




Open access article

VALIDASI PENETAPAN KADAR KUERSETIN EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI (*Ocimum sanctum* L.) SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

Validation of Determination of Quercetin Content of Ethanol Extract of Basil Leaves (*Ocimum sanctum* L) by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Penulis / Author (s)

Evi Kurniawati¹  ¹ Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri, Indonesia

Tri Puji Lestari¹ 

Esti Ambar Widyaningrum¹

Penulis Koresponden : Evi Kurniawati 

e-mail korespondensi: evi.kurniawati@iik.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.32382/mf.v20i1.458>

ARTICLE INFO

ABSTRACT / ABSTRAK

Keywords:

Basil leaves

Quercetin

HPLC

Validation of Methode

Kata Kunci:

Daun kemangi

Kuersetin

KCKT

Validasi metode

One of the Indonesian plants that has medicinal properties is the basil plant (*Ocimum sanctum* L). There are several active substances contained in basil leaves, such as the flavonoid compound quercetin, which is known to be found in basil. Quercetin has several very useful biological activities such as antibacterial, anticancer, antiviral, and anti-inflammatory. Determination of quercetin content in basil leaves requires a valid method. The selection of an analytical method that has good specificity, linearity, accuracy and precision is a very important aspect in order to obtain acceptable results. The aim of this research is to validate the determination of quercetin levels contained in the ethanol extract of basil leaves (*Ocimum sanctum* L) using high-performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC system used is the Shimadzu DGU-20A5R type with a Uv-Vis detector at a wavelength of 374 nm. The stationary phase used was a C18 column with a mobile phase of a mixture of methanol: aqua bi destillate in a ratio of 59:41 which flowed isocratically at a rate of 1.2 mL/minute. Assay validation parameters include selectivity, linearity, precision, and accuracy tests. The research results showed that the quercetin method was validated with all parameters meeting the requirements. The linearity test produces a correlation value (r) = 0.9919, good selectivity, precision produces an RSD of less than 2% and accuracy produces a recovery percentage in the range of 98-102%. The average quercetin content in the ethanol extract of basil leaves is 12.70% w/w.

Salah satu tanaman Indonesia yang berkhasiat sebagai obat adalah tumbuhan kemangi (*Ocimum sanctum* L). Terdapat beberapa kandungan zat aktif dalam daun kemangi seperti senyawa flavanoid kuersetin diketahui terdapat dalam kandungan kemangi. Kuersetin memiliki beberapa aktivitas biologi yang sangat bermanfaat seperti antibakteri, antikanker, antivirus, dan antiinflamasi. Penentuan kadar kuersetin dalam daun kemangi membutuhkan metode yang valid. Pemilihan metode analisis yang memiliki spesifitas, linieritas, akurasi dan presisi yang baik merupakan aspek yang sangat penting agar diperoleh hasil yang dapat diterima. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan validasi penetapan kadar kuersetin yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum* L) secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sistem KCKT yang digunakan adalah tipe Shimadzu DGU-20A5R dengan detektor Uv-Vis pada panjang gelombang 374 nm. Fase diam yang digunakan adalah kolom C₁₈ dengan fase gerak campuran methanol : aqua bidestilata pada perbandingan 59:41 yang dialirkan secara isokratik pada laju 1,2 mL/menit. Parameter validasi metode penetapan kadar kuersetin meliputi uji selektivitas, linieritas, presisi dan akurasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode KCKT yang digunakan tervalidasi yang ditunjukkan dengan semua parameter uji memenuhi syarat yang ditetapkan. Uji linieritas menunjukkan nilai korelasi (r) = 0,9919, selektivitas baik, presisi menghasilkan RSD kurang dari 2% dan akurasi menghasilkan persen rekoverti pada kisaran 98-102%. Rata-rata kandungan kuersetin dalam ekstrak etanol daun kemangi adalah 12,70% b/b.

PENDAHULUAN

Berdasarkan data dari *World Health Organization* (WHO) obat-obatan tradisional masih digunakan pada 80% negara anggota WHO yang tersebar diseluruh dunia (*World Health Organization, 2019*). Sampai saat ini obat tradisional masih banyak digunakan oleh masyarakat Indonesia, karena dianggap berkhasiat dan harganya relatif lebih murah (Marwati & Amidi, 2018). Salah satu tumbuhan yang berkhasiat sebagai obat adalah tumbuhan kemangi (*Ocimum sanctum* L). Tanaman kemangi dilaporkan memiliki berbagai khasiat seperti anti-hiperlipidemia, hipoglikemik, ansiolitik, hipotensi, anti-inflamasi dan antimikroba. Semua khasiat tanaman kemangi ini sangat dimungkinkan karena keberadaan senyawa fitokimia yang memiliki aktivitas fisiologis, antara lain alkaloid, flavonoid, glikosida, saponin, triterpenoid, dan tannin (Chaudhary *et al.*, 2020).

Kemangi mengandung berbagai flavonoid yang berkontribusi terhadap sifat antioksidan dan anti-inflamasi. Beberapa flavonoid penting yang ditemukan dalam kemangi adalah apigenin, luteolin, kaempferol, dan kuersetin (Thakur & Thapa, 2023). Garg (2021) melaporkan bahwa jenis flavonoid yang signifikan terkandung dalam tanaman kemangi adalah berupa kuersetin yang mengindikasikan adanya aktivitas antioksidan yang tinggi.

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan dalam melakukan penetapan kadar kuersetin. Salah satunya adalah metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). KCKT digunakan untuk identifikasi dan kuantifikasi kadar senyawa dalam proses pengembangan obat dan telah digunakan di seluruh dunia sejak beberapa dekade (Chawla & Ranjan, 2016). Garg (Garg, 2021) melaporkan penetapan kadar kuersetin dalam kemangi menggunakan metode KCKT, akan tetapi belum dilakukan validasi metode penetapan kadarnya. Demikian juga Sukmawati *et al.* (2019) menyatakan bahwa metode KCKT dapat digunakan untuk melakukan penetapan kadar kuersetin yang terdapat dalam ekstrak etanol daun miana, akan tetapi belum dilakukan validasi metode uji yang lengkap, hanya dilakukan pada uji linieritas. Kuersetin yang terdapat dalam teh hijau dapat ditentukan kadarnya dengan metode KCKT menggunakan kolom C₁₈ sebagai fase diam, dan campuran akuabides:metanol:asam fosfat 5% (49:50:1, v/v) yang dialirkan pada 1 mL/menit sebagai fase gerak. Panjang gelombang maksimum yang digunakan adalah 370 nm, akan tetapi waktu retensi masih cukup lama yaitu pada 15,495 menit (Dwiyoga, 2012). Di sisi lain, penentuan kadar kuersetin dalam ekstrak tanaman menggunakan metode yang lain telah dilakukan. Diantaranya penetapan kadar daun sirsak dengan metode KLT-Densitometri yang telah tervalidasi pada parameter selektivitas,

linieritas, presisi dan akurasi (Adelima *et al.*, 2016). Penetapan kadar kuersetin juga dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri Uv-Vis. Diantaranya penelitian yang dilakukan oleh Sudjarwo *et al.* (2022) yang melakukan penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak daun belimbing wuluh dengan metode Spektrofotometer Uv-Vis yang tervalidasi pada parameter selektivitas, linieritas, LOD, LOQ, presisi dan akurasi. Validasi metode analitik adalah proses yang ditetapkan melalui studi laboratorium untuk memastikan bahwa karakteristik kinerja metode memenuhi persyaratan yang ditetapkan untuk tujuan penggunaannya. Parameter dalam validasi metode meliputi akurasi, presisi, spesifisitas, batas deteksi, batas kuantifikasi, linieritas, rentang, dan ketahanan (Harmita, 2004). Penetapan kadar zat dalam matriks yang kompleks seperti dalam ekstrak daun kemangi memerlukan metode yang selektif dan valid. Salah satu metode tersebut adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), yang telah digunakan secara luas untuk mengidentifikasi dan menetapkan kadar senyawa aktif yang terdapat dalam suatu tanaman Dengan melakukan validasi ini, diharapkan dapat memperoleh hasil pengukuran yang akurat, sensitif, spesifik dan reproduisibel (Azis & Lawan, 2020).

Berdasarkan uraian diatas diperlukan penelitian terkait validasi penetapan kadar kuersetin dengan parameter uji selektivitas, linieritas, presisi dan akurasi. Metode yang telah tervalidasi diharapkan akan dapat digunakan untuk penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum* L) secara akurat, sensitif, spesifik dan reproduisibel.

METODE

Desain, tempat dan waktu

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian non eksperimental laboratoris. Penelitian dilakukan di Laboratorium Analisis Makanan dan Minuman (Amami) dan Laboratorium Instrument Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri pada bulan November 2022 – Maret 2023.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain Daun kemangi (*Ocimum sanctum* L) yang diperoleh dari Kecamatan Mantup, Kabupaten Lamongan yang masih segar, hijau serta tidak berlubang, etanol 96%, baku standar kuersetin, metanol pro KCKT, aquabidestilata.

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain seperangkat alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Shimadzu DGU-

20A5R), kolom C₁₈, membran filter 0,45 µm, neraca analitik (Metler Toledo), kertas saring, labu ukur, gelas ukur, beaker glass, batang pengaduk.

Langkah-Langkah Penelitian

Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman ditujukan untuk mengetahui kebenaran dari tanaman yang akan digunakan sebagai bahan uji. Determinasi tanaman kemangi (*Ocimum sanctum* L) dilakukan di Institut Ilmu Kesehatan Bhaktiwiyata, Kota Kediri, Jawa Timur.

Persiapan Sampel

Daun kemangi dicuci untuk menghilangkan kotoran yang mungkin menempel pada sampel. Kemudian sampel daun kemangi yang sudah dicuci dirajang dan dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung selama 1 minggu untuk mendapatkan simplisia kering. Setelah sampel mengering, digiling dan disaring hingga menjadi serbuk halus. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, dengan cara merendam serbuk simplisia daun kemangi sebanyak 100 g kedalam pelarut etanol 96% sebanyak 1500 mL sampai simplisia terendam, dibiarkan dalam wadah bejana tertutup selama 3 hari, terlindung dari paparan langsung sinar matahari dan dilakukan pengadukan secara berkala. Residu dari proses maserasi diremaserasi kembali dan ekstrak etanol cair yang dihasilkan dicampur dengan hasil penyaringan maserasi pertama. Residu dari remaserasi dilarutkan kembali dengan cairan penyari etanol 96% yang baru sebanyak 1200 mL, kemudian hasil penyaringan digabungkan dan diuapkan untuk mendapatkan ekstrak etanol kental.

Identifikasi Senyawa Flavonoid

Flavonoid diidentifikasi dengan menggunakan uji Shinoda. Ditimbang sebanyak 1-gram ekstrak, dilarutkan dalam etanol p.a dan disaring. 2 mL arutan ekstrak etanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Larutan pembanding kuersetin dan larutan sampel masing-masing ditambahkan asam klorida pekat (HCl) sebanyak dua tetes. Kemudian ditambahkan serbuk magnesium (Mg) lalu dikocok dan ditunggu sampai terjadi reaksi perubahan warna. Jika terjadi perubahan warna menjadi jingga, merah, dan hijau ekstrak dinyatakan positif mengandung flavonoid (Lisi *et al.*, 2017).

Pembuatan Larutan Baku Induk dan Baku Pembanding Kuersetin

Baku kuersetin ditimbang sebanyak 25 mg dan dilarutkan dalam labu ukur 25 mL dengan metanol sampai tanda batas hingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan baku induk dipipet sebanyak 2,5 mL dilarutkan dalam

labu ukur 25 mL hingga tanda dengan metanol supaya diperoleh larutan baku pembanding 100 ppm (Sukmawati *et al.*, 2019)

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan baku standar kuersetin 100 ppm dipipet hingga 2 mL ke dalam labu ukur 25 mL dan diencerkan dengan pelarut metanol hingga tanda batas sehingga larutan memiliki konsentrasi 8 ppm. Larutan yang disiapkan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang Panjang gelombang 300-400 nm. Kemudian diperoleh panjang gelombang maksimum kuersetin yang dapat digunakan untuk penelitian.

Penentuan Fase Gerak dan Laju Alir

Penentuan fase gerak dan laju alir dilakukan menggunakan larutan baku standar kuersetin 8 ppm. Kemudian dilakukan pengujian terhadap fase gerak metanol : aquabidestilata (59 : 41; 55 : 45; dan 54:46 v/v) serta laju alir 1 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Pengujian ini dilakukan untuk memperoleh perbandingan fase gerak dan laju alir dengan waktu retensi tercepat dan laju alir terluas.

Validasi Metode Analisis

Uji Selektivitas

Selektivitas ditentukan dengan mengamati kromatogram kuersetin dan menghitung nilai resolusi puncak kuersetin dengan puncak zat lain yang ikut terdeteksi (Husnia & Budiarti, 2021). Nilai untuk memenuhi persyaratan uji selektivitas yaitu minimal daya resolusi sebesar 1,5 (Latimer, 2019).

Uji Linieritas

Uji linieritas diperoleh dengan kurva kalibrasi pengukuran AUC kromatogram larutan baku kuersetin 8, 10, 12, 14, dan 16 ppm menggunakan sistem KCKT yang telah ditentukan sebelumnya. Setelah itu dibuat kurva kalibrasi dengan membandingkan AUC kromatogram sumbu y terhadap konsentrasi larutan baku kuersetin sebagai sumbu x, kemudian dihitung persamaan garis regresi dan koefisien korelasinya. Uji linieritas dikatakan baik atau hubungan linier jika koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = bx + a$ yaitu r mendekati 1 (Latimer, 2019).

HASIL

Rendemen Ekstrak

Tabel 1. Rendemen Ekstrak

| Berat Simplisia Kering (gram) | Berat Ekstrak Kental (gram) | Rendemen Ekstrak (%) |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| 100 | 23,42 | 23,42 |

Uji Presisi

Larutan kuersetin pada konsentrasi 100% disaring menggunakan membran filter 0,45 μ m. Kemudian diinjeksikan sebanyak 20 μ L ke alat KCKT. Replikasi dilakukan sebanyak 6 kali. Selanjutnya menghitung nilai %RSD atau %KV (Latimer, 2019).

Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan metode penambahan baku atau metode adisi standar. Larutan sampel ditetapkan kadar kuersetinnya kemudian ditambahkan kuersetin baku dengan kadar 80%, 100% 120% dari kadar kuersetin yang telah ditetapkan dalam larutan sampel. Masing-masing konsentrasi direplikasi sebanyak 3 kali dan dihitung persen rekoverinya (Latimer, 2019).

Penetapan Kadar Kuersetin

Penetapan kadar kuersetin dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Pertama dibuat larutan sampel induk dengan cara ekstrak etanol daun kemangi ditimbang sebanyak 25 mg kemudian dilarutkan dalam labu ukur 25 mL dengan larutan metanol hingga tanda batas. Kemudian dibuat larutan sampel kerja dengan dipipet 2,5 mL untuk masing-masing replikasi kemudian ditambahkan dengan metanol dalam labu ukur 25 mL hingga tanda. Dilakukan penyaringan pada masing-masing replikasi larutan sampel kerja dengan membran filter 0,45 μ m lalu disonikasi selama 20 menit. Kemudian injeksikan 20 μ L larutan pada sistem KCKT pada kondisi suhu ruang dengan fase gerak, metanol pro KCKT: aquabidestilata pada panjang gelombang sesuai pengukuran (Sukmawati *et al.*, 2019).

Pengolahan dan analisis data

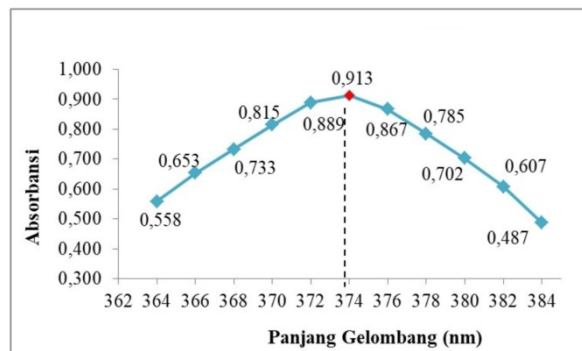
Data penelitian berupa kromatogram, metode analisis dinyatakan valid jika hasil uji tiap parameter validasi memenuhi persyaratan. Kadar kuersetin dihitung menggunakan persamaan regresi linier yang merupakan korelasi antara konsentrasi dengan nilai AUC (*Area Under Curve*) yang diperoleh dari larutan sampel. Nilai AUC pada kromatogram sampel dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier sebagai y dan nilai x dapat dihitung sebagai kadar kuersetin.

Identifikasi Flavonoid

Tabel 2. Hasil Identifikasi Flavonoid

| Keterangan | Warna | Kesimpulan |
|-------------------|--------|------------|
| Standar Kuersetin | Merah | Positif |
| Sampel | Jingga | Positif |

Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin



Gambar 1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Optimasi Fase Gerak dan Laju Alir

Tabel 3. Optimasi Fase Gerak dan Laju Alir

| Komposisi Fase Gerak (Metanol : Aquabides, v/v) | Laju Alir (mL/menit) | tR (menit) | Luas Area | Keterangan |
|---|----------------------|------------|-----------|------------------|
| 59:41 | 1,0 | 10,912 | 8791 | - |
| 55:45 | 1,0 | 16,140 | 9377 | - |
| 54:46 | 1,0 | - | - | Tidak terdeteksi |
| 59:41 | 1,2 | 5,654 | 103534 | Optimum |
| 55:45 | 1,2 | 8,017 | 90831 | - |
| 54:46 | 1,2 | 8,859 | 84291 | - |

Pada uji optimasi yang telah dilakukan diperoleh hasil bahwa fase gerak dengan perbandingan metanol : aquabides (59:41), serta laju alir 1,2 ml/menit adalah yang paling optimum

hal ini dikarenakan pada perbandingan fase gerak dan laju alir tersebut diperoleh waktu retensi tercepat dengan nilai luas area yang paling besar.

Uji Kualitatif

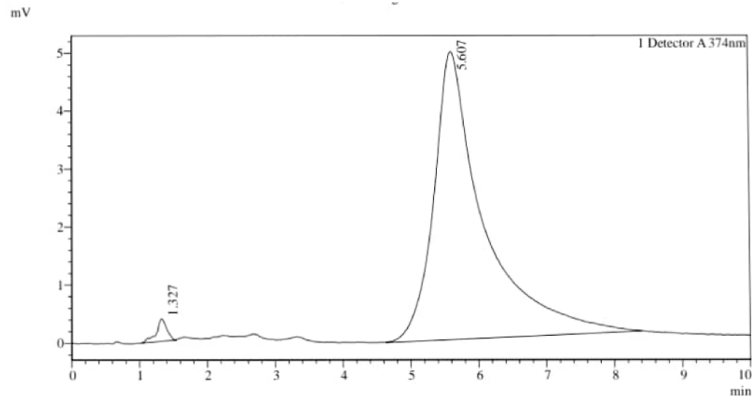
Tabel 4. Hasil Uji Kualitatif

| Keterangan | Waktu Retensi |
|-------------------|---------------|
| Standar Kuersetin | 5,381 |
| Sampel | 5,503 |

Uji Selektivitas

Tabel 5. Hasil Uji Selektivitas

| Puncak | Waktu retensi (tR) | Lebar Puncak (W) | Resolusi (Rs) | Efisiensi Kolom (N) | Selektivitas (α) |
|--------------|--------------------|------------------|---------------|---------------------|---------------------------|
| Senyawa Lain | 1,327 | 0,52 | 2,14 | 2137 | 4,33 |
| Kuersetin | 5,607 | 3,75 | - | - | - |
| Syarat | - | - | >1,5 | 2000 | >1 |



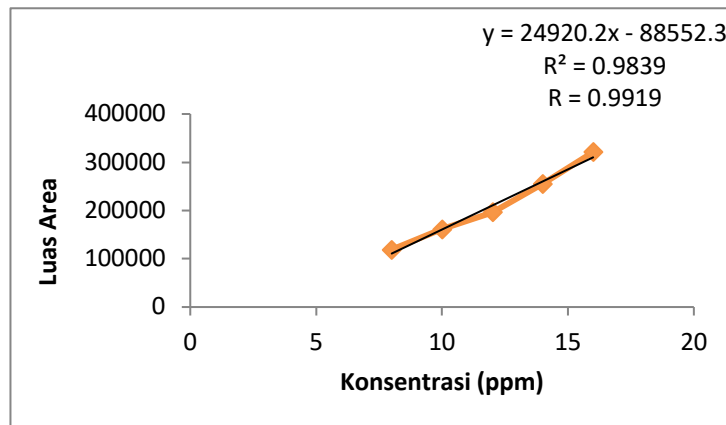
Gambar 2. Kromatogram Kuersetin dalam Ekstrak Etanol Daun Kemangi

Uji Linieritas

Tabel 6. Hasil Uji Linieritas Baku Kuersetin

| Konsentrasi (ppm) | Waktu Retensi | Luas Area |
|-------------------|---------------|-----------|
| 8 | 5.411 | 118953 |
| 10 | 5.185 | 160989 |
| 12 | 5.153 | 196308 |
| 14 | 5.151 | 255374 |
| 16 | 5.100 | 320916 |

Dari konsentrasi dan luas area yang diukur kemudian diplotkan pada kurva regresi dan dihasilkan $a = 88552.3$, $b = 24920.2x$, $r^2 = 0,9839$, $r = 0,9919$



Gambar 3. Kurva Baku Kuersetin

Uji Presisi

Tabel 7. Hasil Uji Presisi

| Kadar (µg/mL) | Replikasi | Luas Area |
|---------------|-----------|-----------|
| 12,48 | 1 | 216897 |
| | 2 | 217533 |
| | 3 | 219287 |
| | 4 | 220776 |
| | 5 | 214271 |
| | 6 | 214947 |

| | |
|-----------|----------|
| SD | 2271.987 |
| Rata-rata | 217285.5 |
| %RSD | 1.045% |
| Syarat | <2% |

Keterangan:

Pada uji presisi diketahui didapatkan nilai %RSD yang memenuhi persyaratan yakni <2%.

Uji Akurasi

Tabel 8. Hasil Uji Akurasi

| Konsentrasi | Replikasi | Hasil Terukur | Perolehan Kembali (%) | Syarat (%) |
|-----------------------------|-----------|---------------|-----------------------|------------|
| 10,24 ppm (80%) | 1 | 10,16 ppm | 99,21% | 98-102 |
| | 2 | 10,17 ppm | 99,31% | |
| | 3 | 10,13 ppm | 98,92% | |
| 12,48 ppm (100%) | 1 | 12,25 ppm | 98,15% | 98-102 |
| | 2 | 12,28 ppm | 98,39% | |
| | 3 | 12,35 ppm | 98,95% | |
| 15,24 ppm (120%) | 1 | 15,13 ppm | 99,27% | 98-102 |
| | 2 | 15,17 ppm | 99,54% | |
| | 3 | 15,19 ppm | 99,67% | |

Keterangan : Pada hasil uji akurasi diketahui bahwa pada masing-masing konsentrasi memenuhi syarat %recovery yakni pada rentang 98%-102%.

Penetapan Kadar Kuersetin dalam ekstrak Etanol Daun Kemangi

Tabel 9. Penetapan Kadar Kuersetin Ekstrak Daun Kemangi.

| Replikasi | Luas Area | Kadar (µg/mL) | Rerata kadar (µg/mL) | RSD |
|-----------|-----------|---------------|----------------------|--------|
| 1 | 227898 | 12,69 | 12,70 | 0,164% |
| 2 | 228779 | 12,73 | | |
| 3 | 228175 | 12,70 | | |

PEMBAHASAN

Determinasi tanaman bertujuan untuk membuktikan bahwa tanaman yang digunakan adalah benar tanaman sampel penelitian. Pada hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan sebagai sampel penelitian benar daun kemangi dengan nama latin *Ocimum sanctum* L.

Simplisia daun kemangi (*Ocimum Sanctum* L.) ditimbang sebanyak 100 gram diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% total sebanyak 4000 mL. Metode ekstraksi maserasi menjadi pilihan karena senyawa target pada penelitian ini adalah flavonoid yang bersifat termolabil. Dengan memilih metode maserasi maka diharapkan akan dapat menjaga senyawa target dari kerusakan karena metode ini tidak menggunakan pemanasan. Selain itu, metode maserasi juga relatif mudah dilakukan, karena hanya dilakukan proses perendaman dan pengadukan pada suhu kamar (Kurniawati *et al.*, 2023). Pelarut pada penelitian ini menggunakan etanol 96%, menurut Manoppo *et al.* (2019) penggunaan etanol sebagai pelarut dikarenakan sifatnya yang polar serta universal. Selain itu senyawa metabolit kuersetin yang akan diambil dari simplisia daun kemangi juga bersifat polar sehingga proses ekstraksi menggunakan pelarut polar.

Berat ekstrak yang diperoleh sebesar 23,42-gram dengan persentase rendemen 23,42%. Nilai tersebut dikatakan baik karena lebih dari 10%, Dewatisari *et al.*, (2018) menyatakan bahwa nilai rendemen yang tinggi menunjukkan banyaknya komponen bioaktif yang terkandung di dalamnya.

Senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kemangi diidentifikasi menggunakan uji shinoda. Adanya kandungan flavonoid dalam ekstrak ditandai dengan terjadinya perubahan warna larutan baku perbandingan kuersetin dan sampel setelah dilakukan penambahan reagen Mg dan HCl pekat, dari hijau menjadi merah. Reagen ini akan mereduksi inti benzopiron pada flavonoid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi merah atau merah jingga (Asra *et al.*, 2019). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilaporkan (Kristanti *et al.*, 2008) yang memperlihatkan adanya perubahan larutan menjadi jingga, merah, dan hijau tergantung pada jenis flavonoid yang terkandung di dalamnya, dan penelitian Garg (2021) yang menyatakan bahwa kuersetin merupakan salah satu jenis flavonoid yang terkandung dalam tanaman kemangi.

Dalam penelitian ini dilakukan optimasi terlebih dahulu, untuk mengetahui panjang gelombang maksimum, laju alir, serta

perbandingan fase gerak yang paling baik untuk digunakan dalam penelitian. Penelusuran Panjang gelombang dilakukan pada rentang 300-450 nm dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis, dan didapatkan panjang gelombang maksimum kuersetin sebesar 374 nm. Hasil ini hampir mendekati penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Husnia & Budiarti (2021) dan Sumbe *et al.* (2021). Pengukuran panjang gelombang maksimal ditujukan untuk mendapatkan kepekaan analisis yang maksimal sehingga perubahan untuk setiap konsentrasi dapat terukur dengan seksama (Gandjar & Rohman, 2014)

Pada optimasi penentuan laju alir serta perbandingan fase gerak ini setelah dirunning masing-masing pengujian selama 15 menit diperoleh hasil bahwa pada laju alir 1,2 mL/menit dengan fase gerak methanol : aquabidestilata (59:41, v/v) lebih optimum dengan waktu retensi yang lebih cepat dan area kromatogram terluas. Hasil tersebut seperti penelitian sebelumnya oleh Husnia & Budiarti (2021) yang menunjukkan bahwa semakin banyak metanol yang digunakan dalam perbandingan fase gerak maka waktu retensi serta luas area yang diperoleh semakin baik. Ini dapat terjadi karena kuersetin memiliki kelarutan yang lebih baik terhadap metanol sehingga kuersetin berinteraksi kuat terhadap metanol.

Uji kualitatif pada penelitian ini diketahui bahwa waktu retensi sampel adalah 5,381 menit sementara waktu retensi pada standar adalah pada 5,503 menit. Hasil tersebut dapat dikatakan bahwa waktu retensi antara sampel dan standar memenuhi persyaratan yakni masih relatif sama. Dengan hasil tersebut juga dapat dinyatakan pada sampel ekstrak daun kemangi terdapat kandungan kuersetin di dalamnya.

Uji presisi ditentukan dengan menghitung nilai *Relative Standard Deviation* (%RSD) atau koefisien variasi (% KV) menghitung persentase RSD pada luas puncak kromatogram yang dihasilkan larutan uji. Metode analisis pada penelitian ini memiliki nilai RSD 1,045% . Menurut Harmita (2004) suatu metode dinyatakan memiliki ketelitian tinggi jika nilai RSD yang diperoleh < 2%. Hasil tersebut menandakan bahwa metode uji yang digunakan dapat memberikan hasil yang hamper sama jika dilakukan pengukuran berulang dalam satu kali seri pengukuran.

Akurasi menyatakan keterdekatan hasil penukuran dengan hasil yang sebenarnya. Metode akurasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode adisi standar. Parameter validasi dinyatakan dengan menentukan persen perolehan kembali atau % *recovery* pada

konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Berdasarkan nilai %recovery yang didapatkan maka dapat dikatakan pada uji akurasi sesuai syarat yang ditetapkan Latimer (2019) yaitu 98- 102%.

Pada uji linieritas dapat diketahui dari perolehan kurva baku yang telah ditentukan sebelumnya. Dimana nilai linieritas dapat diamati dari perolehan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9919 yang mana nilai tersebut memenuhi syarat linieritas yakni mendekati 1.

Uji selektivitas dilakukan dengan menghitung nilai resolusi atau r dari kromatogram satu dengan kromatogram terdekat. Dalam penelitian ini diperoleh bahwa nilai resolusi antara dua kromatogram adalah 2,14 yang mana nilai untuk memenuhi persyaratan uji selektivitas yaitu minimal pemisahan resolusi sebesar 1,5 (Latimer, 2019). Maka dari itu pada uji selektivitas ini dapat dinyatakan memenuhi persyaratan.

Uji kuantitatif dilakukan bertujuan untuk mengetahui kadar kuersetin yang terkandung dalam sampel ekstrak daun kemangi. Uji kuantitatif dilakukan dengan menginjeksikan sampel ke dalam sistem KCKT sebanyak 3 kali replikasi kemudian luas area yang diperoleh dihitung menggunakan rumus persamaan regresi $y = 24920,2x - 88552,3$ sehingga dapat diperoleh kadarnya. Hasil rata-rata sampel yang telah dihitung diperoleh kadar kuersetin untuk sampel ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L) adalah sebesar 12,70 µg/mL.

KESIMPULAN

Metode analisis penetapan kadar kuersetin pada ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) menggunakan alat KCKT dengan fase diam kolom C₁₈ dan fase gerak methanol: aquabidestilata (59:41, v/v) pada laju alir 1,2 mL/menit memiliki validitas yang baik dan tepat. Kadar kuersetin dalam daun kemangi yang diperoleh sebesar 12,70 µg/mL.

SARAN

Pengembangan metode penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) masih perlu dilakukan untuk memaksimalkan kadar kuersetin yang diperoleh. Salah satu yang disarankan adalah melakukan pengembangan metode KCKT secara gradien.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri atas pendanaan penelitian hibah internal, dan Galih Pandu Santoso (Mahasiswa Program Studi S1 Farmasi Institut Ilmu Kesehatan Bhakti

Wiyata Kediri) yang telah memb proses pelaksanaan penelitian sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Adelima, S., Darmawati, Asri., Sudjarwo., (2016) *Validasi Metode KLT-Densitometri untuk Penetapan Kadar Kuersetin dalam Sediaan Sirup Daun Sirsak (Annona muricata Linn.)*, Berkala Ilmiah Kimia Farmasi, 5(2), pp. 15–19.
- Asra, R., Azni, NR., Rusdi., Nessa., (2019) *Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol fraksi heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air daun kapulaga (Eleteria cardamomum (L.) Maton)*, Journal of Pharmaceutical and Sciences, 2(1), pp. 30–37.
- Azis, A. and Lawan, G.R. (2020) *Pengaruh ekstrak kentos kelapa (cocos nucifera L.) terhadap penurunan immobility time sebagai antidepresan pada mencit (mus musculus)*, Jurnal kesehatan yamasi makassar, 4(1), pp. 1–8. Available at: <http://>.
- Chaudhary, A., Sharma, S., Mittal, A., Gupta, S. & Dua, A., (2020) *Phytochemical and antioxidant profiling of Ocimum sanctum*, Journal of Food Science and Technology, 57(10), pp. 3852–3863. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04417-2>.
- Chawla, G. and Ranjan, C. (2016) *Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography*, Open Chemistry Journal, 3(1), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.2174/1874842201603010001>.
- Dewatisari, W.F., Rumiyaniti, L. and Rakhmawati, I. (2018). *Rendemen dan Skrining Fitokimia pada Ekstrak Daun Sansevieria sp.*, Jurnal Penelitian Pertanian Terapan, 17(3), p. 197. Available at: <https://doi.org/10.25181/jppt.v17i3.336>.
- Dwiyoga, A.R.H. (2012) *Optimasi dan validasi Metode penetapan kadar kuersetin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) fase terbalik dalam teh hijau*. Universitas Sanata Dharma.
- Gandjar, I.G. and Rohman, A. (2014) *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Garg, P. (2021) *HPLC Estimation of Flavanoid (quercetin) of leaves and stem extracts of Ocimum sanctum and Tinospora cordifolia*, The Journal of Phytopharmacology, 10(4), pp. 220–224.

- Available at:
<https://doi.org/10.31254/phyto.2021.10401>.
- Harmita (2004) *Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya*, Majalah Ilmu Kefarmasian, 1(3), pp. 117–135.
- Husnia, F.H. and Budiarti, A.B. (2021) *Pengembangan Metode Analisis Kuersetin dalam Ekstrak Etanol Buah Leunca (Solanum nigrum L.) Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*, Media Farmasi, 17(2), p. 108. Available at:
<https://doi.org/10.32382/mf.v17i2.2209>.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M. & Kurniadi, B., (2008) *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kurniawati, E., Fitria, F. and Saputra, C.A.P. (2023) *Pengaruh metode ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan kentos kelapa (Cocos nucifera l) dengan metode DPPH*, Jurnal Dunia Farmasi, 7(3), pp. 173–184.
- Latimer, G. (2019) *Official Methods of Analysis of AOAC International*.
- Lisi, A.K.F., Lisi, F., Runtuwene, M.R.J. & Wewengkang, D.S., (2017) *Uji fitokimia dan aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol bungan soyogik (Saurauia bracteosa DC.)*, PHARMACONJurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT, 6(1), pp. 53–61.
- Manoppo, C.J., Yudistira, A. and Wewengkang, D.S. (2019) *Aktivitas antimikroba ekstrak dan fraksi tunikata (Polycarpa aurata) yang dikoleksi di selat lembeh, bitung terhadap Escherichia coli, Staphylococcus aureus dan Candida albicans*, Pharmacon, 8(1), pp. 243–251.
- Marwati and Amidi (2018) *Pengaruh budaya, persepsi dan kepercayaan masyarakat terhadap keputusan pembelian obat herbal*, Jurnal Ilmu Manajemen, 7(2), pp. 168–180.
- Sudjarwo, Rovitasari, R. and Prihatiningtyas, S. (2022) *Penetapan Kadar Kuersetin dalam Sediaan Sirup Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi) dengan Metode Spektrofotometri UV*, Camellia, 1(2), pp. 61–68.
- Sukmawati, Widiastuti, Harti and Miftahuljanna (2019) *Analisis kadar kuersetin pada ekstrak etanol daun miana (Plectranthus scutellarioides (L.) R.Br.) secara HPLC (High Performance Liquid Chromatography)*, As-Syifa, 11(1), pp. 38–44.
- Sumbe, R., Gawade, A., Kuchekar, A. & C.L, B., (2021) *Development and validation of Uv Visible Spectrophotometric method for estimation of quercetin in Tagetes erecta extract*, International Journal of Scientific Research, 12(1), pp. 40465–40468. Available at:
<https://doi.org/10.24327/ijrsr.2021.1201.5703>.
- Thakur, A. and Thapa, D. (2023) *Holy basil (Ocimum Sanctum)-A comprehensive review of traditional uses, phytochemical composition, medicinal properties and future directions*, Just Agriculture, 3(11), pp. 136–151. Available at:
<https://www.researchgate.net/publication/372556755>.
- World Health Organization (2019) *WHO global report on traditional and complementary medicine 2019*.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution, and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third-party material in this article are included in the article's Creative Commons license unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.