

PENENTUAN KADAR FLAVONOID TOTAL DALAM OBAT HERBAL MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETRI DERIVATIF ULTRAVIOLET

Mohamad Rafi^{1,2} dan Zulhan Arief¹

¹Divisi Kimia Analitik, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga Bogor 16680, Indonesia

²Pusat Studi Biofarmaka, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Taman Kencana Bogor 16128,
Indonesia

Alamat korespondensi: mra@ipb.ac.id

ABSTRAK

Spektrofotometri derivatif ultraviolet (SDUV) telah digunakan dalam menentukan kadar flavonoid obat herbal tanpa adanya proses pemisahan dan pemakaian pereaksi kromogenik. Metode SDUV yang digunakan didasarkan pada pengukuran jarak puncak dari garis nol (D_z) pada panjang gelombang 276 nm pada spektrum derivat ketiga larutan contoh. Hasil evaluasi kinerja analitik dari metode SDUV yang dikembangkan diperoleh linearitas untuk kurva kalibrasi ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0.9984 pada kisaran konsentrasi flavonoid total yang diekspresikan sebagai ekivalen kuersetin 5-20 $\mu\text{g/mL}$. Presisi dari metode SDUV menunjukkan hasil yang cukup baik yang ditunjukkan dengan nilai persen simpangan baku relatif sebesar 4,48 dan akurasi yang dievaluasi dengan membandingkan kadar yang diperoleh dari metode SDUV dan pembanding (AlCl_3) menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata. Estimasi limit deteksi dan kuantifikasi dari metode SDUV diperoleh sebesar 0,67 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,24 $\mu\text{g/mL}$. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa metode SDUV dapat digunakan untuk penentuan kadar flavonoid total obat herbal Biouric untuk tujuan kendali mutunya.

Kata Kunci: flavonoid total, obat herbal, spektrofotometri derivatif ultraviolet

ABSTRACT

Ultraviolet derivative spectrophotometry (UVDS) was performed for the determination of total flavonoids in herbal medicines (Biouric) without any separation and chromogenic reagent. The method is based on the measurement of the distance between peaks to baseline (D_z) at 276 nm in the third order derivative spectra of the sample solution. Analytical performance test for the developed SDUV method showed good linearity with a correlation coefficient 0.9984 for the calibration curves of total flavonoid expressed as equivalent quercetin in the concentration range 5-20 $\mu\text{g/ml}$. Precision of the proposed method expressed as percentage relative standard deviation (% RSD) was less than 4.48% and for the accuracy was evaluated with the mean values of the SDUV and reference (AlCl_3) methods showed no significance differences. Estimation for Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.67 and 2.24 $\mu\text{g/mL}$ respectively. From the obtained results indicated that the developed method could be used for determination of total flavonoid in Biouric sample for the quality control purpose.

Keywords: total flavonoids, herbal medicines, ultraviolet derivative spectrophotometry.

PENDAHULUAN

Jaminan terhadap kualitas obat herbal semakin diperlukan dengan meningkatnya pemakaian obat herbal di masyarakat. Secara langsung peningkatan penggunaan sediaan herbal bermanfaat tersebut juga menyebabkan kebutuhan akan metode yang efisien untuk standardisasi, reproduibilitas, efikasi, keamanan, dan kualitas bahan baku awal ekstrak tersebut meningkat pula (Rolim *et al.* 2005). Khasiat dan kualitas dari obat herbal akan bergantung pada komposisi senyawa kimia yang terdapat di dalamnya. Untuk meyakinkan konsistensi khasiat dan kualitas obat herbal diperlukan analisis kuantitatif senyawa atau golongan senyawa penanda (*marker compound*) yang merupakan bagian dari kendali mutu obat herbal. Biouric merupakan suatu obat herbal yang digunakan dalam mencegah dan mengobati kelebihan asam urat. Obat herbal ini mengandung seledri dan sidaguri yang diketahui kaya akan senyawa flavonoid. Oleh karena itu suatu metode analisis cepat dan dapat dipercaya dalam menentukan kadar flavonoid total dalam obat herbal ini sangat diperlukan untuk mendukung kendali mutunya.

Metode analisis kuantitatif flavonoid total pada tumbuhan yang telah banyak

digunakan yaitu spektrofotometri konvensional (Chang *et al.* 2002), spektrofotometri inframerah (Rohaeti *et al.* 2006), kromatografi gas (KG) (Bankova *et al.* 1992; Christov & Bankova 1992), kromatografi gas-spektrometri massa (KG-MS) (Finger *et al.* 1991; Garcia-Viguera *et al.* 1993), kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Wang & Helliwell 2001), dan elektroforesis (Dadakova *et al.* 2001). Metode KG, KG-MS, KCKT dan elektroforesis kapiler walaupun dapat memberikan informasi kuantitatif yang akurat akan tetapi membutuhkan peralatan yang cukup mahal serta waktu analisis yang relatif lama. Teknik spektrofotometri sinar tampak konvensional dengan pewarna tertentu lebih dipilih untuk analisis rutin flavonoid total karena kemudahannya akan tetapi tidak dapat mendeteksi semua jenis flavonoid serta tidak dapat digunakan dalam contoh dengan matriks yang kompleks (Chang *et al.* 2002).

Saat ini telah banyak dikembangkan metode-metode analisis yang cepat, mudah, dan murah dari kombinasi teknik spektroskopi seperti spektroskopi UV-Vis (analisis basah) dengan metode kemometrik (analisis data kimia) seperti derivatisasi spektra UV-Vis. Kombinasi dari dua metode ini akan menghasilkan suatu model kalibrasi penentuan kadar suatu zat

dalam contoh yang dianalisis dengan ketelitian dan keakuratan yang cukup tinggi. Teknik gabungan ini telah banyak digunakan untuk analisis, karakterisasi, dan kontrol kualitas dalam bidang pertanian, farmasi, dan biomedis (Karpinska 2004; Ojeda & Rojas 2004). Metode SDUV menawarkan beberapa keuntungan dibandingkan dengan spektrofotometri UV konvensional seperti dapat memilah puncak yang tajam diantara spektrum yang lebar dan meningkatkan resolusi dari spektra yang tumpang tindih. Spektroskopi derivatif juga dapat menghasilkan daerah sidik jari yang lebih baik dibandingkan dengan spektra absorpsi yang umum (Karpinska 2004; Ojeda & Rojas 2004). Metode SDUV telah dilakukan untuk mencari metode cepat, mudah, dan murah dalam menentukan kadar suatu komponen kimia dari tanaman maupun sediaan herbalnya. Alpdogan *et al.* (2000) telah menggunakan metode SDUV untuk menentukan kadar kafein pada minuman cola, teh, dan kopi. Metode ini juga telah dikembangkan untuk analisis kuantitatif vitamin C (Aydogmus & Cetin 2002), campuran flavonoid (Baranowska & Rarog 2001), dan β -karotena dan astaxantin (Hui *et al.* 2005), reserpin (Darusman *et al.* 2012), campuran amlodipine, valsartan and hidroklorotiazida (Darwish *et al.* 2013)

SDUV telah digunakan dalam penentuan kadar flavonoid total dalam

Trichilia catigua dan *Ptychopetalum olacoides* (Rolim *et al.* 2005) menggunakan spektra derivat ke-1. Metode ini tidak dapat langsung digunakan pada obat herbal Biouric yang mengandung seledri dan sidaguri karena matriks contoh yang sangat berbeda. Oleh karena itu, pada penelitian ini dikembangkan metode SDUV untuk penentuan kadar flavonoid total dalam obat herbal Biouric. Hasil analisis dengan metode SDUV kemudian dibandingkan secara statistika dengan metode referensi digunakan dalam menentukan kadar flavonoid total yaitu metode $AlCl_3$ yang menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Depkes RI 2000).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan adalah neraca analitik, spektrofotometer UV-VIS Hitachi U-2800 (Tokyo, Jepang) yang dilengkapi dengan kuvet kuarsa 1 cm, komputer, dan perangkat lunak *UV-solutions* versi 2 buatan Hitachi. Seluruh percobaan yang dilakukan menggunakan bahan kimia dan pelarut dengan tingkatan analitis, standar kuersetin dari Sigma-Aldrich (St Louis, USA), dan sampel obat herbal Biouric produksi dari PT Biofarindo (Bogor, Indonesia).

Prosedur Kerja

Preparasi Standar dan Contoh

Larutan stok standar flavonoid total yang diekspresikan sebagai kuersetin disiapkan dengan melarutkan kuersetin dengan etanol untuk membuat konsentrasi 50 µg/ml dalam labu takar 50 ml. Dari larutan stok standar tersebut kemudian dibuat larutan standar kuersetin yaitu 10 µg/ml. Selanjutnya dibuat larutan contoh obat herbal setara kuersetin 10 µg/ml dengan cara refluks selama 30 menit menggunakan etanol sebagai pelarut dengan ulangan 3 kali kemudian filtrat disaring dan tepatkan dalam labu takar 50 ml.

Kondisi Optimum

Standar dan contoh yang telah disiapkan di atas kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan kecepatan payar 100 nm/menit pada kisaran panjang gelombang 230-370 nm dengan lebar celah 1,5 nm. Pada spektrum yang didapatkan kemudian dibuat spektrum derivatif orde tiga dengan orde *smoothing* 4.

Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Pengukuran Contoh

Dibuat seri larutan standar dengan konsentrasi flavonoid total 5-20 µg/ml dari larutan stok standar yang telah disiapkan kemudian dibuat spektrum UV (230-370 nm) tiap standar dengan spektrofotometer

UV-Vis. Jarak antara puncak ke garis dasar (Dz) pada panjang gelombang 276 nm pada spektrum derivat ke-3 kemudian diukur. Persamaan kurva kalibrasi dibuat dengan metode regresi kuadrat terkecil. Pengukuran Dz larutan contoh dilakukan dengan cara yang sama seperti di atas. Konsentrasi flavonoid total yang diekspresikan sebagai kuersetin diperoleh berdasarkan persamaan garis yang diperoleh dari kurva kalibrasi.

Pengukuran dengan Metode Referensi (Spektrofotometri)

Kadar flavonoid total menggunakan spektrofotometri dilakukan mengikuti metode AlCl₃ (Depkes RI 2000). Sebanyak 100 mg ekstrak sampel dimasukkan ke dalam labu bulat dan ditambahkan 1 ml larutan heksametilentetraamina 0,5% b/v, 20 mL aseton, dan 20 mL larutan HCl 25% untuk hidrolisis yang dilakukan selama 30 menit. Campuran hasil hidrolisis disaring dan dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Residu kemudian ditambah dengan 20 mL aseton dan dididihkan kembali selama 10 menit dan dilakukan sebanyak 2 kali. Larutan dalam labu ukur kemudian ditepatkan setelah dingin. Diambil sebanyak 20 mL larutan dalam labu ukur tersebut yang kemudian dimasukkan dalam corong pisah lalu ditambahkan akuades 20 mL. Setelahnya ditambahkan etil asetat 15 mL lalu dikocok dan fase etil asetat dipisahkan.

Larutan yang tersisa dalam corong pisah ditambah kembali dengan 10 mL etil asetat untuk pengulangan ekstraksinya dan dilakukan sebanyak 2 kali penambahan 10 mL etil asetat. Fraksi etil asetat dikumpulkan dalam labu ukur 50 mL. Sebanyak 10 mL larutan fraksi etil asetat ini dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan 2 mL larutan AlCl_3 (2 g AlCl_3 dalam 100 mL asam asetat glasial 5% v/v dalam metanol) dan ditepatkan dengan larutan asam asetat glasial 5% v/v dalam metanol. Sebagai senyawa standar digunakan kuersetin dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 $\mu\text{g/mL}$. Absorbans larutan sampel dan standar dibaca pada panjang gelombang 370,8 nm, Kadar flavonoid total diperoleh dari kurva kalibrasi yang telah dibuat.

Evaluasi Kinerja Analitik

Presisi

Disiapkan contoh obat herbal dengan konsentrasi flavonoid total 10 $\mu\text{g/mL}$, lalu diukur dengan spektrofotometer UV-Vis sebanyak 5 kali ulangan pada hari yang sama. Persentase simpangan baku relatif (%SBR) ditentukan untuk melihat presisi metode yang digunakan.

Linearitas

Disiapkan tiga seri deret standar untuk membuat kurva kalibrasi dengan konsentrasi flavonoid total 5-20 $\mu\text{g/mL}$. Setelah itu dilakukan pengukuran

menggunakan spektrofotometer. Linearitas diperoleh dengan metode regresi kuadrat terkecil. Linearitas kurva kalibrasi dilihat dari nilai koefisien korelasi (r)

Akurasi

Akurasi ditentukan dengan melihat kedekatan hasil antara metode referensi dan SDUV melalui uji t dan F.

Limit Deteksi (LD) dan Limit Kuantitasi (LK)

Limit deteksi dan kuantitasi dihitung dari rerata nilai kemiringan dan standar deviasi intersep kurva kalibrasi yang diperoleh (n=3) menurut persamaan:

$$\text{LD} = 3.3 \sigma/S$$

$$\text{LK} = 10 \sigma/S$$

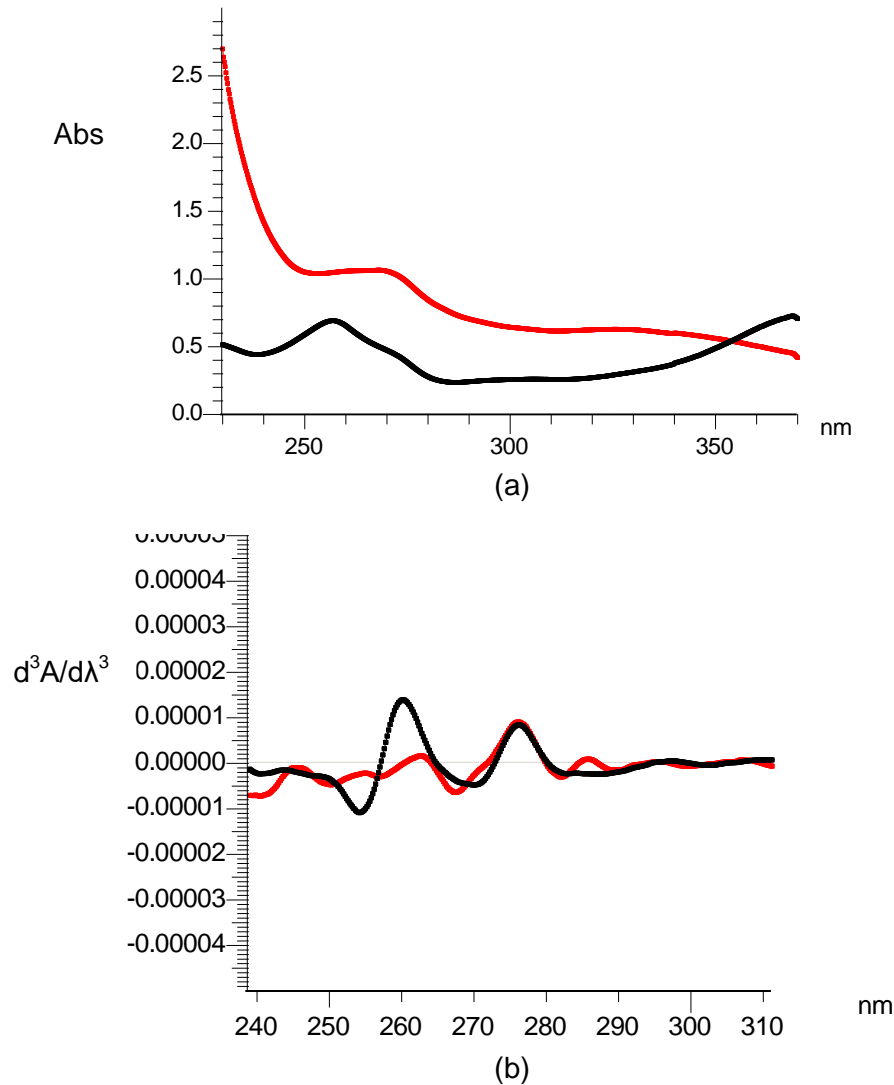
Nilai LD dan LK merupakan nilai estimasinya; σ , standar deviasi dari rerata intersep; S, nilai kemiringan dari kurva kalibrasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penentuan kadar flavonoid total dalam obat herbal komersial yang digunakan tidak dapat dilakukan secara langsung. Hal ini disebabkan oleh adanya gangguan dari senyawa lain dalam contoh atau disebut juga matriks contoh seperti terlihat dari spektrum yang dihasilkan (Gambar 1a). Dengan menggunakan konsentrasi flavonoid total yang sama antara standar dan contoh, terlihat bahwa spektrum contoh memiliki serapan lebih

besar dibandingkan serapan standar sehingga pengukuran secara langsung akan memberikan hasil yang tidak akurat. Sebaliknya, dengan melakukan derivatisasi spektrum dan pengukuran dilakukan

dengan mengukur jarak antara dua puncak yang diperoleh ataupun ke garis dasarnya maka efek dari matriks contoh dapat dihilangkan.



Gambar 1. (a) Spektrum orisinal, (b) spektrum derivat orde tiga dari contoh obat herbal (garis merah) dan standar kuersetin (garis hitam) dengan konsentrasi masing-masing = 10 $\mu\text{g/ml}$ (kecepatan payaran 100 nm/menit; orde *smoothing* 4)

Gambar 1b menunjukkan spektrum derivatif orde tiga, seperti terlihat pada gambar tersebut efek matriks dapat dihilangkan melalui derivatisasi spektrum UV.

Melalui kondisi optimum yang telah diperoleh, kurva kalibrasi dibuat dengan membuat plot antara jarak puncak ke garis dasar (Dz) pada panjang gelombang 276

nm dari spektrum derivat orde tiga dengan larutan standar flavonoid total pada berbagai konsentrasi (5-20 $\mu\text{g/ml}$). Linearitas dari kurva kalibrasi dan kecocokan dari pengukuran nilai Dz pada spektrum derivatif orde tiga terhadap hukum Lambert-Beer ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi yang mendekati 1. Tabulasi data kurva kalibrasi ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Data kurva kalibrasi metode SDUV (n=3)

Parameter	$^3\text{D}_{276\text{ nm}}$
Kisaran konsentrasi standar ($\mu\text{g/ml}$)	5-20
Persamaan regresi	$0,4571 + 0,88\text{ C}$
Koefisien korelasi (r)	0,9984

Nilai hasil analisis kadar flavonoid total dengan metode SDUV sebanyak 5 kali ulangan pada hari yang sama memberikan ketelitian yang cukup baik ditandai dengan nilai %SBR sebesar 4,48%. Akurasi dari metode yang dikembangkan dilihat dari

nilai rerata hasil antara metode SDUV dan AlCl_3 yang tidak memberikan perbedaan yang signifikan dilihat dari nilai t dan F eksperimen yang lebih kecil daripada nilai t dan F dari tabel. Nilai estimasi LD dan LK diperoleh masing-masing secara berurutan sebesar 0,67 $\mu\text{g/ml}$ dan 2,24 $\mu\text{g/ml}$. Tabel 2 menunjukkan semua nilai yang diperoleh dari evaluasi kinerja analitik metode SDUV untuk penetapan kadar flavonoid total dalam contoh yang digunakan.

Untuk melihat apakah metode SDUV yang dikembangkan ini dapat menjadi suatu metode alternatif penentuan kadar flavonoid total dalam obat herbal maka diperlukan verifikasi menggunakan metode referensi yaitu metode AlCl_3 . Kadar flavonoid total yang diperoleh dari kedua metode tersebut secara statistika menggunakan uji t dan F ternyata tidak memberikan perbedaan nilai rerata maupun ketelitian hasil yang signifikan (Tabel 2).

Tabel 2. Evaluasi kinerja analitik metode SDUV dan analisis statistika untuk membandingkannya dengan metode AlCl_3

	Metode	
	SDUV	AlCl_3
Ulangan (n)	5	5
Rerata ($\mu\text{g/ml}$) ^a \pm SD	$0,57 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,05$
SBR (%)	4,48	3,12
uji F ^b		2,60
uji t ^c		1,28
LD ($\mu\text{g/ml}$)		0,67
LK ($\mu\text{g/ml}$)		2,24

^a 5 kali ulangan

^b Nilai $F_{\text{tabel}} (95\%) = 9,605$

^c Nilai $t_{\text{tabel}} (95\%) = 2,31$

KESIMPULAN

Metode SDUV dapat digunakan untuk penentuan flavonoid total diekspresikan sebagai kuersetin dalam obat herbal komersial (Biouric). Hasil yang didapatkan dengan menggunakan metode SDUV untuk obat herbal sebesar 0,571 % b/b, sedangkan dengan menggunakan metode $AlCl_3$ sebagai metode referensi sebesar 0,51 % b/b. Hasil yang didapatkan dari kedua metode secara statistika (uji t-*student* dan uji F) tidak berbeda nyata.

DAFTAR PUSTAKA

- Alpdogan G, Karabina K, Sungur S. 2000. Derivative Spectrophotometric Determination of Caffeine in Some Beverages. *Turk J Chem* 26: 295-302.
- Aydogmus Z, Cetin SM. 2002. Determination of ascorbic acid in vegetables by derivative spectrophotometry. *Turk J Chem* 26: 697-704.
- Bankova V, Christov R, Stoev G, Popov S. 1992. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *J Chromatogr* 307: 150-153.
- Baranowska I, Rarog D. 2001. Application of derivative spectrophotometry to determination of flavonoid mixtures. *Talanta* 55: 209-212.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10(3): 178-182.
- Christov R, Bankova V. 1992. Gas chromatographic analysis of underivatized phenolics constituent from propolis using an electron-capture detector. *J Chromatogr* 623: 182-185.
- Dadakova E, Prochazkova E, Krizek M. 2001. Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials. *Electrophoresis* 22: 1573-1578.
- Darusman LK, Rafi M, Wahyuni WT, Azrianiningsari R. 2012. First-order ultraviolet derivative spectrophotometric methods for determination of reserpine in antihypertension tablet. *Indo J Chem* 12: 268-272.
- Darwish HW, Hassan SA, Salem MY, El-Zeany BA. 2013. Comparative study between derivative spectrophotometry and multivariate calibration as analytical tools applied for the simultaneous quantitation of Amlodipine, Valsartan and Hydrochlorothiazide. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 113:215-23.
- [Depkes RI]. 2000. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Depkes RI.
- Finger A, Engelhardt UH, Wray V. 1991. Flavonol glycosides in tea-kaempferol and quercetin rhamnoglucosides. *J Sci Food Agric* 55: 313-321.

- Garcia-Viguera C, Ferreres F, Tomas-Barberan FA. 1993. Study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC. *Z Naturforsch C Biosci* 42: 147-151.
- Ni H, He GQ, Ruan H, Chen QH, Chen F. 2005. Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract. *J Zhejiang Univ Sci B* 6(6): 514–522.
- Karpinska J. 2004. Derivative spectrophotometry-recent applications and directions of developments [ulasan]. *Talanta* 64: 801-822.
- Ojeda CB, Rojas FS. 2004. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry [ulasan]. *Anal Chim Acta* 518: 1-24.
- Rohaeti E, Heryanto R, Rafi M, Darusman LK, Kurniasari I. 2006. Rapid Analysis of Total Flavonoids from Medicinal Herb: Interpretation of Chemometrics on Infrared Spectra of *Phyllanthus niruri*. In: N. Hadipranoto *et al.* Proceeding The 2006 Seminar on Analytical Chemistry, March 9th 2006. Yogyakarta: Department of Chemistry Gadjah Mada University.
- Rolim A, Oishi T, Marciel CPM, Zague V, Pinto CASO, Kaneko TM, Consigliari VO, Velasco MVR. 2005. Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of Brazilian plants. *Intl J Pharmaceutics*, 308: 107-114.
- Wang HF, Helliwell K. 2001. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Res Int* 34: 223-227.