 5mL sampel = 5 mL x 3,2 $\mu\text{g/mL}$ = 16 μg

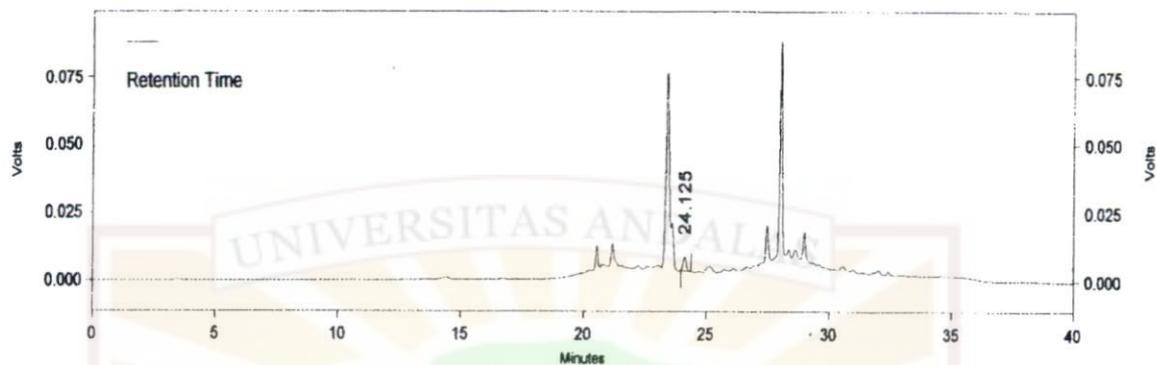
Dari 100 mg sampel kering mengandung kaempferol 16 μg

Kadar kaempferol dalam 1 gram sampel kering dari lengkuas Batusangkar =

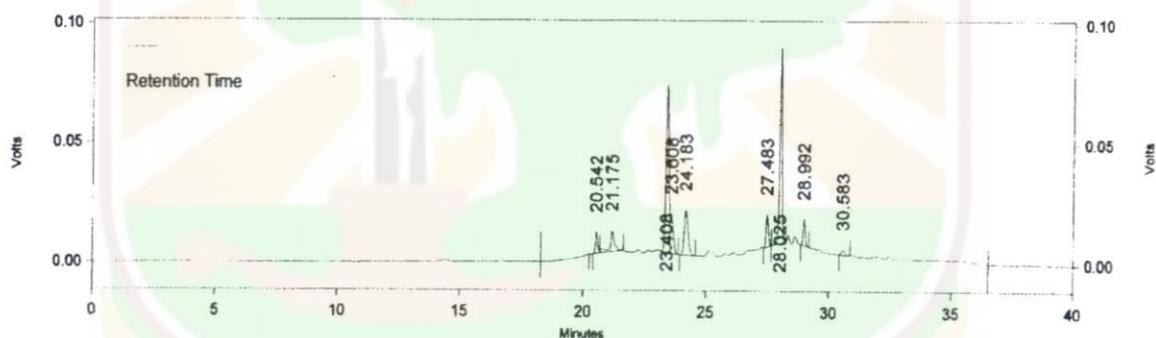
$$\frac{1000\text{mg}}{100\text{mg}} \times 16 \mu\text{g} = 160 \mu\text{g}$$

Persentase kadar lengkuas Batusangkar adalah = $\frac{160}{1000.000} \times 100\% = 0,016\% \text{ b/b}$

Lampiran 13. Kromatogram analisis kuersetin dan kaempferol dalam tumbuhan Zingiberaceae dengan metoda KCKT menggunakan fasa diam C-18 dan fasa gerak campuran metanol dan air



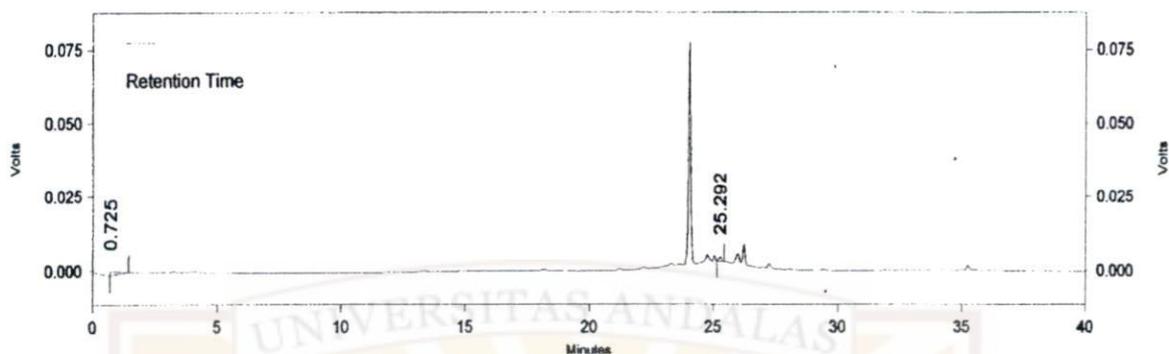
Gambar 21. Kromatogram ekstrak metanol hasil hidrolisis dari kencur Bukittinggi



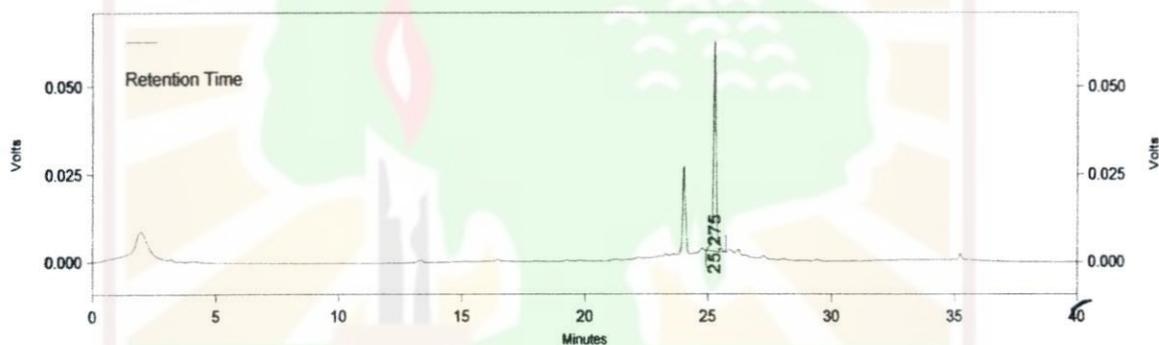
Gambar 22. Kromatogram kuersetin standar dan ekstrak metanol hasil hidrolisis dari kencur Bukittinggi.

Gambar	Flavonoid	Waktu retensi (menit)
Gambar 21	kuersetin	24,125
Gambar 22	kuersetin	24,183

Lampiran 13. (lanjutan)



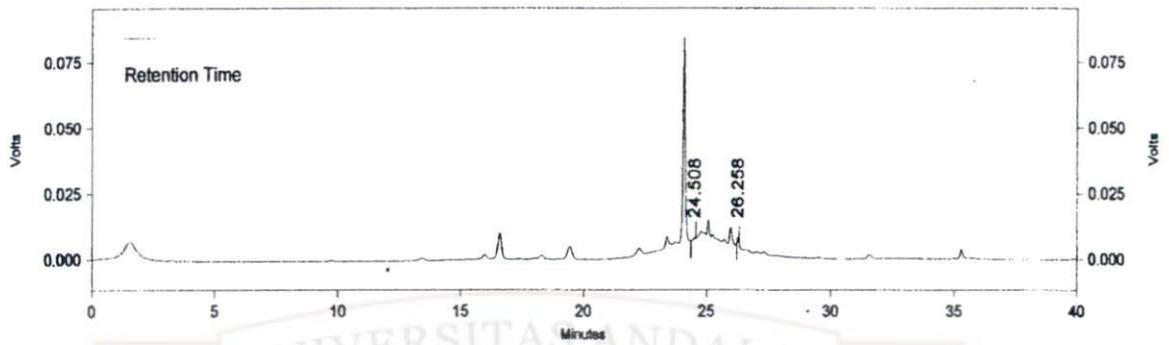
Gambar 23. Kromatogram ekstrak metanol hasil hidrolisis dari jahe Batusangkar



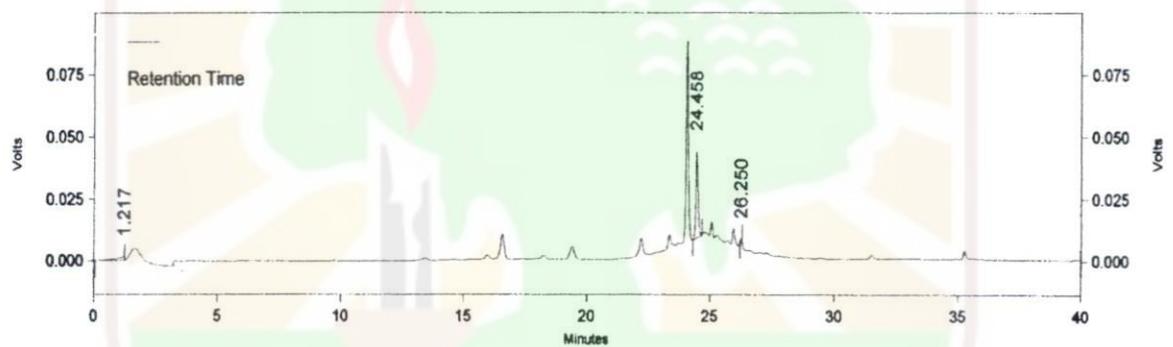
Gambar 24. Kromatogram kaempferol standar dan ekstrak metanol hasil hidrolisis dari jahe Batusangkar

Gambar	Flavonoid	Waktu retensi (menit)
Gambar 23	kaempferol	25,292
Gambar 24	kaempferol	25,275

Lampiran 13. (Lanjutan)



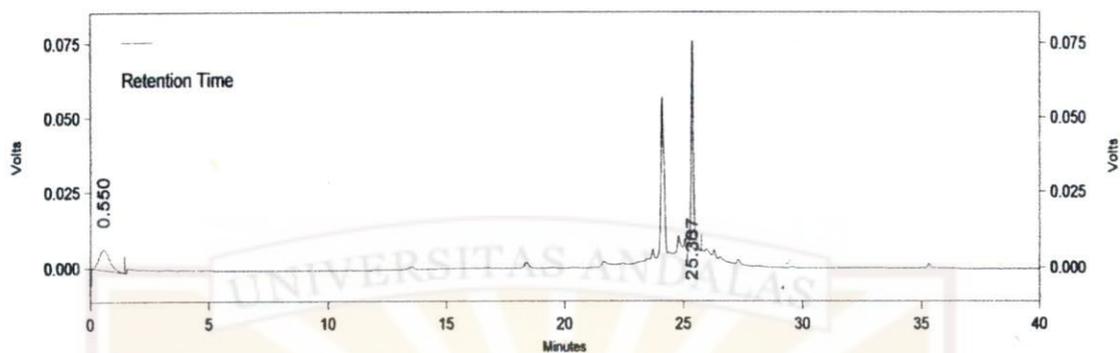
Gambar 25. Kromatogram ekstrak metanol hasil hidrolisis dari kapulaga Bukittinggi



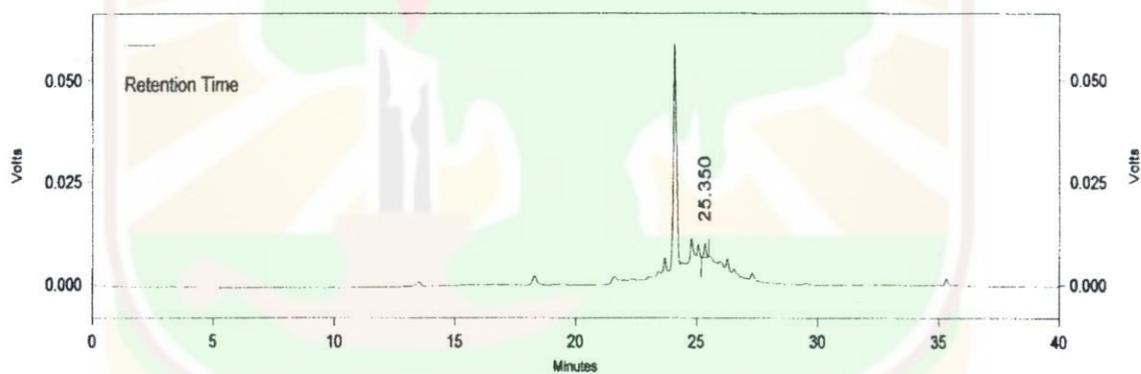
Gambar 26. Kromatogram kuersetin standar dan ekstrak metanol hasil hidrolisis dari kapulaga Bukittinggi

Gambar	Flavonoid	Waktu retensi (menit)
Gambar 25	kuersetin	24,508
Gambar 26	kuersetin	24,458

Lampiran 13 (lanjutan)



Gambar 27. Kromatogram standar kaempferol dan ekstrak hasil hidrolisis dari lengkuas Batusangkar



Gambar 28. Kromatogram ekstrak hasil hidrolisis dari lengkuas Batusangkar

Gambar	Flavonoid	Waktu retensi (menit)
Gambar 27	kaempferol	25,367
Gambar 28	kaempferol	25,350