



Validasi Metode KLT-Densitometri untuk Analisis Kuersetin dalam Ekstrak dan Produk Jamu yang Mengandung Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.)

Bachtiar Rifai Pratita Ihsan, Putri Aulia Rahmani, Alvan Febrian Shalas

Departemen Kimia Farmasi Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

INFO ARTIKEL

Sejarah artikel:
Penerimaan naskah: 18 September 2019
Penerimaan naskah revisi: 13 November 2019
Disetujui untuk dipublikasikan: 31 Januari 2020

Kata kunci :

jambu biji, *Psidium guajava* L., kuersetin, KLT-Densitometri, validasi metode

ABSTRAK

Pasarobat tradisional di Indonesia semakin meningkat. Obat tradisional digunakan untuk mencegah penyakit maupun mengobati penyakit. Untuk menjamin efektivitas dan keamanannya, senyawa bioaktif di dalam ekstrak tanaman perlu dianalisa. Metode KLT-Densitometri yang sederhana, spesifik dan tingkat ketelitian yang tinggi telah dikembangkan dan dilakukan untuk analisis kadar kuersetin dalam ekstrak dan produk jamu kapsul daun jambu biji (*Psidium guajava* L.). Daun jambu biji diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 96%. Analisis kadar kuersetin dilakukan secara KLT-Densitometri menggunakan plat silika gel 60 F₂₅₄ sebagai fase diam dan campuran pelarut kloroform: etil asetat: asam format (5:4:1) sebagai fase gerak terpilih dengan panjang gelombang (λ) 366nm. Larutan standar kuersetin pada rentang 0,300-0,600 μg memberikan hubungan yang linier terhadap luas area densitogram dengan persamaan regresi $Y = 14.576,27X - 2.918,78$ dan $r = 0,9998$ serta $V_{xo} = 0,43\%$. Batas deteksi kuersetin adalah 1,954 $\mu\text{g/ml}$ dan batas kuantitasi kuersetin adalah 6,513 $\mu\text{g/ml}$. Persen recovery didapatkan antara 98,789% - 99,287% dengan persen deviasi standar relatif 0,177% - 0,315%. Kandungan senyawa kuersetin dalam ekstrak dan produk jamu kapsul daun jambu biji yaitu 1,46% dan 0,038%.

Validation Method of a TLC-Densitometry for Determination of Quercetin in Extract and Herbal Products of Leaves Guava (*Psidium guajava* L.)

Keywords:

guava leaves, *Psidium guajava* L., quercetin, TLC-Densitometry, validation method

ABSTRACT

The Herbal medicine market in Indonesia has increased significantly. Traditional medicines have used for preventive and curative. To ensure its effectivity and safety, a bioactive compound in plant extract had to be analyzed. Simple densitometry TLC, specificity, and high accuracy level had been developed and conducted to analyze the concentration of quercetin in extract and herbal capsule products of *Psidium guajava* L. The leaf of *Psidium guajava* extracted with maceration method which is using ethanol 96%. Analysis of quercetin levels in the TLC-densitometry performed using silica gel 60 F₂₅₄ plates as the stationary phase and solution chloroform: ethyl acetate: formic acid of 5: 4:1 respectively as mobile phase with the wavelength of 366nm. Standard solution of quercetin the range of 0,300-0,600 μg give linear relationship to the area densitogram with regression equation $Y = 14.576,27X - 2.918,78$; ($r = 0,9998$) and $V_{xo} = 0,43\%$. The detection limit of quercetin was 1,954 $\mu\text{g/ml}$ and the limit of quantitation of quercetin was 6,513 $\mu\text{g/ml}$. Recovery percentages were 98,79% - 99,28% with relative standard deviations were 0,177% - 0,315%. Quercetin in extracts and herbal capsule products of guava leaf were 1,46% and 0,038%.

1. Pendahuluan

Obat Tradisional merupakan bahan yang berasal dari tumbuhan, hewan dan mineral atau campuran dari bahan tersebut yang digunakan secara turun temurun untuk pengobatan¹. Obat tradisional telah banyak digunakan oleh masyarakat terutama 80% dari penduduk negara berkembang dan 65% penduduk negaramaju. Masyarakat menggunakan obat tradisional karena adanya kecenderungan pola hidup kembali ke alam. Selain itu obat tradisional diyakini tidak mempunyai efek samping, mudah didapatkan serta harga lebih murah dibandingkan obat sintetik².

Seiring dengan meningkatnya penggunaan obat tradisional di dunia, penelitian terkait dengan pengembangan obat tradisional pada sediaan jamu juga semakin meningkat³. Hal ini dikarenakan banyaknya komponen bioaktif fitokimia yang terkandung didalamnya terutama pada sediaan jamu. Beberapa industri obat tradisional besar yang memproduksi jamu, telah melakukan penelitian dan membuat jamu dalam bentuk sediaan farmasi dengan berbagai jenis produk dan kemasan yang menarik. Salah satunya adalah produk jamu dalam sediaan kapsul yang mengandung ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dimana dapat digunakan untuk pengobatan diare. Beberapa kandungan metabolit aktif di dalam ekstrak daun jambu biji adalah golongan fenolik, flavonoid, karetenoid, triterpene dan terpenoid. Senyawa Galaktosa spesifik yaitu senyawa lectin dapat mencegah adhesi mikoba *Escherichia coli* pada dinding usus sehingga mencegah kejadian infeksi pada gejala diare⁴.

Salah satu zat aktif kelas flavonoid yang memiliki khasiat dan banyak digunakan sebagai senyawa marker atau senyawa penanda analisis dalam sediaan obat tradisional yaitu kuersetin. Kuersetin sendiri memiliki aktivitas dalam mengatasi diare yaitu dapat mengistirahatkan otot usus halus dan menghambat kontraksi usus serta permeabilitas pembuluh darah abdomen⁴.

Menurut Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) produk jamu yang dipasarkan harus memenuhi beberapa kriteria diantaranya aman, berkhasiat dan memenuhi persyaratan mutu yang berlaku. Penentuan mutu untuk menjamin keamanan dan khasiat yang optimum tergantung pada senyawa bioaktif yang terkandung dalam produk jamu yang telah terbukti memiliki aktivitas fisiologis tertentu¹. Untuk memenuhi persyaratan mutu tersebut, maka perlu dilakukan standarisasi kandungan senyawa bioaktif dengan penetapan kadar kuersetin yang terdapat dalam ekstrak dan produk jamu kapsul daun jambu biji.

Menurut Farmakope Herbal Indonesia analisis kuersetin pada ekstrak daun jambu biji dapat ditentukan dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Beberapa penelitian sebelumnya telah melakukan analisis kuersetin diantaranya: analisis kuersetin pada *Punica granatum*,

Tamarindus indica dan *Prunus domestica* dengan metode HPTLC⁵

, analisis kuersetin di tanaman *Centella asiatica*⁶ dan metode HPTLC untuk penentuan kuantitatif kuersetin pada daun *Psidium guajava*⁷. Akan tetapi penelitian terkait analisis kuersetin dalam ekstrak dan produk jamu kapsul daun jambu biji dengan metode KLT-Densitometri jarang dilakukan.

KLT merupakan salah satu metode untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam suatu campuran pada lempeng KLT. Pemisahan terjadi karena adanya perbedaan afinitas dan interaksi senyawa terhadap fase diam dan fase gerak. Bercak yang muncul setelah dilakukan elusi dapat dianalisis kualitatif sehingga didapatkan nilai Rf (*retardation factor*). Selain itu, secara kuantitatif metode ini juga dapat menentukan kadar senyawa yang terdapat pada lempeng KLT, nilai RSD (*relative standard deviation*), dan *recovery* yang menggambarkan akurasi dan presisi⁸. Beberapa kelebihan dari metode KLT-Densitometri yaitu sederhana, spesifisitas dan tingkat ketelitian yang tinggi, waktu pengerjaan relatif cepat serta biaya relatif murah⁹.

Dalam analisis kuersetin pada ekstrak dan produk jamu kapsul daun jambu biji dengan metode KLT-Densitometri harus memenuhi syarat pengujian validasi. Validasi digunakan untuk mengetahui dan membuktikan metode analisis yang dipakai dapat menghasilkan data yang valid. Pengujian validasi dilakukan dengan beberapa parameter diantaranya selektifitas, linieritas, akurasi, presisi, batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK)¹⁰.

Berdasarkan uraian diatas, akan dilakukan penelitian terkait validasi metode KLT-Densitometri untuk analisis kuersetin dalam ekstrak dan produk jamu kapsul daun jambu biji. Penelitian yang akan dilakukan yaitu optimasi fase gerak dan panjang gelombang, untuk mendapatkan metode yang valid dilakukan validasi metode dan dilanjutkan dengan analisis kadar kuersetin pada ekstrak dan produk jamu untuk mengetahui kadar kandungan senyawa bioaktif (kuersetin) yang terdapat dalam ekstrak dan produk jamu yang mengandung daun jambu biji.

2. Metode

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ekstrak kental daun jambu biji yang telah diekstraksi dengan pelarut etanol 96%, simplisia serbuk diperoleh dari Balai Materia Medica Batu Malang Jawa Timur Produk kapsul yang mengandung ekstrak daun jambu biji, kuersetin standar (Sigma Aldrich), metanol (Merck), asam format (Merck), aseton (Merck), kloroform (Merck) dan etil asetat (Merck)

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitis (Shimadzu AUW 220), strirrer IKA®, rotary evaporator IKA®, oven MEMMERT™, kulkas TOSHIBA MEZ65529754, chamber CAMAG™, UV Lamp

CAMAG™, Densitometer CAMAG™, Automatic TLC Sampler 4 CAMAG™, micropipette SOCOREX™, Plat KLT (Silika gel F₂₅₄).

Preparasi Sampel

Maserasi daun jambu biji

Pembuatan ekstrak daun jambu biji dilakukan dengan metode maserasi. Proses maserasi disertai dengan pengadukan menggunakan stirer untuk mempercepat proses pembasahan simplisia dengan pelarut. Simplisia serbuk daun jambu biji sebanyak 150 gram diekstraksi menggunakan 500 ml pelarut etanol 96%. Ekstraksi dilakukan selama 3x24 jam dengan pengadukan awal menggunakan stirrer selama 30 menit. Hasil maserasi kemudian diuapkan pada suhu 40°C menggunakan *rotary evaporator* dengan tekanan rendah. Kemudian dimasukkan ke dalam oven hingga didapatkan ekstrak dan dihitung nilai rendemen.

Preparasi sampel larutan ekstrak daun jambu biji

Ekstrak daun jambu biji sebanyak 100 mg ditimbang dengan neraca analitik, kemudian dilarutkan dengan etanol 96% dan diencerkan sampai 10 ml pada labu takar. Larutan tersebut disaring dan didapatkan larutan ekstrak daun jambu biji.

Preparasi sampel larutan produk jamu

Jamu ditimbang sebanyak 1000 mg ditimbang dengan neraca analitik, kemudian dilarutkan dengan etanol 96% dan diencerkan sampai 10 ml pada labu takar. Larutan tersebut disaring dan didapatkan larutan jamu.

Optimasi metode

Pemilihan fase gerak

Optimasi metode dilakukan dengan pemilihan fase gerak dan penentuan panjang gelombang maksimum. Fase gerak yang digunakan pada pemilihan fase gerak ada tiga yaitu fase gerak A (kloroform: aseton: asam format 10:2:1), fase gerak B (kloroform: aseton: metanol: asam format 28:9:2:1), dan fase gerak C (kloroform: etil asetat: asam format 5:4:1) dengan fase diam plat silika gel F₂₅₄. Masing-masing fase gerak disiapkan sebanyak 10 ml dan didiamkan selama ± 1 jam. Kemudian larutan standar, ekstrak dan jamu ditotolkan pada plat silika gel F₂₅₄ masing-masing sebanyak 2 µl, 2 µl dan 8 µl. Plat dieluasi dengan ketiga fase gerak sampai tanda batas. Kemudian diamati dibawah sinar UV 254nm dan 366nm serta dengan menggunakan densitometer pada panjang gelombang yang ditentukan. Lalu dihitung nilai faktor retardasi (Rf) dan resolusi (Rs).

Penentuan panjang gelombang

Noda yang diperoleh dari fase gerak terpilih diamati spektrumnya dengan densitometer pada rentang panjang gelombang 200-400nm. Panjang gelombang terpilih adalah panjang gelombang yang memberikan puncak paling tinggi.

Validasi Metode

Selektifitas

Noda yang diperoleh dari fase gerak terpilih dihitung nilai faktor retardasi (Rf), derajat keterpisahan (Rs) dan panjang gelombang maksimum (λ).

Linieritas

Larutan standar dibuat dengan konsentrasi 0,100; 0,125; 0,150; 0,175 dan 0,200 µg/µl. Larutan standar masing-masing ditotolkan pada plat KLT silika gel F₂₅₄ sebanyak 3 µl dan dieluasi dengan fase gerak terpilih. Kemudian diamati noda yang diperoleh dengan densitometer dan dihitung nilai persamaan regresinya $y = bx + a$, koefisien korelasi (r) dan koefisien variasi fungsi (Vxo).

Batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK)

Batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung menggunakan metode simpangan baku residual dari kurva baku sehingga didapatkan nilai LOD dan LOQ dari kuersetin. Rumus LOD dan LOQ sebagai berikut :

$$\text{LOD} = 3 \times \frac{S_y}{\text{Slope}} \text{ dan } \text{LOQ} = 10 \times \frac{S_y}{\text{Slope}}$$

Penentuan akurasi dan presisi

Pengujian akurasi dan presisi diluji dengan mengukur kadar kuersetin standar dengan 3 konsentrasi level berbeda yaitu 80, 100 dan 120% dengan replikasi masing-masing konsentrasi sebanyak tiga kali. konsentrasi larutan standar kuersetin masing-masing yang dibuat adalah 120; 150; dan 200 ppm. Dilakukan tiga kali replikasi dari tiga konsentrasi lalu ditotolkan masing-masing sebanyak 3 µl pada plat KLT silika gel F₂₅₄ dan dieluasi dengan fase gerak terpilih. Noda yang diperoleh diamati dengan densitometer dan dihitung persentase perolehan kembali (*recovery*) serta persentase standar deviasi relatif (RSD)

Penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak dan produk jamu kapsul daun jambu biji

Ekstrak dan produk jamu ditimbang masing-masing sebanyak 100 mg dan 1000 mg. Kemudian masing-masing dilarutkan dengan etanol 96% sampai 10 ml pada labu standar. Fase gerak terpilih disiapkan dan dieluasi selama ± 1 jam. Dilakukan tiga kali replikasi kemudian ditotolkan

larutan ekstrak dan jamu pada plat KLT silika gel F₂₅₄ masing-masing sebanyak 3 µl dan 8 µl lalu dieluasi dengan fase gerak terpilih. Noda yang diperoleh diamati dengan densitometri dan dihitung kadar kuersetin yang terdapat dalam kedua sampel.

3. Hasil dan Diskusi

Ekstraksi Daun Jambu Biji

Pembuatan ekstrak daun jambu biji dilakukan dengan metode maserasi. Ekstraksi dilakukan dengan perendaman selama selama 72 jam menggunakan pelarut etanol 96%. Setelah dilakukan proses maserasi didapatkan hasil ekstraksi daun jambu biji. Hasil ekstraksi daun jambu biji ditunjukkan pada tabel 1 dan gambar 1.

Tabel 1. Hasil ekstraksi daun jambu biji

Ekstrak	BeratSimp lisaSerbuk	BeratHasil Ekstraksi	Rendemen	Warna
Etanol 96%	150,0 gram	54.76 gram	36.51%	Coklatke hitaman



Gambar 1. Hasil Ekstraksi daun jambu biji

Pembuatan ekstrak daun jambu biji dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi cara dingin untuk menyari senyawa metabolit sekunder dengan optimal yang terdapat dalam simplisia serbuk daun jambu biji. Proses yang terjadi pada maserasi yaitu, pemecahan pada membran sel serta dinding sel. Hal ini terjadi akibat perbedaan konsentrasi antara di luar dan didalam sel tanaman. Kemudian metabolit sekunder yang terdapat dalam sel terlarut pada pelarut etanol 96% atau terjadi proses difusi. Hal ini terjadi terus menerus hingga dicapai keseimbangan konsentrasi¹¹

Semakin lama waktu perendaman maka semakin lama waktu kontak antara simplisia dengan pelarut. Hal ini dikarenakan tanaman yang diekstrak dengan pelarut memiliki kesempatan bereaksi yang lebih lama sehingga pelarut dapat berpenetrasi lebih ke dalam sel dan menghasilkan senyawa-senyawa yang berdifusi keluar sel lebih banyak. Luas permukaan simplisia yang digunakan juga merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi rendemen. Semakin kecil ukuran partikel yang digunakan akan mempengaruhi luas permukaan kontak antara simplisia dengan pelarut¹¹.

Optimasi Metode

Pemilihan fase gerak

Pada penentuan fase gerak dilakukan dengan cara

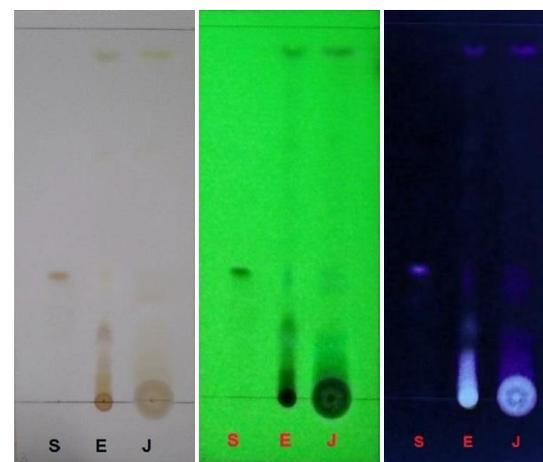
menotolkan larutan standar kuersetin serta sampel ekstrak dan produk jamu yang mengandung daun jambu biji pada plat KLT silika gel F₂₅₄, kemudian dieluasi dengan menggunakan beberapa macam fase gerak.

Pada penelitian ini digunakan tiga macam fase gerak yaitu fase gerak A (kloroform: aseton: asam format 10:2:1) (Farmakope herbal Indonesia, 2008); fase gerak B (kloroform: aseton: metanol: asam format 28:9:2:1) dan fase gerak C (kloroform: etil asetat: asam format 5:4:1). Hasil nilai R_f dan R_s ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengamatan nilai R_f dan R_s beberapa fase gerak

Fase gerak	Perbandingan	R _f	R _s ekstrak	R _s Jamu
A (kloroform: aseton: asam format)	10:2:1	0,32	0,800 0,833	1,286 1,385
B (kloroform: aseton: metanol: asam format)	28:9:2:1	0,42	1,167 0,900	1,294 1,231
C (kloroform: etil asetat: asam format)	5:4:1	0,50	1,571 1,600	1,625 1,571

Fase gerak pertama yang digunakan untuk identifikasi kuersetin yaitu fase gerak A (kloroform : aseton : asam format 10:2:1). Pada ekstrak dan produk jamu yang mengandung daun jambu biji terlihat noda yang sejajar dengan standar baik secara pengamatan visual maupun dengan sinar UV λ 254nm dan 366nm. Nilai R_f yang diperoleh yaitu 0,32 dengan R_s sebesar 0,80 dan 0,833 pada ekstrak serta 1,286 dan 1,385 pada produk jamu. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Gambar 3.



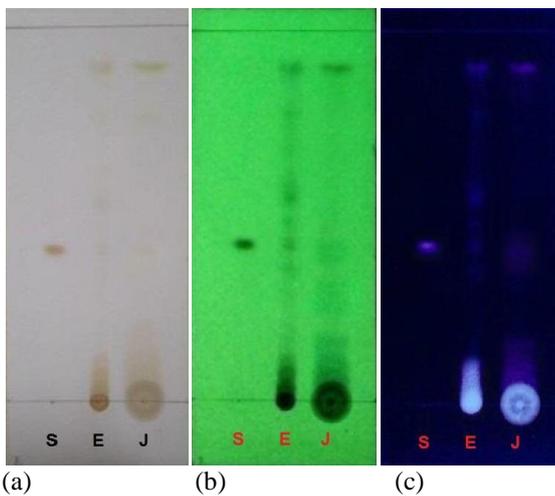
(a) (b) (c)
Keterangan:

(S) Standar kuersetin, (E) ekstrak jambu biji, (J) produk jamu

Gambar 3. Profil KLT identifikasi kuersetin pada ekstrak dan produk jamu kapsul daun jambu biji

Fase diam : Silika gel F254. Fase gerak : kloroform : aseton : asam format (10:2:1). Diamati dengan (a) secara visual, (b) UV 254nm, (c) UV 366nm

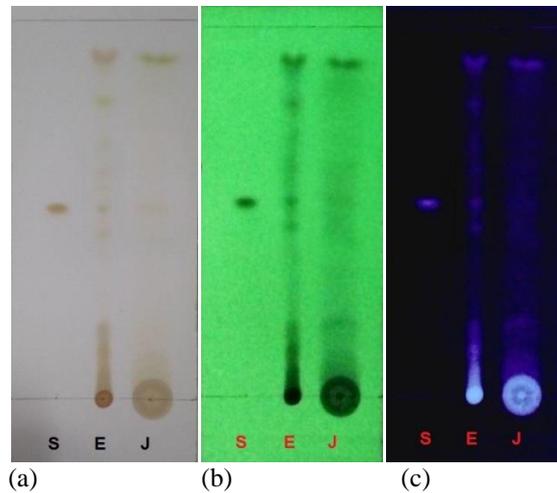
Hasil identifikasi kuersetin menggunakan fase gerak B (kloroform : aseton : metanol : asam format 28:9:2:1) dapat dilihat pada Gambar 4. Noda yang muncul pada ekstrak dan produk jamu sejajar dengan standar baik secara pengamatan visual maupun dengan sinar UV 254 dan 366nm. Nilai Rf yang diperoleh yaitu 0,42 dengan Rs sebesar 1,167 dan 0,90 pada ekstrak serta 1,294 dan 1,231 pada produk jamu.



Keterangan:

(S) Standar kuersetin, (E) ekstrak jambu biji, (J) produk jamu

Gambar 4. Profil KLT identifikasi kuersetin pada ekstrak dan produk jamu kapsul daun jambu biji. Fase diam : Silika gel F254. Fase gerak : kloroform : aseton : metanol : asam format (28:9:2:1). Diamati dengan (a) secara visual, (b) UV 254nm, (c) UV 366nm. Identifikasi kuersetin menggunakan fase gerak C (kloroform: etil asetat: asam format 5:4:1) didapatkan noda pada ekstrak dan produk jamu yang sejajar dengan standar, baik secara pengamatan visual maupun dengan sinar UV 254 dan 366nm. Nilai Rf yang diperoleh yaitu 0,50 dengan Rs sebesar 1,571 dan 1,60 pada ekstrak serta 1,625 dan 1,571 pada produk jamu. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Gambar 5.



Keterangan:

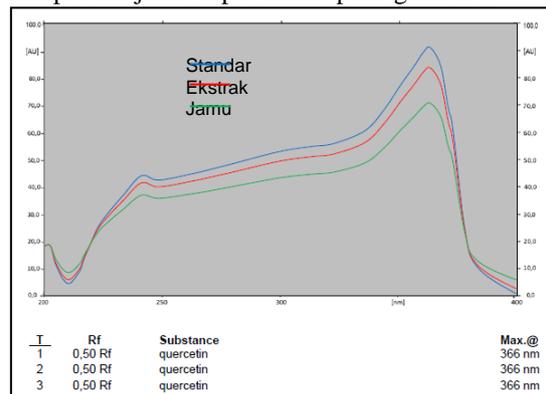
(S) Standar kuersetin, (E) ekstrak jambu biji, (J) produk jamu

Gambar 5. Profil KLT identifikasi kuersetin pada ekstrak dan produk jamu kapsul daun jambu biji. Fase diam : Silika gel F254. Fase gerak : kloroform: etil asetat: asam format (5:4:1). Diamati dengan (a) secara visual, (b) UV 254nm, (c) UV 366nm.

Dari gambar terlihat bahwa fase gerak C (kloroform: etil asetat: asam format 5:4:1) memberikan hasil yang lebih baik dari pada 2 fase gerak lainnya dengan nilai Rf = 0,50; Rs sebesar 1,571 dan 1,60 pada ekstrak serta 1,625 dan 1,571 pada produk jamu, dimana persyaratan untuk Rf = 0,2-0,8 dan Rs >1,5^{12,13}. Oleh karena itu, pada pengerjaan berikutnya digunakan fase gerak kloroform: etil asetat: asam format (5:4:1).

Penentuan panjang gelombang terpilih

Penentuan panjang gelombang (λ) maksimum kuersetin pada standar, ekstrak dan produk jamu dilakukan pada rentang panjang gelombang (λ) 200-400nm. Hasil pengamatan spektrum absorban standar kuersetin, ekstrak dan produk jamu dapat dilihat pada gambar 6



Gambar 6. Spektrum absorban standar kuersetin, ekstrak dan produk jamu yang mengandung daun jambu biji.

Berdasarkan spektrum absorban kuersetin dengan

perbandingan panjang gelombang (x) dan luas area (y), standar kuersetin, ekstrak dan produk jamu yang mengandung daun jambu biji memberikan puncak absorbansi yang sama yaitu pada panjang gelombang 366nm. Maka panjang gelombang maksimum yang digunakan adalah 366nm. Panjang gelombang terpilih ini sesuai dengan penelitian analisis kuersetin pada *Centella asiatica*⁶.

Validasi Metode

Selektifitas

Berdasarkan hasil identifikasi kuersetin dalam ekstrak dan produk jamu yang mengandung daun jambu biji menggunakan silika gel F₂₅₄ sebagai fase diam dan kloroform: etil asetat: asam format (5:4:1) sebagai fase gerak terpilih dengan panjang gelombang terpilih 366nm, didapatkan nilai R_f = 0,50; R_s ekstrak yaitu 1,571 dan 1,60 serta R_s produk jamu sebesar 1,625 dan 1,571, dimana persyaratan untuk R_f = 0,2-0,8 dan R_s >1,5^{12,13}

Linieritas

Linieritas dilakukan dengan membuat lima macam konsentrasi dari larutan baku induk 200 ppm (0.200 µg/µl) yaitu 0,100; 0,125; 0,150; 0,175 dan 0,200 µg/µl. Masing-masing larutan ditotolkan sebanyak 3,0 µl pada plat KLT silika gel F₂₅₄ dan dieluasi dengan fase gerak terpilih. Noda yang diperoleh diamati dengan densitometer. Penentuan linieritas dilakukan dengan menghitung perbandingan area kuersetin terhadap jumlah kuersetin yang diukur pada panjang gelombang 366nm. Hasil penentuan linieritas ini dapat dilihat pada tabel 3.

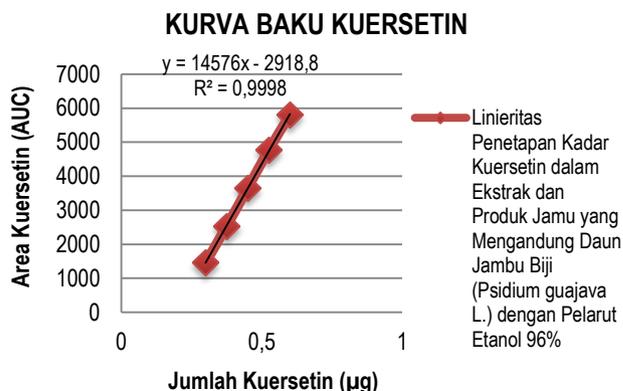
Tabel 3. Hasil pengamatan linieritas kuersetin

Konsentrasi (µg/µl)	Jumlah Kuersetin (µg)	Luas Area (AUC)
0,100	0,300	1.456,60
0,125	0,375	2.527,00
0,150	0,450	3.648,00
0,175	0,525	4.769,80
0,200	0,600	5.801,30

Persamaan regresi $Y = 14.576,27X - 2.918,78$
 $R = 0,9998$

Koefisien variasi fungsi (V_{x0}) = 0,43%

Nilai V_{x0} yang didapatkan <5% menunjukkan adanya hubungan yang linier antara jumlah kuersetin terhadap luas area kuersetin^{12,13}



Gambar 7. Kurva baku kuersetin hubungan antara konsentrasi kuersetin (µg/µl) terhadap area kuersetin

Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung melalui persamaan regresi linieritas standar kuersetin. Nilai LOD dan LOQ kuersetin yang didapat adalah 1,954 µg/ml dan 6,513 µg/ml.

Akurasi dan Presisi

Penentuan akurasi dan presisi dilakukan dengan menganalisis 3 konsentrasi standar kuersetin 80%, 100% dan 120% masing-masing replikasi 3 kali untuk dihitung % recoverynya dan %RSDnya. Hasil Akurasi dan presisi ditunjukkan pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Akurasi dan Presisi

Level konsentrasi	Jumlah (µg)	X (µg)	% recovery	Rata-rata % recovery	% RSD
80%	0,360	0,356	99,042	98,79	0,279
	0,360	0,354	98,494		
	0,360	0,355	98,831		
100%	0,450	0,447	99,440	99,29	0,177
	0,450	0,445	99,095		
	0,450	0,446	99,327		
120%	0,540	0,536	99,287	99,20	0,315
	0,540	0,534	98,859		
	0,540	0,537	99,467		

Uji akurasi pada standar kuersetin dengan konsentrasi 80, 100 dan 120% memenuhi persyaratan %recovery yaitu 98,79%, 99,29% dan 99,20%, dimana persyaratan untuk %recovery adalah 80-120%^{12,13}.

Uji presisi pada standar kuersetin dengan konsentrasi 80, 100 dan 120% menunjukkan %RSD yaitu 0,279%, 0,177% dan 0,315%, dimana persyaratan untuk %RSD adalah <2%. Hasil uji presisi standar kuersetin memenuhi

persyaratan validasi^{12,13}

Penetapan Kadar Ekstrak Jambu Biji

Penetapan jumlah kuersetin dalam ekstrak daun jambu biji dilakukan dengan menyiapkan 100 mg ekstrak dalam 10 ml etanol 96%, ditotolkan sebanyak 3 µl dan dieluasi dengan fase gerak. Area yang diperoleh dimasukkan ke persamaan kurva baku dan dihitung kadar kuersetin yang terdapat dalam ekstrak daun jambu biji

Tabel 5. Analisis Kadar Kuersetin Dalam Ekstrak Daun Jambu Biji

Penimbangan (mg)	Luas Area (AUC)	Jumlah(µ g)	Kadar (ppm)	%b/b
100	3.427,80	0,4354	145,13	1,45
100	3.544,20	0,4434	147,79	1,48
100	3.372,80	0,4316	143,87	1,44
Rata-rata (%)				1,46

Tabel 5 menunjukkan hasil analisis kadar kuersetin dalam ekstrak daun jambu biji. Berdasarkan hasil penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak daun jambu biji, didapatkan kadar kuersetin rata-rata dalam ekstrak daun jambu biji yaitu 1,46%.

Produk Jamu

Penetapan jumlah kuersetin dalam produk jamu yang mengandung daun jambu biji dilakukan dengan menyiapkan 1000 mg ekstrak dalam 10 ml etanol 96%, ditotolkan sebanyak 8 µl dan dieluasi dengan fase gerak. Area yang diperoleh dimasukkan ke persamaan linier dan dihitung kadar kuersetin yang terdapat dalam produk jamu.

Tabel 6. Penetapan Kadar Kuersetin Dalam Produk Jamu

Penimbangan (mg)	Luas Area (AUC)	Jumlah(µ g)	Kadar (ppm)	%b/b
1000	1.508,20	0,3037	37,96	0,038
1000	1.491,60	0,3026	37,82	0,038
1000	1.469,30	0,3010	37,63	0,038
Rata-rata (%)				0,038

Kadar kuersetin rata-rata yang terdapat dalam produk jamu kapsul daun jambu biji yaitu 0,038%.

Hasil validasi metode analisis kuersetin yang dilakukan memenuhi persyaratan yang ditetapkan oleh AOAC yaitu parameter selektivitas, linieritas, akurasi dan presisi¹². Validasi metode merupakan tahap awal untuk menjamin hasil analisis valid dan dapat dipercaya¹⁰. Hasil pengembangan metode ini dapat dibandingkan dengan penelitian lain analisis kuersetin pada berbagai macam jenis sampel tanaman yang berbeda pada beberapa penelitian dimana dalam pengembangan analisis KLT memerlukan pertimbangan fase diam yang digunakan, kombinasi fase gerak, jumlah totalan larutan uji, panjang

gelombang analisis.⁵⁻⁹

Metode KLT ini dapat menjadi alternative metode analisis kuersetin dalam ekstrak jambu biji dan jamu yang mengandung ekstrak jambu biji dimana metode ini selektif, sederhana, dan cepat dimana dapat menunjang pengembangan produk obat tradisional yang semakin meningkat³.

Terima kasih kami sampaikan kepada Balai Materia Medica Batu Malang Jawa Timur atas penyediaan simplisia daun jambu biji, bahan standar kuersetin dan penggunaan instrumen KLT Densitometer

4. Daftar Pustaka

1. BPOM. 2014. *Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional*. Jakarta: Depkes RI
2. World Health Organization, 2005. *National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines*, (Online), (<http://www.who.int/medicine/s/areas/traditional/definitions/en/>), diakses 7 juni 2017
3. Elfahmi, Woerdenbag, H. J., Kayser, O., 2014. *Jamu : Indonesia traditional herbal medicine towards rational phytopharmacological use*. *Journal of Herbal Medicine* 4, pp.51-73
4. Guitierrez, R. M. P., Mitchell, S., Solis, R. V., 2008. *Psidiumguajava : A review of Its Traditional uses, phytochemistry and pharmacology*. *Journal of Ethnopharmacology* 117, pp. 1-27
5. Amir, M., Mujeeb, M., Ahmad, S., Akhtar, M., Ashraf, K., 2013. *Design expert-supported development and validation of HPTLC method : An application in simultaneous estimation of Quercetin and rutin in Punicagranatum, Tamarindusindica and Prunusdomestica*, *Pharmaceutical methods* 4, pp 62-67
6. Joshi, C., Saval, J., Varghese, A., Pandita, N., 2012. *Development and Validation of HPTLC Method for Simultaneous Determination of Quercetin and kaempferol in Leaves of Two Chemotypes of Centellaasiatica*, *Journal of Planar Chromatography*, pp 433-438.
7. Bindu, A.R., Remya, K., Aleykutty, N. A., Sajan, J. 2010. *High Performance Thin Layer Chromatographic Method for Quantitative Determination of Quercetin in Tender Leaves of Psidiumguajava*. *Pharmacognosy Journal*. Vol 2 (17) : 21-23.
8. Tatiya A.U., Ratil, R. P., Sutar, M. P.,

- Shirkhedkar, A. A., Surana, S. J., 2011. Determination of Phyllanthin and Gallic Acid in Herbal Hepatoprotective Formulation By TLC-Densitometry Analysis. *Pharmacognosy Journal*, Vol.3., Issue 26, pp. 39-43.
9. Ihsan, B. R. P., Darmawati, A., Soerjono, J., 2010. Analysis of Saccharine as Sweetener agents in labeled Soft Drink using TLC Densitometry Method. *Majalah Farmasi Airlangga* Vol.9 Hal. 7
 10. Ihsan, B. R. P., Nurhayati, P. I., Maysaroh, I., 2018. Validasi Metode Ultra High Performance Chromatography Double Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS) untuk Analisis Kurkurmin pada Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma Longa*) dengan Berbagai Perbandingan. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, Volume 4 No.1, Hal 29-34.
 11. Azwanida, N. N., 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation, Medicinal & Aromatic Plants, Volume 4 Issue 3, pp.1-6.
 12. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2013. *Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals*. Association of Official Analytical. Washington DC
 13. Fried, B. and Sherma, J., 1994. *Thin Layer Chromatography, Techniques and Applications*. 3rd edition, revised and expanded, New York: Marcel Dekker, Inc.