

TESIS

**PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE KLT-
DENSITOMETRI UNTUK PENENTUAN KADAR SECARA
SIMULTAN SENYAWA LUTEOLIN, KUERSETIN, APIGENIN,
DAN SINENSETIN DALAM PRODUK POLIHERBAL PELURUH
BATU GINJAL**



MUHAMMAD HIDAYATULLAH

051924153010

**PROGRAM MAGISTER STUDI ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

TESIS

**PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE KLT-
DENSITOMETRI UNTUK PENENTUAN KADAR SECARA
SIMULTAN SENYAWA LUTEOLIN, KUERSETIN, APIGENIN,
DAN SINENSETIN DALAM PRODUK POLIHERBAL PELURUH
BATU GINJAL**

MUHAMMAD HIDAYATULLAH
051924153010

PROGRAM MAGISTER STUDI ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022

TESIS

**PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE KLT-
DENSITOMETRI UNTUK PENENTUAN KADAR SECARA
SIMULTAN SENYAWA LUTEOLIN, KUERSETIN, APIGENIN,
DAN SINENSETIN DALAM PRODUK POLIHERBAL PELURUH
BATU GINJAL**

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Magister Program Studi Ilmu Farmasi
Pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Oleh:

MUHAMMAD HIDAYATULLAH
051924153010

**PROGRAM MAGISTER STUDI ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

TANGGAL 25 JULI 2022

Oleh

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. rer. nat. apt. Moch. Yuwono, M.S

NIP. 196005051986011003

Pembimbing Kedua



Dr. apt. Riesta Purnaharinastiti, S.Si., M. Si

NIP. 197204181997032001

Mengetahui,

**Koordinator Program Magister
Program Studi Ilmu Farmasi**

Fakultas Farmasi Universitas Airlangga



Dr. apt. Aty Widawaruyanti, M.Si

NIP. 196204261990022001

Telah diuji pada

Tanggal 12 Agustus 2022

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. apt. Juni Ekowati, M.Si.

Anggota :

1. Prof. Dr.rer.nat. apt. Mochammad Yuwono, MS.
2. Dr. apt. Riesta Primaharinastiti, S.Si., M.Si.
3. Dr. apt. Wiwied Ekasari, M.Si.
4. Dr. apt. Asri Darmawati, MS.

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Muhammad Hidayatullah
NIM : 051924153010
Program Studi : Magister Ilmu Farmasi
Judul : Pengembangan Dan Validasi Metode KLT-Densitometri Untuk Penentuan Kadar Secara Simultan Senyawa Luteolin, Kuersetin, Apigenin, dan Sinensetin Dalam Produk Polih herbal Peluruh Batu Ginjal

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis saya ini adalah asli (hasil karya sendiri) bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (plagiarism) dari karya orang lain. Tesis ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik.

Dalam tesis ini tidak ada pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan di dalam daftar Pustaka. Demikian, pernyataan ini dibuat tanpa adanya paksaan dari pihak mana pun, apabila pernyataan ini tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan norma dan peraturan yang berlaku di Universitas Airlangga.

Surabaya, 03 September 2022



Muhammad Hidayatullah

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadiran Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof. Dr.rer.nat. apt. Mochammad Yuwono, MS., Pembimbing Ketua, yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran sampai terselesaikannya tesis ini.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr. apt. Riesta Primaharinastiti, S.Si., M.Si., Pembimbing Serta yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran sampai terselesaikannya tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenalkanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Mohammad Nasih SE., M.T., Ak., CMA, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister.

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Prof. apt. Junaidi Khotib, M. Kes., Ph.D., atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Ketua Program Magister Program Studi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Prof. Dr. apt. Aty Widyawaruyanti, M.Si., atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Bapak dan Ibu penguji, Dr. apt. Nuzul Wahyuning Diyah, M.Si, Dr. apt. Wiwied Ekasari, M.Si, dan Dr. apt. Asri Darmawati, Ms. atas bimbingan dan sarannya.

Pihak lain yang terkait/terlibat yaitu Unit Layanan Pengujian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan PT. Interbat, atas fasilitas yang diberikan.

RINGKASAN

Urolithiasis adalah proses terbentuknya batu (kalkuli) pada tractus urinarius. Nefrolithiasis dialami oleh penduduk di berbagai negara maju seperti Korea Selatan dan Jepang dengan prevalensi mulai dari 5 - 19%. Prevalensi urolithiasis terus meningkat di sebagian negara-negara di Asia selama beberapa dekade terakhir. Tanaman herbal banyak dikembangkan di beberapa negara seperti *Strobilanthes crispus*, *Orthosiphon stamineus*, *Sonchi arvensidis*, dan *Plantago major* yang secara empiris digunakan untuk menyembuhkan atau mencegah terjadinya nefrolithiasis karena adanya senyawa luteolin, kuersetin, apigenin, dan sinensetin yang terdapat dalam tanaman tsb, yang mampu mengontrol proses kristalisasi batu ginjal. Berdasarkan aktivitas yang dimiliki, ekstrak tanaman-tanaman ini sangat potensial untuk dikembangkan menjadi sediaan polih herbal. Dalam pengembangan polih herbal senyawa penanda memegang peranan penting dalam menjamin kontrol kualitas dari obat herbal.

Metode kontrol kualitas untuk analisis luteolin, kuersetin, apigenin, dan sinensetin secara simultan belum dilakukan sehingga diperlukan pengembangan metode analisis untuk penetapan kadar luteolin, kuersetin, apigenin dan sinensetin pada kandungan produk polih herbal. Penelitian ini melaporkan hasil pengembangan dan validasi metode analisis KLT-Densitometri untuk penetapan kadar luteolin, kuersetin, apigenin, dan sinensetin dalam formulasi polih herbal yang mengandung ekstrak *Strobilanthes crispus*, *Orthosiphon stamineus*, *Sonchus arvensis*, dan *Plantago major*. Optimasi metode dilakukan sebagai tahap awal pengembangan metode. Dari hasil optimasi diperoleh kondisi optimal meliputi fase gerak gerak kloroform : aseton : diklorometana : asetonitril : asam format (6 : 2 : 2 : 0,05 : 0,05 v/v/v/v/v) dengan volume penotolan 8 μ L, deteksi noda dengan sinar UV panjang gelombang 335 nm dengan waktu penjenuhan minimal 30 menit.

Sebelum dilakukan validasi metode, diperlukan tahap prevalidasi berupa uji stabilitas analit standar dan ekstrak. Hasil uji stabilitas menunjukkan bahwa larutan analit standar dan sampel tidak stabil setelah 8 jam penyimpanan pada suhu 4 °C yang ditandai dengan adanya penurunan area dan pergeseran nilai R_f >2% terhadap larutan analit standar dan sampel yang baru dibuat.

Selanjutnya validasi metode dilakukan dengan menguji parameter linieritas, akurasi, presisi, LOD, dan LOQ. Hasil pengujian pada parameter linieritas memenuhi syarat dengan nilai r luteolin yang diperoleh yaitu 0,982, nilai r kuersetin yaitu 0,999, nilai r apigenin yaitu 0,990, dan nilai r sinensetin yang diperoleh yaitu 0,998. Nilai r tersebut lebih besar dari r tabel (0,8114), artinya konsentrasi uji memiliki hubungan yang linier dengan area yang diperoleh. Parameter akurasi memenuhi persyaratan dengan % *recovery* luteolin sebesar 93,86% - 97,06%, % *recovery* kuersetin sebesar 95,96% - 97,98%, % *recovery* apigenin sebesar 90,59% - 98,36%, dan % *recovery* sinensetin sebesar 90,74% - 96,32%. Parameter presisi memenuhi persyaratan dengan KV < 2%. Parameter LOD dan LOQ masing-masing diperoleh nilai LOD luteolin yaitu 5,32 ppm dan LOQ 17,76 ppm, nilai LOD kuersetin yaitu 1,52 ppm dan LOQ 5,09 ppm, nilai LOD apigenin yaitu 3,96 ppm dan LOQ 13,21 ppm, dan nilai LOD

sinensetin yaitu 1,67 ppm dan LOQ 5,58 ppm. Hasil uji menunjukkan bahwa tidak ada faktor yang berpengaruh secara signifikan sehingga metode dapat diaplikasikan untuk penetapan kadar luteolin, kuersetin, apigenin, dan sinensetin dalam polih herbal. Kadar luteolin sebesar 3,67%, kuersetin sebesar 3,26%, apigenin sebesar 4,18%, dan sinensetin sebesar 6,06%.

Development And Validation Of Tlc-Densitometric Methods For Simultaneous Determination Of Luteolin, Quercetine, Apigenine And Sinensetin Levels In Polyherbal Products Lossing Kidney Stones

Abstract

Nephrolithiasis is the formation of stones in the urinary tract, which can cause kidney injury owing to obstructions in the urinary tract. Herbal plants developed in several countries such as Plantago major, Sonchus arvensis, Strobilanthes crispus, and Orthosiphon stamineus are empirically used to treat or prevent nephrolithiasis due to the presence of luteolin, quercetin, apigenin, and sinensetin compounds. The purpose of this research is to develop a Densitometric Thin Layer Chromatography (TLC) method for determining luteolin, quercetin, apigenin, and sinensetin levels in herbal medicines. The stationary phase is a silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate, and the mobile phase is a combination of chloroform: acetone: dichloromethane: acetonitrile: formic acid (6: 2: 2: 0.05: 0.05 v/v/v/v/v) and expanded for 30 minutes. Quantitative evaluation using WinCATS Camag scanner with UV-Vis detector at 335 nm. The validation results show that this method provides selective and specific, linear, accurate and precise analysis results. This TLC-Densitometry method can be applied to determine the levels of luteolin, quercetin, apigenin, and sinensetin simultaneously in herbal medicinal preparations containing extracts of Plantago major, Sonchus arvensis, Strobilanthes crispus, and Orthosiphon stamineus quickly, simply, and selectively.

Keywords: TLC-densitometry, luteolin, quercetin, apigenin, sinensetin

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Dalam	i
Persyaratan Gelar	ii
Lembar Pengesahan	iii
Lembar pernyataan orisinalitas	v
Ucapan terima kasih.....	vi
Ringkasan	vii
Abstract	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Tentang Kontrol Kualitas Obat Herbal	5
2.2 Tinjauan tentang <i>Plantago major</i>	7
2.3 Tinjauan Tentang <i>Orthosiphon stamineus</i>	11
2.4 Tinjauan Tentang <i>Strobilanthes crispus</i>	14
2.5 Tinjauan Tentang <i>Sonchus arvensis</i>	18
2.6 Tinjauan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	22
2.7 Tinjauan Tentang Validasi Metode	30
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL	34
3.1 Uraian Kerangka Konseptual	34
3.2 Hipotesis.....	37
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	38

4.1 Rancangan Penelitian	38
4.2 Variabel Penelitian	38
4.3 Bahan Penelitian.....	39
4.4 Instrumen Penelitian.....	39
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	39
4.6 Prosedur Penelitian.....	39
4.7 Prevalidasi	42
4.8 Validasi Metode Analisis	42
4.9 Penetapan Kadar Sampel.....	45
4.10 Analisa Data	46
4.11 Kerangka Operasional	47
BAB 5 DATA DAN ANALISIS PENELITIAN	48
5.1 Optimasi Kondisi KLT-Densitometri.....	48
5.2 Prevalidasi	52
5.3 Validasi Metode	53
5.4 Penetapan kadar luteolin, kuersetin, apigenin dan sinensetin dalam sampel	63
BAB 6 PEMBAHASAN	64
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	72
7.1 Kesimpulan.....	72
7.2 Saran.....	72
DAFTAR PUSTAKA	73
LAMPIRAN	78

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Senyawa kimia yang diisolasi dari <i>Plantago major</i>	9
2.2 Efek farmakologi senyawa yang telah diisolasi dari <i>Plantago major</i>	10
2.3 Senyawa kimia yang diisolasi dari <i>Orthosiphon stamineus</i>	12
2.4 Efek farmakologi senyawa yang telah diisolasi dari <i>Orthosiphon stamineus</i>	13
2.5 Senyawa kimia yang diisolasi dari <i>Strobilanthes crispus</i>	16
2.6 Efek farmakologi senyawa yang telah diisolasi dari <i>Strobilanthes crispus</i>	17
2.7 Senyawa kimia yang diisolasi dari <i>Sonchus arvensis</i>	20
2.8 Efek farmakologi senyawa yang telah diisolasi dari <i>Sonchus arvensis</i>	21
2.9 Contoh fase diam yang sering digunakan pada KLT	26
2.10 Contoh pelarut-pelarut umum berdasarkan urutan peningkatan polaritas	27
4.1 Komposisi fase gerak yang diuji untuk mendapatkan kondisi yang optimal.....	40
4.2 Parameter Uji dan Persyaratan Validasi.....	46
5.1 Komposisi fase gerak yang diuji untuk mendapatkan kondisi optimal.....	48
5.2 Data hasil optimasi sample load menggunakan fase gerak kloroform : aseton : diklorometana : asetonitril : asam format (6 : 2 : 2 : 0,05 : 0,05 v/v/v/v/v)	50
5.3 Data hasil optimasi waktu penjenjuran bejana menggunakan fase gerak kloroform : aseton : diklorometana : asetonitril : asam format (6 : 2 : 2 : 0,05 : 0,05 v/v/v/v/v)	51
5.4 Hasil uji stabilitas larutan standar pada penyimpanan 4 °C	52
5.5 Hasil uji stabilitas larutan ekstrak pada penyimpanan 4 °C	53
5.6 Kenaikan area pada peak luteolin, kuersetin, apigenin, dan sinensetin dalam sampel yang diadisi standar	54
5.7 Hasil uji kemurnian peak luteolin, kuersetin, apigenin, dan sinensetin dan sampel	54

5.8 Nilai Rs peak luteolin, kuersetin, apigenin, dan sinensetin dengan peak terdekat pada kromatogram standar dan sampel	55
5.9 Data Hasil pengukuran area (y) dengan 6 konsentrasi larutan standar (x)	55
5.10 Data hasil pengukuran recovery luteolin dan kuersetin	58
5.11 Data hasil pengukuran recovery Apigenin dan Sinensetin	59
5.12 Data hasil pengukuran repeatability dan intermediate precision pada luteolin dan kuersetin	60
5.13 Data hasil pengukuran repeatability dan intermediate precision pada apigenin dan sinensetin.....	61
5.14 Data hasil pengukuran LOD dan LOQ pada luteolin dan kuersetin	62
5.15 Data hasil pengukuran LOD dan LOQ pada apigenin dan sinensetin	62
5.16 Penetapan kadar luteolin, kuersetin, apigenin dan sinensetin dalam sampel	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 <i>Plantago major</i> (Napitupulu, 2008).....	7
2.2 Struktur senyawa luteolin.....	10
2.3 <i>Orthosiphon stamineus</i> (Napitupulu, 2008).....	11
2.4 Struktur senyawa sinensetin.....	13
2.5 <i>Strobilanthes crispus</i> (Napitupulu, 2008)	14
2.6 Struktur apigenin.....	17
2.7 <i>Sonchus arvensis</i> (Napitupulu, 2008)	18
2.8 Struktur Kuersetin	21
2.9 Bejana pengembangan dengan kertas saring dan pelat KLT	23
2.10 (a) Pelat awal dengan sampel (b) Pelat yang sudah dieluasi.....	24
3.1 Bagan Kerangka Konseptual.....	36
4.1 Kerangka Operasional.....	47
5.1 Kromatogram standar (1) luteolin (2) kuersetin (3) apigenin dan (4) sinensetin (A) dan sampel obat herbal (B) dengan komposisi fase gerak kloroform : aseton : diklorometana : asetonitril : asam format (6 : 2 : 2 : 0,05 : 0,05 v/v/v/v)	49
5.2 Spektra dan panjang gelombang senyawa apigenin pada konsentrasi 1000 ppm menggunakan fase gerak kloroform : aseton : diklorometana : asetonitril : asam format (6 : 2 : 2 : 0,05 : 0,05 v/v/v/v).....	50
5.3 Grafik linieritas luteolin, kuersetin, apigenin, dan sinensetin	57