

## VALIDASI DAN PENETAPAN KADAR SENYAWA RUTIN PADA EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) DENGAN METODE KCKT

Theodorus Rexa Handoyo, Go Andrew Purnomo, Chelsia Devina Maryanto,  
Michael Raharja Gani\*  
Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.  
\* Korespondensi penulis : mr\_gani@usd.ac.id

Diterima : 8 Juli 2021

Direvisi : 3 Juni 2022

Disetujui : 4 Juni 2022

Copyright © 2022 Universitas Pakuan



FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmasi is licensed under a  
Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License

### ABSTRAK

Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) merupakan salah satu tanaman herbal yang sering digunakan untuk pengobatan. Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan kadar rutin pada ekstrak etanol daun binahong menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi sebagai proses standarisasi ekstrak bahan alam dengan senyawa rutin sebagai penanda. Pada penelitian ini rutin digunakan sebagai senyawa penanda. Simplisia daun binahong diekstrak menggunakan metode digesti dengan etanol 96% sebagai pelarut. Ekstraksi dilakukan pada suhu 50°C dengan kecepatan pengadukan 200 rpm, dan ekstrak dipisahkan hingga tersisa 25% volume. Ekstrak kemudian diekstraksi cair menggunakan pelarut n-heksan dan diambil bagian etanolnya. Analisis dilakukan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Optimasi dilakukan menggunakan fase gerak metanol, asetonitril, air serta beberapa variasi laju alir. Dilakukan validasi menggunakan parameter selektivitas, linearitas, *Limit of Detection* (LOD), *Limit of Quantification* (LOQ), akurasi dan presisi. Komposisi fase gerak terdiri dari metanol : asetonitril : akuabides pada perbandingan 30 : 10 : 60 dengan laju alir 0,7 mL/ menit. Deteksi dilakukan pada panjang gelombang 272 nm. Hasil penelitian memenuhi parameter validasi yaitu selektivitas dengan nilai resolusi 1,676, persamaan kurva baku  $y = 14672x - 2408$  dengan nilai  $r$  sebesar 0,9975, nilai LOD dan LOQ adalah 0,104 dan 0,316 ppm. Nilai persen perolehan kembali pada akurasi didapatkan pada rentang 90,77 – 104,47% dan presisi kurang dari 6% untuk pengujian dalam 1 hari dan hari yang berbeda. Kadar rutin yang diperoleh sebesar  $0,014 \pm 0,000704$  mg/g ekstrak dan nilai koefisien variasi sebesar 5,17%.

**Kata kunci:** *Anredera cordifolia*; senyawa rutin; Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

### VALIDATION AND DETERMINATION OF RUTIN COMPOUND LEVELS OF BINAHONG LEAF (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) ETHANOL EXTRACT USING HPLC METHOD

#### ABSTRACT

Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) is one of herbal plant that is still used for medicine. The objective of this research was to determine rutin level in ethanolic extract

of binahong leaves with high performance liquid chromatography as process of standardization for extract from natural products. In this research, rutin was used as marker. *Simplicia* of binahong will be extracted using digestion method with ethanol 96% as solvent. Extraction was done at 50°C, 200 rpm and the extract will be thickened until 25% from previous volume remains. Liquid liquid extraction was done with n-hexane and take ethanol part from the results. Analysis was done using high performance liquid chromatography (HPLC). Optimization mobile phase was done using methanol, acetonitrile, aquabidest with several variations of flow rate. Validation was done using selectivity, linearity, Limit of Detection (LOD), Limit of Quantification (LOQ), accuracy, and precision parameters. The mobile phase composition consisted of methanol, acetonitrile, aquabidest with 30:10: 60 ratio with 0.7mL/min flow rate. Detection was carried out at 272nm as maximum wavelength. The result of the study met the validation parameters. namely selectivity with a value of  $y = 14672x - 2408$  with an  $r$  value of 0.9975, LOD and LOQ values were 0.104 and 0.316 ppm. The percent recovery value of the accuracy obtained is in the range of 90.77 – 104.47% and the precision is less than 6% for testing in 1 day and different days. The rutin level obtained is  $0,0014 \pm 0.0000728\%$  w / w and the coefficient of variation value is 5,18%.

**Keywords:** *Anredera cordifolia*; rutin compound; high performance liquid chromatography (HPLC)

## PENDAHULUAN

Tanaman binahong adalah salah satu tanaman obat yang sangat bermanfaat untuk nantinya dijadikan obat herbal. Tanaman ini sering digunakan oleh Masyarakat Indonesia untuk menyembuhkan luka (Yuliana dkk., 2020). Binahong diketahui memiliki beragam khasiat yang berasal dari senyawa-senyawa flavonoid di dalamnya. Binahong memiliki panjang daun antara 4 sampai 7 cm, dengan diameter 0,5 sampai dengan 2 cm dan memiliki tekstur daging yang lunak. Permukaan daun terlihat jaringan parenkim, xylem, floem, dan benda ergastrik berupa amilum. Tumbuhan ini dapat tumbuh di dataran tinggi ataupun dataran rendah (Rofida, 2010). Daun binahong memiliki kandungan flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa yang berpotensi dapat digunakan sebagai antioksidan (Selawa dkk., 2013). Selain itu, senyawa-senyawa flavonoid tersebut bermanfaat untuk kesehatan, antara lain sebagai antioksidan, obat untuk penyakit stroke, asam urat, kanker, agen antibakteri (Mulia

et al., 2017), dan berperan dalam mengendalikan gula darah (Dwitiyanti D et al., 2019) serta penyembuhan luka pada penderita diabetes (Kintoko dkk., 2017). Dalam daun binahong, mengandung kadar flavonoid total tidak kurang dari 0,33% sebagai rutin (DepKes RI, 2017).

Salah satu senyawa flavonoid yang dinilai berperan dalam penyembuhan luka pada penderita diabetes yang ada pada daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) adalah rutin, dibuktikan dengan penyembuhan luka yang lebih cepat pada tikus penderita DM yang diberikan senyawa rutin dibandingkan dengan tikus yang tidak menerima rutin (Chen et al., 2020). Senyawa ini secara umum bekerja dengan cara mencegah pembentukan gula sorbitol dan peningkatan jumlah senyawa sitokin yang dapat memicu inflamasi pada luka penderita diabetes (Farsi et al., 2014; Ghorbani, 2017). Rutin memiliki efek antioksidan, antiradikal, estrogenik, antiinflamasi, antivirus, antitumor, dan sitotoksik. Rutin tersebar secara luas di alam dalam kandungan buah buahan dan

sayuran seperti apel, asparagus hijau dan teh (Patel & Patel, 2019).

Sebagai bahan dari alam, saat daun binahong akan digunakan sebagai obat herbal haruslah bermutu, aman, dan bermanfaat. Oleh karena itu, perlu dilakukan standardisasi dari ekstrak etanol daun binahong. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan salah satu instrumen yang dapat digunakan untuk menganalisis senyawa. KCKT dapat digunakan untuk menganalisis suatu senyawa secara kuantitatif dan juga kualitatif, serta dapat melakukan pemisahan senyawa berdasarkan kecepatan elusi (Gandjar dan Rohman, 2015).

## **METODE PENELITIAN**

### **Alat**

Pada penelitian ini, akan digunakan seperangkat alat KCKT Shimadzu LC 2010HT, kolom C<sub>18</sub> Phenomenex (5 µm C<sub>18</sub> 100 Å, LC Column 250 x 4.6 mm), rotary vacuum evaporator BUCHI R-210, UV-Spektrofotometer double beam Shimadzu seri UV-1800, timbangan analitik Scaltec SBC 22 (max 210g min 0,00001g), ayakan nomor mesh 40, hotplate stirrer, magnetic stirrer, micropipette Socorex 10 µL- 100 µL, 100 µL - 1000 µL, kertas membran, vacuum, botol fase gerak, ultrasonicator, Millipore membrane filter 0,45 µm dan alat alat gelas.

### **Bahan**

Bahan yang akan digunakan yaitu daun binahong dari Kecamatan Sleman, baku rutin hidrat (> 94%, Sigma), metanol (99,8%, MERCK), asetonitril (99,9%, MERCK), n-heksan (> 98%, MERCK), etanol 96% dan aquabidest yang diperoleh dari Laboratorium Kimia Analisis Instrumen Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.

### **Pembuatan Simplisia Daun Binahong**

Daun binahong yang telah dideterminasi dipisahkan dari pengotor dan dicuci dengan air mengalir. Daun kemudian dikeringkan dan ditata pada tampah serta ditutup menggunakan kain hitam selama proses pengeringan. Proses pengeringan dianggap selesai ketika daun mengeluarkan suara gemerisik dan mudah menjadi serpihan ketika diremas. Simplisia kemudian dipisahkan dari pengotor yang ada selama proses pengeringan. Simplisia ditimbang bobotnya kemudian dihaluskan dengan blender hingga lolos ayakan dengan nomor mesh 40. Serbuk simplisia yang sudah lolos ayakan, disimpan dalam tempat tertutup.

### **Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Binahong**

Ditimbang 30 g serbuk simplisia. Serbuk simplisia yang telah ditimbang ditambahkan 300 mL etanol 96%. Dilakukan ekstraksi dengan metode digesti. Hotplate diatur pada suhu 50°C dengan kecepatan putaran 200 rpm. Campuran serbuk simplisia dan etanol dipanaskan selama 90 menit sambil ditutup dengan aluminium foil. Hasil ekstraksi disaring menggunakan kertas saring. Ekstrak dipekatkan dengan rotary evaporator hingga tersisa 25% volume.

### **Preparasi Sampel**

Disiapkan sampel berupa ekstrak etanol daun binahong sebanyak 75 mL. Ekstrak ditambahkan 300 mL n-heksan. N-heksan dipisahkan menggunakan corong pisah dan diambil bagian etanolnya berdasarkan berat jenisnya. Ekstrak ditimbang untuk mengetahui bobotnya. Ditimbang 0,5 g ekstrak dan dimasukkan dalam labu takar 5mL. Ekstrak etanol ditambahkan metanol hingga tepat 5 mL. Hasil pengenceran ekstrak etanol disaring menggunakan membran filter Millipore berbahan polivinilidena fluorida dengan ukuran pori 0,45µm dan dimasukkan ke

dalam vial khusus KCKT. Ekstrak dalam vial dihilangkan kadungan udaranya menggunakan *ultrasonicator* selama 10 menit.

#### **Pembuatan Baku Rutin Hidrat**

Baku rutin ditimbang kurang lebih sebanyak 10 mg, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambah metanol hingga batas tanda.

#### **Optimasi Panjang Gelombang Maksimum**

Larutan baku yang telah dibuat diambil sebanyak 0,25; 0,5; dan 0,75 mL dan masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL serta ditambahkan metanol hingga batas tanda, sehingga didapatkan rutin dengan 3 konsentrasi berbeda (0,5 ppm; 1 ppm; dan 1,5 ppm). Ketiga konsentrasi tersebut *discan* di spektrofotometer UV *double beam* dari konsentrasi terendah pada rentang panjang gelombang 200-400 nm.

#### **Optimasi Komposisi Fase Gerak dan Laju Alir**

Komposisi fase gerak yang akan digunakan untuk optimasi ada 2 komposisi. Komposisi pertama terdiri dari metanol, asetonitril, dan akuabides dengan perbandingan 20 : 20 : 60, dengan laju alir yang dioptimasi adalah 0,6, 0,7, dan 0,8 mL/min. Komposisi kedua terdiri dari metanol, asetonitril, dan akuabides dengan perbandingan 30 : 10 : 60, dengan laju alir yang dioptimasi adalah 0,6, 0,7, dan 0,8 mL/min.

#### **Uji Kesesuaian Sistem**

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menginjeksikan baku rutin dengan 6 kali repetisi. Hasil replikasi tersebut dilihat berdasarkan parameter waktu retensi, resolusi, *tailing factor*, *theoretical plate* dan AUC. Parameter-parameter tersebut akan dihitung nilai standar deviasinya.

#### **Selektivitas**

Peneliti menggunakan 1 ml metanol yang disaring dengan milipore dan dimasukkan ke dalam vial KCKT. Larutan baku 10 ppm diambil sebanyak 500  $\mu$ L dimasukan ke dalam labu takar 5 ml dan ditambahkan metanol hingga tanda batas. Kemudian diambil 1 ml, disaring dengan milipore, dan dimasukkan dalam vial KCKT. Sampel 5x pengenceran diambil sebanyak 1 ml, disaring milipore, dan dimasukkan vial KCKT. Ketiga vial KCKT diawaudarakan selama 10 menit dan selanjutnya diinjeksikan dalam KCKT. Parameter ini didasarkan pada besarnya nilai resolusi yang didapat dari sampel senyawa rutin dalam ekstrak daun binahong. Puncak sampel dapat dibuktikan dengan membandingkan kesamaan dari waktu retensi baku rutin dengan sampel. Metode dapat dikatakan selektif jika memiliki nilai resolusi sampel  $\geq 1,5$  (AOAC, 2019).

#### **Kurva Baku (Linearitas)**

Kurva baku didapatkan dengan membuat 6 konsentrasi berbeda dari baku rutin. Konsentrasi dibuat bertingkat 1 ppm; 1,3 ppm; 1,6 ppm; 1,9 ppm; 2,2 ppm; dan 2,5 ppm. Masing-masing larutan disaring dengan menggunakan membran filter Millipore berbahan polivinilidena fluorida dengan ukuran pori 0.45 $\mu$ m, dan dimasukkan dalam vial KCKT. Keenam vial KCKT diawaudarakan selama 10 menit sebelum diinjeksikan ke dalam KCKT.

#### **LOD dan LOQ**

LOD dan LOQ dihitung berdasarkan data yang didapatkan dari kurva baku yang telah dibuat.

LOD didapatkan dengan rumus :

$$LOD = 3 S_B/y_B \quad (1)$$

LOQ didapatkan dengan rumus :

$$LOQ = 10 S_B/y_B \quad (2)$$

$$S_B = \sqrt{\frac{\sum(y - \bar{y})^2}{(n-2)}} \quad (3)$$

Keterangan :

$S_B$  = simpangan baku

$y_B$  = slope

### Akurasi dan Presisi

Akurasi presisi dilakukan secara *intra-day* dan *inter-day*. Preparasi baku rutin dilakukan dengan memilih 3 konsentrasi dari kurva baku (rendah, sedang, tinggi) yang telah didapatkan dan diperkirakan berdasarkan AUC yang didapatkan dari uji selektivitas dan kurva baku agar hasilnya nanti tidak mengalami ekstrapolasi. Konsentrasi baku yang digunakan yaitu 1 ppm untuk konsentrasi rendah; 1,6 ppm untuk konsentrasi sedang; dan 2,2 ppm untuk konsentrasi tinggi. Masing-masing konsentrasi baku dimasukkan dalam labu takar 5 ml, dan ditambahkan metanol hingga tanda batas. Kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan *n-heksan* sebanyak 10 ml. Corong pisah lalu digojok dan larutan akan memisah. Larutan baku yang berada di lapisan bawah diambil dan dimasukkan dalam erlenmeyer. Diambil 1 ml dari erlenmeyer untuk disaring dengan milipore dan dimasukkan dalam vial KCKT, kemudian diawaudarakan selama 10 menit. Setiap langkah ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali tiap konsentrasi dan dilakukan terus menerus selama tiga hari berturut-turut.

Akurasi didapatkan dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{perolehan kembali} = \frac{C_F}{C_A^*} \times 100\% \quad (4)$$

Keterangan:  $C_F$  = konsentrasi yang didapatkan dan  $C_A^*$  = konsentrasi seharusnya. Syarat %perolehan kembali mengikuti acuan AOAC.

Presisi didapatkan dengan menggunakan rumus:

$$\text{Koefisien variasi} = \frac{SD}{x} \times 100\% \quad (5)$$

Keterangan: SD = standar deviasi dan x = rata-rata. Syarat koefisien variasi mengikuti acuan AOAC.

### Penetapan Kadar Sampel

Kadar rutin dalam ekstrak etanol daun binahong dianalisis pada seperangkat alat KCKT dengan komposisi fase gerak metanol : asetonitril : air pada perbandingan 30 : 10 : 60 dengan laju alir 0,7 mL/ menit. Pengukuran kadar rutin pada ekstrak etanol daun binahong direplikasi sebanyak 6 kali untuk menentukan rerata dan simpangan dalam pengukuran kadar rutin dalam sampel.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Optimasi Panjang Gelombang Maksimum

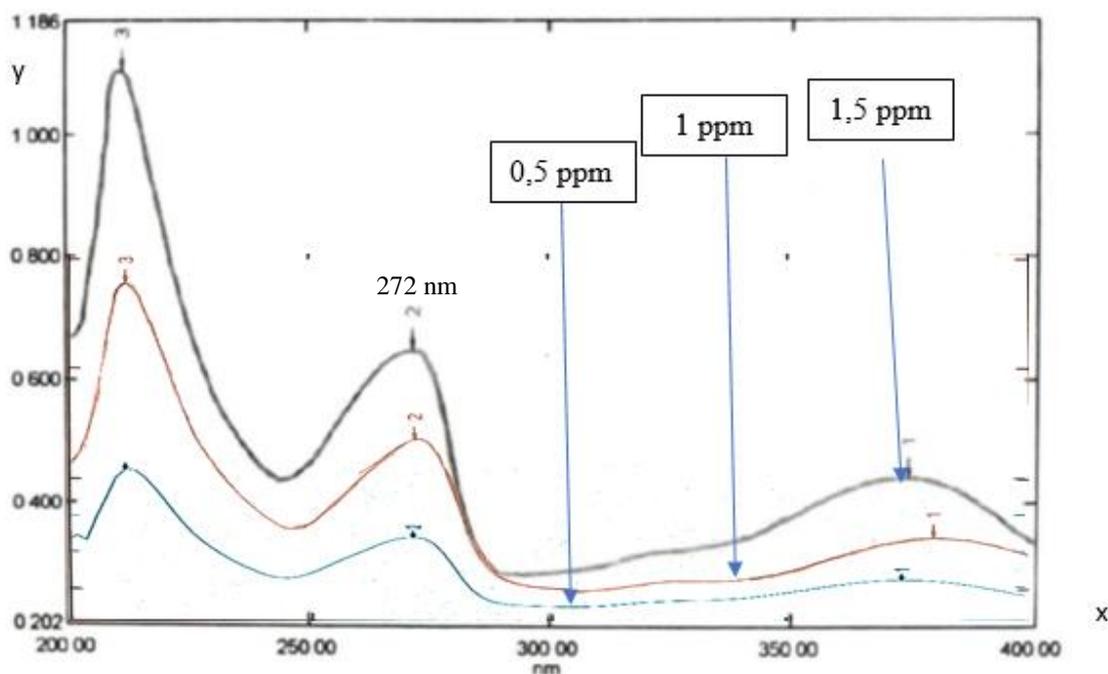
Tujuan dari optimasi panjang gelombang maksimum yaitu mengetahui panjang gelombang senyawa rutin yang memberikan respon berupa absorbansi yang maksimal. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan cara *scanning* larutan baku rutin yang dalam tiga konsentrasi berbeda (0,5 ppm, 1 ppm, dan 1,5 ppm) dengan rentang panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer UV *double beam*. Hasil yang diperoleh disajikan dalam Gambar 1.

Berdasarkan tabel dan hasil *scan* panjang gelombang tersebut, panjang gelombang maksimum yang digunakan adalah 272 nm. Panjang gelombang maksimum yang didapatkan dari hasil pengukuran sangat sesuai dengan hasil pengukuran panjang gelombang maksimum pada penelitian yang dilakukan oleh Seal tahun 2016, dengan panjang gelombang maksimum yang didapatkan dari penelitian tersebut sebesar 272 nm. Panjang gelombang tersebut bisa mengalami pergeseran akibat sifat dari pelarut yang digunakan. Pelarut yang digunakan adalah metanol yang memiliki sifat polar. Pelarut bersifat polar akan cenderung meningkatkan energi eksitasi molekul senyawa. Peningkatan energi tersebut berbanding terbalik dengan panjang gelombang, karena semakin besar energi yang diperlukan, maka panjang

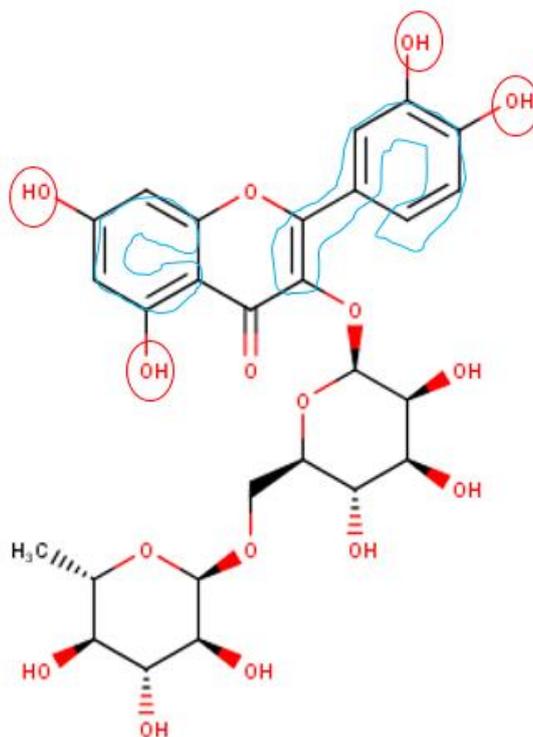
gelombang akan semakin pendek. Akibatnya, terjadi pergeseran panjang gelombang pada senyawa (Pavia *et al.*, 2015). Adapun panjang gelombang maksimum yang digunakan adalah 272 nm. Nilai absorbansi yang dihasilkan pada panjang gelombang tersebut memenuhi rentang nilai absorbansi yang ditetapkan, yaitu 0,2-0,8 (Gandjar & Rohman, 2015; Pavia *et al.*, 2015). Panjang gelombang sebesar 272 nm tersebut tetap dipilih walaupun ada absorbansi yang muncul pada 210 nm karena absorbansi pada 210 nm merupakan absorbansi yang dekat dengan *daerah cut off* metanol, dengan panjang gelombang sebesar 205 nm. Absorbansi senyawa yang dihasilkan pada daerah *cut off* bisa terpengaruh dengan absorbansi dari pelarut yang digunakan (Pavia *et al.*, 2015).

Alasan lain mengapa senyawa rutin bisa menghasilkan absorbansi pada

panjang gelombang maksimum sebesar 272 nm yaitu adanya gugus kromofor dan aoksokrom pada senyawa rutin dan berdasarkan dari penghitungan Woodward Fieser. Gugus kromofor adalah ikatan rangkap berselang-seling pada senyawa, sementara gugus aoksokrom adalah gugus yang berikatan dengan gugus kromofor dan membantu meningkatkan penyerapan cahaya. Gugus kromofor dan aoksokrom ditunjukkan dengan Gambar 2. Gugus kromofor inilah yang bertanggungjawab terhadap absorbansi yang dihasilkan. Semakin panjang gugus kromofor yang ada, maka semakin besar pula nilai panjang gelombang suatu senyawa (Pavia *et al.*, 2015). Nilai panjang gelombang ini juga dapat meningkat dengan adanya gugus aoksokrom. Hal ini tentu akan berpengaruh terhadap absorbansi yang dihasilkan.



**Gambar 1.** Spektra 3 Seri Konsentrasi Rutin pada Panjang Gelombang 200-400 nm  
keterangan : Sumbu x = panjang gelombang, sumbu y = absorbansi)



**Gambar 2.** Gugus Kromofor dan Auksokrom Pada Rutin  
 keterangan : — = gugus kromofor, — = gugus auksokrom

### Optimasi Fase Gerak

Optimasi fase gerak dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kondisi fase gerak yang bisa digunakan agar parameter dari kromatogram yang dihasilkan memenuhi kriteria penerimaan (Snyder *et al.*, 2009). Hasil optimasi tersebut digunakan untuk menentukan komposisi fase gerak dan laju alir yang optimal. Penentuan komposisi fase gerak

dan laju alir dilakukan dengan cara membandingkan hasil resolusi dan *tailing factor* yang didapat antara baku dengan sampel pada komposisi fase gerak, laju alir, serta waktu retensi yang sama dengan kriteria penerimaan. Hasil yang didapatkan pada optimasi fase gerak terhadap baku dan sampel dijelaskan dalam Tabel 2.

**Tabel 2.** Hasil Optimasi Kondisi Fase gerak

Komposisi	Laju alir (mL/min)	Objek	Waktu retensi (tR) (menit)	Resolusi (Rs)	Tailing factor (Tf)	Keterangan
Metanol : Asetonitril : Akuabides = 20 : 20 : 60	0,6	Baku	7,140	5,024	1,513	Tidak memenuhi kriteria
		Sampel	7,202	1,378	0	
	0,7	Baku	6,255	4,689	1,599	Tidak memenuhi kriteria
		Sampel	6,387	0,769	1,103	
0,8	Baku	5,551	3,023	1,691	Tidak memenuhi kriteria	
	Sampel	5,629	1,098	0		
Metanol : Asetonitril : Akuabides = 30 : 10 : 60	0,6	Baku	11,732	11,673	1,417	Tidak memenuhi kriteria
		Sampel	11,799	1,132	0	
	0,7	Baku	10,042	11,435	1,361	Memenuhi kriteria
		Sampel	9,978	1,676	1,076	
	0,8	Baku	8,879	11,179	1,496	Tidak memenuhi kriteria
		Sampel	8,831	0,969	1,0	

Ketika suatu senyawa yang dibawa fase gerak masuk ke dalam fase diam (kolom), maka ada perbedaan sifat antara senyawa dengan fase diam yang memiliki sifat lebih non polar dibandingkan dengan senyawa yang dibawa oleh fase gerak. Hal yang dapat dilakukan yaitu mengatur komposisi fase gerak agar tidak memiliki perbedaan polaritas yang besar dengan kolom, karena jika terjadi perbedaan polaritas yang besar antara kolom dan fase gerak, maka senyawa yang dibawa fase gerak akan tertahan lama di dalam kolom, sehingga senyawa akan keluar dari kolom dalam waktu yang lama dan waktu retensinya menjadi lebih lama (Snyder et al., 2009). Pada penelitian ini, fase gerak yang digunakan adalah metanol, asetonitril, dan akuabides. Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) merupakan senyawa golongan alkohol dan dapat berinteraksi hidrogen dengan gugus -OH yang banyak dimiliki oleh senyawa rutin (Pubchem, 2021a; Taraba & Szymczyk, 2020). Selain metanol, ada juga asetonitril yang dapat larut dalam air, dan juga akuabides yang memiliki sifat polar (Pubchem, 2021b). Di antara ketiga pelarut ini, akuabides memiliki rasio komposisi yang terbesar. Hal ini karena akuabides mampu melarutkan baku rutin dan sampel, apalagi baku rutin yang digunakan merupakan baku rutin hidrat. Rutin hidrat memiliki kemiripan struktur dengan rutin, hanya saja memiliki tambahan molekul air, dan struktur ini meningkatkan kelarutannya dalam air berdasar prinsip *like dissolves like* (Pubchem, 2021c). Pada suhu  $50^\circ\text{C}$  rutin memiliki kelarutan yang lebih tinggi pada etanol dibandingkan dengan air, metanol. 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, aseton dan etil asetat (Zi et al., 2007). Selain itu, karena rutin memiliki banyak gugus -OH, maka lebih mudah untuk berinteraksi hidrogen dengan akuabides. Akuabides juga memiliki

polaritas yang lebih tinggi dibandingkan metanol dan asetonitril, dengan nilai polaritas sebesar 10,2 (Snyder et al., 2009). Polaritas yang lebih tinggi ini diperlukan agar rutin tidak terlalu lama tertinggal dalam fase diam akibat sifat yang sama. Maka, rasio komposisi yang bisa diubah adalah rasio metanol dengan rasio asetonitril. Berdasarkan indeks polaritasnya, metanol memiliki polaritas sebesar 5,1 dan asetonitril memiliki polaritas sebesar 5,8. Ketika rasio metanol diperbanyak, otomatis polaritas dari fase gerak akan berkurang, sehingga perbedaan polaritas antara fase gerak dan fase diam juga berkurang dan rutin akan keluar lebih lama dari fase diam (Snyder et al., 2009). Hal ini telah dibuktikan pada penelitian ini dengan hasil berupa komposisi fase gerak yang memiliki rasio metanol : asetonitril : akuabides sebesar 30 : 10 : 60 memiliki waktu retensi yang lebih lama dibanding rasio metanol : asetonitril : akuabides sebesar 20 : 20 : 60.

### Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan tujuan mengetahui kemampuan sistem KCKT fase terbalik tersebut dalam memberikan hasil yang sama atau mendekati pada tiap injeksi yang diberikan (Bose, 2014). Uji kesesuaian sistem ini memberikan hasil berupa 6 kali repetisi injeksi baku rutin beserta parameter yang diperlukan (waktu retensi, AUC, resolusi, *tailing factor*, dan *theoretical plate*). Uji kesesuaian sistem ini dikatakan berhasil apabila parameter-parameter tersebut memenuhi kriteria yang ada, yaitu CV pada waktu retensi dan  $\text{AUC} \leq 1\%$  (untuk jumlah injeksi  $> 5$ ), resolusi  $> 1,5$ , *tailing factor*  $\leq 2$ , dan *theoretical plate* (N)  $> 2000$  (Snyder et al., 2009). Hasil uji kesesuaian sistem disajikan dalam Tabel 3.

**Tabel 3.** Hasil Uji Kesesuaian Sistem

Repetisi	Waktu retensi (tR) (menit)	Area (AUC)	Resolusi (Rs)	Tailing factor (Tf)	Theoretical plate (N)
1	9,42	41495	7,823	1,311	4429,427
2	9,464	42191	7,779	1,323	4320,184
3	9,462	40898	7,805	1,269	4333,446
4	9,464	41444	7,673	1,3	4279,154
5	9,465	41483	7,532	1,329	4291,446
6	9,495	41427	7,906	1,303	4236,384
Rerata	9,4617	41489,6667	7,753	1,3058	4315,0068
SD	0,0240	411,8309	0,1319	0,0212	65,5452
CV	0,25	0,99	1,70	1,63	1,52

Berdasarkan hasil di atas, maka semua parameter yang ada memenuhi kriteria, yaitu nilai  $CV \leq 1\%$  untuk parameter waktu retensi dan AUC, resolusi lebih dari 1,5, nilai *tailing factor* kurang dari 2 dan nilai N lebih dari 2000. Selain itu, jika dilihat dari CV yang dihasilkan semua parameter, maka semua parameter memenuhi kriteria dari USP pada tahun 2020, yaitu  $< 2\%$ . Parameter yang sudah memenuhi kriteria menunjukkan bahwa sistem KCKT fase terbalik ini bisa memberikan hasil yang sama atau mendekati.

### Selektivitas

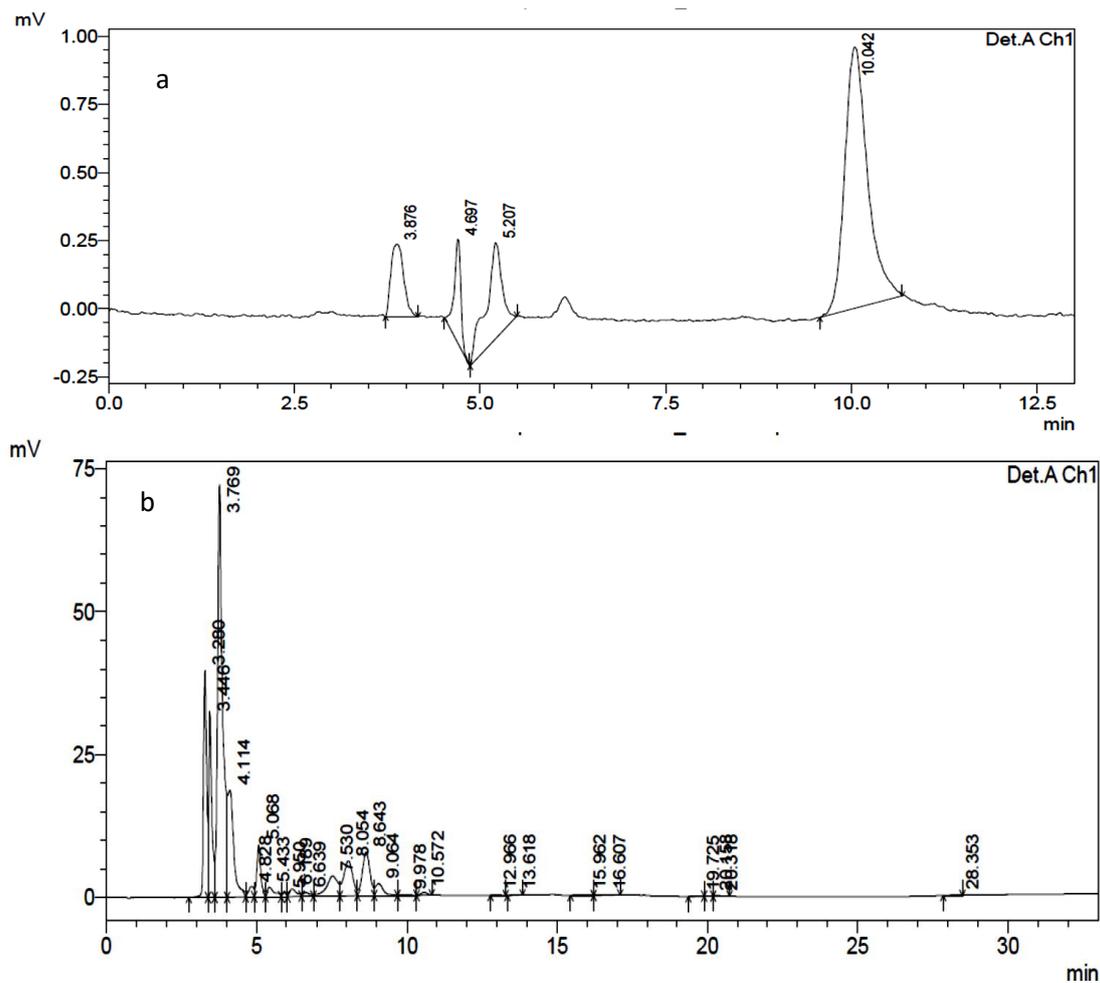
Selektivitas adalah salah satu faktor yang dapat mempengaruhi nilai resolusi yang dihasilkan oleh KCKT. Pemisahan dapat dikatakan selektif jika nilai  $R_s > 1,5$ . Semakin jauh jarak antara dua puncak yang bersebelahan menandakan semakin bagus pula sistem KCKT untuk memisahkan rutin dengan komponen lainnya.

Gambar 3a menunjukkan bahwa puncak rutin berada pada puncak keempat

pada kromatogram. Puncak rutin pada baku memiliki waktu retensi sebesar 10,042; *tailing factor* 1,361; dan resolusi 11,435. Pada Gambar 3b, dari kromatogram larutan sampel didapatkan puncak rutin pada waktu retensi yang mirip dengan waktu retensi baku rutin yaitu puncak ke-15 berdasarkan kromatogram. Puncak rutin pada larutan sampel memiliki area 2351, resolusi sebesar 1,676, dan *tailing factor* 1,076.

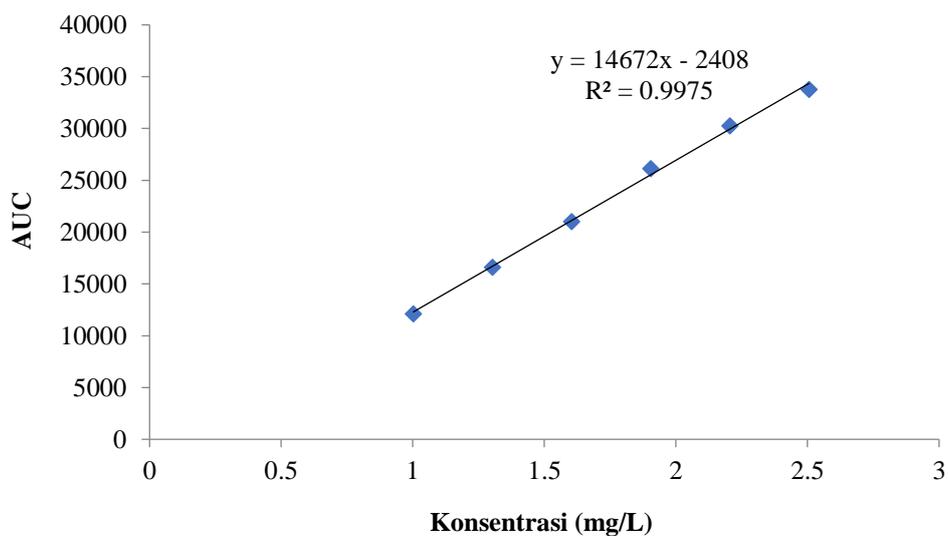
### Kurva Kalibrasi

Kurva baku (Gambar 4) didapatkan dengan melakukan perbandingan kenaikan konsentrasi baku dengan kenaikan AUC yang dihasilkan. Kurva baku yang didapatkan ini nantinya digunakan sebagai acuan dalam proses penetapan kadar. Kurva baku disebut juga area kerja (*intrapolasi*). Bila konsentrasi sampel terlalu tinggi dan AUC yang dihasilkan lebih dari area kerja (*ekstrapolasi*) akan mempengaruhi taraf kepercayaan dari hasil konsentrasi yang didapatkan. Berdasarkan data kurva baku didapatkan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9987.



**Gambar 3.** Uji Selektivitas

Keterangan: a. kromatogram larutan standar; b. kromatogram larutan sampel



**Gambar 4.** Kurva Kalibrasi

**Limit of Detection (LoD) dan Limit of Quantitation (LoQ)**

LOD adalah konsentrasi pada batas paling rendah untuk dapat dideteksi dan bukan untuk kuantifikasi kadar. Sedangkan LOQ adalah konsentrasi batas terendah analit yang dapat dikuantifikasi. LOD berdasarkan hasil penelitian didapatkan nilai batas deteksi sebesar 0,104 ppm. Sedangkan untuk LOQ didapatkan hasil sebesar 0,316 ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa batas konsentrasi yang dapat digunakan untuk analisis senyawa rutin secara kuantitas sebesar 0,316 ppm. Angka ini didapatkan dari data kurva baku replikasi 1 dengan nilai slope sebesar 14672; *intercept* sebesar -2408; dan nilai  $S_B$  sebesar 463,90. Setelah didapatkan nilai slope dan  $S_B$ , nilai tersebut dimasukkan ke dalam rumus LOD rumus 1 dan LOQ rumus 2 pada analisis hasil.

**Akurasi dan Presisi**

Akurasi suatu metode menunjukkan keakuratan atau kedekatan antara konsentrasi senyawa yang didapatkan dengan konsentrasi yang sebenarnya. Presisi menunjukkan bahwa metode tersebut mampu menghasilkan hasil yang sama secara berulang kali. Akurasi dan presisi (Tabel 4) pada penelitian ini dilakukan secara *intra-day* dan *inter-day*, pada 3 tingkat konsentrasi yaitu rendah, sedang, dan tinggi, dan pada masing-masing konsentrasi dilakukan replikasi sebanyak 3 kali dalam sehari. Nilai hasil

didapat dengan menggunakan larutan baku yang diperlakukan sama seperti perlakuan sampel yaitu dilakukan ekstraksi cair-cair dengan n-heksan. Data akurasi dan presisi dapat dilihat pada Tabel 4.

Data akurasi *inter-day* didapatkan nilai % perolehan kembali terendah diperoleh pada hari ketiga dan konsentrasi 1 ppm yaitu sebesar 88,59%, sedangkan nilai %perolehan kembali tertinggi diperoleh pada hari kedua dan konsentrasi 1 ppm. Data presisi *inter-day* didapatkan nilai Koefisien variasi (KV) tertinggi diperoleh sebesar 5,11%. Nilai % perolehan kembali dan %KV masih memenuhi syarat akurasi untuk konsentrasi baku yang berada pada rentang 1-2,5 ppm, dimana nilai %perolehan kembali berada pada rentang 80 – 115% dan %KV kurang dari 6% (AOAC, 2019).

**Penetapan Kadar Sampel**

Penetapan kadar rutin dalam ekstrak etanol daun binahong dilakukan dengan replikasi sebanyak enam kali untuk melihat presisi dari nilai hasil pengukuran. Kadar rutin dihitung menggunakan persamaan  $y = 14672x - 2408$ . Dengan x sebagai konsentrasi dan y sebagai *Area Under Curve* (AUC) dan nilai r sebesar 0,9975, didapatkan kadar rutin sebesar  $0,014 \pm 0,000704$  mg/g ekstrak dan nilai koefisien variasi sebesar 5,17%, dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 4.** Akurasi dan Presisi

Hari	% perolehan kembali	Koefisien Variasi (%)
1	90,97 – 100,64	1,77 – 5,11
2	95,46 - 104,47	0,78 – 2,69
3	88,69 - 98,78	$8,61 \times 10^{-5}$ - 4,33

**Tabel 5.** Hasil Penetapan Kadar

No Sampel	AUC	Konsentrasi (ppm)	Kadar (% b/b)	Rerata kadar	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)
1	16649	1,2989	0,013			
2	16815	1,3102	0,013			
3	18622	1,4333	0,014	0,014	7,04E-04	4,06
4	18644	1,4348	0,014			
5	18091	1,3972	0,014			
6	16418	1,2831	0,013			

**SIMPULAN DAN SARAN**

**Simpulan**

Dari hasil analisis yang telah dilakukan, penetapan kadar rutin dalam ekstrak etanol daun binahong dapat dilakukan menggunakan KCKT dengan kondisi fase gerak yang memiliki rasio metanol : asetonitril : akuabides sebesar 30 : 10 : 60 dengan flow rate 0,7 mL/ menit. didapatkan kadar rutin sebesar 0,014 ± 0,000704 mg/g ekstrak dan nilai koefisien variasi sebesar 5,17%.

**Saran**

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah memilih senyawa marker yang memiliki kadar lebih besar agar analisis lebih mudah dilakukan.

**DAFTAR PUSTAKA**

AOAC. (2019). Appendix K. In *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*, 8–9.

Bose, A. (2014). *HPLC Calibration Process Parameters in Terms of System Suitability Test*.

Chen, L.-Y., Huang, C.-N., Liao, C.-K., Chang, H.-M., Kuan, Y.-H., Tseng, T.-J., Yen, K.-J., Yang, K.-L., & Lin, H.-C. (2020). Effects of Rutin on Wound Healing in Hyperglycemic Rats. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(11), 1122. <https://doi.org/10.3390/antiox9111122>

DepKes RI. (2017). Farmakope Herbal Indonesia Edisi II. In *Kementrian*

*Kesehatan RI* (1<sup>st</sup> ed.). Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, Direktorat Obat Asli Indonesia.

Dwitiyanti D, D., Harahap, Y., Elya, B., & Bahtiar, A. (2019). Impact of Solvent on the Characteristics of Standardized Binahong Leaf (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). *Pharmacognosy Journal*, 11(6s), 1463–1470. <https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.226>

Farsi, E., Ahmad, M., Hor, S. Y., Ahamed, M. B. K., Yam, M. F., Asmawi, M. Z., & Khoo, B. Y. (2014). Standardized extract of *Ficus deltoidea* stimulates insulin secretion and blocks hepatic glucose production by regulating the expression of glucose-metabolic genes in streptozitocin-induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 220. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-220>

Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2015). *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar.

Ghorbani, A. (2017). Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.001>

Kintoko, K., Karimatulhadj, H., Elfasyari, T., Ihsan, E., Putra, T., Hariadi, P., Ariani, C., & Nurkhasanah, N. (2017). Effect of Diabetes Condition

- on Topical Treatment of Binahong Leaf Fraction in Wound Healing Process. *Majalah Obat Tradisional*, 22, 103. <https://doi.org/10.22146/tradmedj.27921>
- Mulia, K., Muhammad, F., & Krisanti, E. (2017). Extraction of vitexin from binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) leaves using betaine - 1,4 butanediol natural deep eutectic solvent (NADES). In *AIP Conference Proceedings*. Author(s). <https://doi.org/10.1063/1.4978091>
- Patel, K., & Patel, D. K. (2019). The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases* (pp. 457–479). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813820-5.00026-x>
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. (2015). *Introduction to Spectroscopy*. Stamford, CT : Cengage Learning.
- Pubchem. (2021a). *Methanol*. [www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)
- Pubchem. (2021b). *Acetonitrile*. [www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)
- Pubchem. (2021c). *Rutin Hidrate*. [www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)
- Rofida, S. (2010). Studi Etnobotani Dan Etnofarmakologi Umbi Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis). *Farmasains : Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kesehatan*, 1(1). <https://doi.org/10.22219/far.v1i1.429>
- Selawa, W., Runtuwene, M. R. J., & Citraningtyas, G. (2013). Kandungan Flavonoid Dan Kapasitas Antioksidan Total Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* ( Ten .) Steenis). *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(1), 18–22.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2009). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470508183>
- Taraba, A., & Szymczyk, K. (2020). Quercetin and rutin mixtures with alcohols: Spectroscopic and conductometric studies. *Journal of Molecular Structure*, 1203, 127464. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127464>
- Yuliana, D., Rahman, A., & Amatiria, G. (2020). Efektivitas Pemberian Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (tenore) steen) dan Povidone Iodine 10% terhadap Penyembuhan Luka Perineum. *Jurnal Ilmiah Keperawatan Sai Betik*, 15(2), 157. <https://doi.org/10.26630/jkep.v15i2.1849>
- Zi, J., Peng, B., & Yan, W. (2007). Solubilities of rutin in eight solvents at T=283.15, 298.15, 313.15, 323.15, and 333.15K. *Fluid Phase Equilibria*, 261(1–2), 111–114. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2007.07.030>