

**ANALISIS ARTEPILLIN C DAN FENETIL KAFEAT DALAM PROPOLIS
YANG BERASAL DARI INDONESIA, AUSTRALIA, BRAZIL DAN
SELANDIA BARU SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

FITRI HASANAWATI

0706197345



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI EKSTESNSI

DEPOK

2010

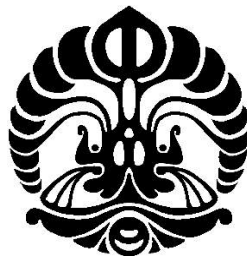
**ANALISIS ARTEPILLIN C DAN FENETIL KAFEAT DALAM PROPOLIS
YANG BERASAL DARI INDONESIA, AUSTRALIA, BRAZIL DAN
SELANDIA BARU SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

Oleh :

FITRI HASANAWATI

0706197345



DEPOK

2010

SKRIPSI : ANALISIS ARTEPILLIN C DAN FENETIL KAFEAT DALAM
PROPOLIS YANG BERASAL DARI INDONESIA,
AUSTRALIA, BRAZIL DAN SELANDIA BARU SECARA
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI


NAMA : FITRI HASANAWATI

NPM : 0706197345

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JANUARI 2010


DR. YAHDIANA HARAHAHAP, MS
PEMBIMBING I


DRS. HAYUN, M.SI
PEMBIMBING II

Tanggal lulus ujian Sidang Sarjana : 11 Januari 2010

Penguji I : Dr. Arry Yanuar, M.Si

Penguji II : Dr. Abdul Mun'im, M.Si

Penguji III : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan semesta alam, Allah subhanahu wata'ala, karena atas segala rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi ini. Shalawat serta salam tak lupa tercurahkan kepada baginda nabi Muhammad shallallahu 'alaihi wa sallam.

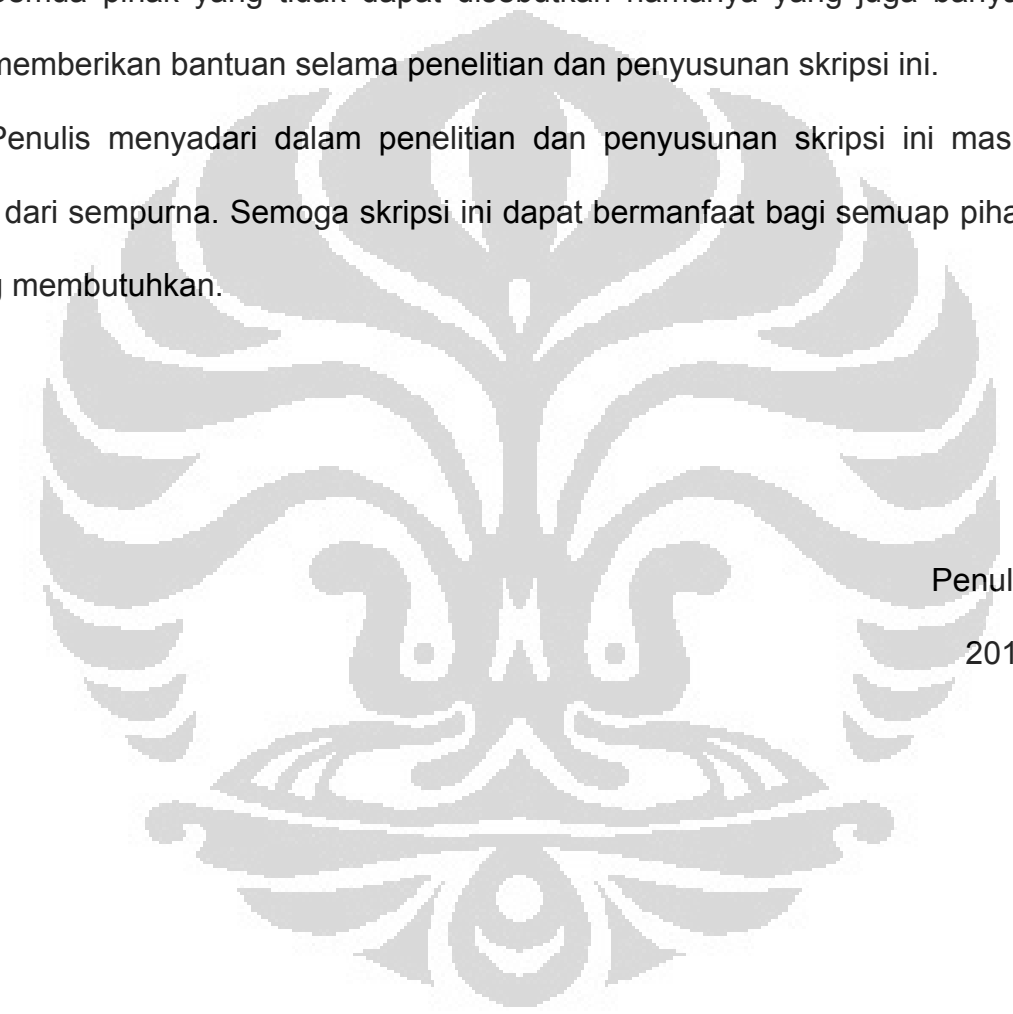
Skripsi yang berjudul Analisis Artepillin C dan Fenetil Kafeat dalam Propolis yang Berasal dari Indonesia, Australia, Brazil, dan Selandia Baru ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, antara lain:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS., dan bapak Drs. Hayun, M.Si. sebagai pembimbing skripsi yang telah membimbing dan mengarahkan penulis selama penelitian sampai penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Dr. Harmita yang telah banyak memberikan masukan selama penelitian.
3. Ibu Dra. Juheini Amin M.Si. selaku Pembimbing Akademis yang telah memberikan bimbingan selama masa pendidikan di departemen Farmasi.
4. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS., selaku Ketua Departemen Farmasi UI
5. Seluruh staf pengajar, laboran terutama bapak H. Rustam Paun dan para karyawan departemen Farmasi UI terutama Tami, ibu Rina, ibu Ami, Mela, bapak Ma'ruf dan bapak Suroto.

6. Ibu dan keluarga di rumah yang senantiasa mendo'akan saya.
7. Rekan-rekan sejawat farmasi terutama mahasiswa-mahasiswa KBI Kimia Farmasi, angel, ingga, ita, erika, desy dan fery atas bantuan dan dukungannya selama ini.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya yang juga banyak memberikan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.



Penulis
2010

ABSTRAK

Propolis adalah campuran dari beberapa resin yang memiliki berbagai macam khasiat antara lain sebagai antitumor dan antikanker. Penelitian ini dilakukan untuk menganalisa adanya Artepillin C dan fenetil kafeat (CAPE) yaitu suatu senyawa dalam propolis yang bertanggung jawab terhadap khasiat tersebut. Alat yang digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan fase gerak asam format 1,5% dalam air - asam format 1,5% dalam asetonitril dengan komposisi fase gerak 6:4. Laju alir yang digunakan 1,8 mL/menit dimulai menit ke-0 hingga menit ke-8, selanjutnya pada menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit, dan pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit. Setiap sampel dilarutkan dengan metanol sehingga didapat konsentrasi tertentu, lalu disuntikan ke KCKT dengan volume penyuntikan 20 µl. Deteksi dilakukan dengan menggunakan detektor UV dan PDA pada panjang gelombang optimum 315 nm. Hasil pengujian menunjukkan hanya pada sampel A dan D yang terdeteksi adanya CAPE dengan kadar 0,382 µg/mL pada sampel A dan 0,291 µg/mL pada sampel D sedangkan Artepillin C tidak terdeteksi pada semua sampel.

Kata kunci : Propolis, Artepillin C, Fenetil kafeat (CAPE), KCKT,

xii + 110 hlm.; gbr.; tab.; lamp.

Bibliografi: 30 (1990-2003)

ABSTRACT

Propolis is a resinous mixture which has a variety of benefits, as antitumor and anticancer. This research is done to analyze the existence of Artepillin C and caffeic acid phenethyl ester (CAPE), both of them are compound in propolis which responsible to their benefit. The instrument which used in this research was high performance liquid chromatography (HPLC) with mobile phase used 1.5% formic acid in water-1.5% formic acid in acetonitrile with composition of 6:4. Flow rate used 1.8 mL/min starting from zero minute to eighth minute, and then in the eighth minute to tenth minute was changed to 1.0 mL/min, and at tenth minute is changed back to 1.8 mL/min. Each sample dissolved with methanol until got a certain concentration, and then injected into HPLC with 20 µl injection volume. Detection was done by using UV detector and PDA detector at the optimum wavelength of 315 nm. The results showed only the sample A and D which detected the existence of CAPE, detectable levels of 0.382 µg/mL in sample A and 0.291 µg/mL in sample D, while Artepillin C undetectable in all samples.

Keyword: Propolis, Artepillin C, Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), HPLC,
xii + 110 hlm.; gbr.; tab.; lamp.

Bibliografi: 30 (1990-2003)

DAFTAR ISI

Halaman

KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Lebah Madu.....	5
B. Propolis.....	6
C. Artepillin C.....	10
D. Fenetil Kafeat (CAPE).....	11
E. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	13
F. Validasi Metode Analisis.....	28
G. Analisis Artepillin C Dan Fenetil Kafeat (CAPE).....	33

BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA	
A. Lokasi dan Waktu.....	37
B. Bahan.....	37
C. Alat.....	38
D. Cara Kerja.....	38
BAB IV. HASIL PERCOBAAN DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil Percobaan.....	43
B. Pembahasan.....	46
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan.....	55
B. Saran.....	56
DAFTAR ACUAN.....	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Rumus struktur ArtepillinC.....	10
2. Rumus struktur CAPE.....	11
3. Detektor UV.....	19
4. Diagram alir HPLC.....	23
5. Alat kromatografi cair kinerja tinggi detektor UV.....	63
6. Alat kromatografi cair kinerja tinggi detektor PDA.....	64
7. Sampel propolis.....	65
8. Spektrum serapan larutan standar Artepillin C.....	66
9. Spektrum serapan larutan standar CAPE.....	67
10. Spektrum serapan larutan standar campuran.....	68
11. Kromatogram larutan standar Artepillin C dan CAPE 1 µg/mL dalam asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40); kecepatan alir 1,8 mL/menit	69
12. Kromatogram larutan standar Artepillin C dan CAPE 1 µg/mL dalam asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40); kecepatan alir 1,5 mL/menit.....	70
13. Kromatogram larutan standar Artepillin C dan CAPE 1 µg/mL dalam asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (30:70); kecepatan alir 0,8 mL/menit.....	71

14. Kromatogram larutan standar Artepillin C dan CAPE 1 µg/mL dalam asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (30:70); kecepatan alir 1,0 mL/menit.....	72
15. Kromatogram larutan standar Artepillin C dan CAPE 1 µg/mL dalam asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (30:70); kecepatan alir 1,2 mL/menit.....	73
16. Kromatogram standar campuran menggunakan detektor PDA.....	74
17. Kromatogram sampel A menggunakan detektor PDA.....	75
18. Kromatogram sampel B menggunakan detektor PDA.....	76
19. Kromatogram sampel C menggunakan detektor PDA.....	77
20. Kromatogram sampel D menggunakan detektor PDA.....	78
21. Kromatogram sampel A menggunakan detektor UV.....	79
22. Kromatogram sampel B menggunakan detektor UV.....	80
23. Kromatogram sampel C menggunakan detektor UV.....	81
24. Kromatogram sampel D menggunakan detektor UV.....	82
25. Kromatogram hasil <i>spiking</i> sampel A dengan detektor UV.....	83
26. Kromatogram hasil <i>spiking</i> sampel D dengan detektor UV.....	84
27. Kromatogram hasil <i>spiking</i> sampel A dengan detektor PDA.....	85
28. Kromatogram hasil <i>spiking</i> sampel D dengan detektor PDA.....	86
29. Kurva kalibrasi standar Artepillin C.....	87
30. Kurva kalibrasi standar CAPE.....	88

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komponen kimia propolis.....	9
2. Pemilihan fase gerak untuk analisis Artepillin C.....	91
3. Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Pengujian Linearitas Artepillin C..	92
4. Hasil Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Artepillin C.	93
5. Hasil perhitungan Uji presisi Artepillin C.....	94
6. Data uji perolehan kembali Artepillin C.....	95
7. Pemilihan fase gerak untuk analisis CAPE.....	96
8. Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Pengujian Linearitas CAPE.....	97
9. Hasil Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi CAPE.....	98
10. Hasil Perhitungan Uji Presisi CAPE.....	99
11. Data Uji Perolehan Kembali CAPE.....	100
12. Data penetapan kadar CAPE.....	101

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan memperoleh persamaan garis linier.....	105
2. Perhitungan Simpangan Baku dan Koefisien Variasi.....	106
3. Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	107
4. Perhitungan Uji Perolehan Kembali.....	108
5. Sertifikat Analisis Artepillin C.....	109
6. Sertifikat Analisis CAPE.....	110



BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Saat ini di Indonesia sedang marak penggunaan suplemen yang berasal dari lebah madu, yang dikenal sebagai propolis. Sebagaimana diketahui memiliki berbagai macam khasiat, salah satunya memiliki efek sebagai anti tumor dan antikanker (1, 2).

Propolis adalah sejenis resin yang karena bentuknya lengket seperti lem, disebut sebagai *bee glue*. Propolis sebenarnya dihasilkan lebah dengan cara mengumpulkan resin-resin dari berbagai macam tumbuhan, diantaranya *Populus* spp, *Betula* spp, *Ulmus* spp, *Quercus* spp, *Salix* spp, *Aesculus hippocastanum* L, *Picea* spp, *Fraxinus* spp, kemudian resin ini bercampur dengan saliva dan berbagai enzim yang ada pada lebah sehingga menjadi resin yang berbeda dengan resin asalnya (2, 3).

Ada lima alasan mengapa propolis digunakan sebagai suplemen: (1) Lebih dari 180 zat-zat fitokimia ada di dalam propolis antara lain flavonoid, berbagai turunan asam organik, fitosterol, terpenoid. Zat-zat ini terbukti memiliki berbagai sifat anti-inflamasi, antimikroba, antihistamin, antimutagenik dan antialergi. (2) Kandungan kimia propolis yang meningkatkan tumbuhnya jaringan antara lain adalah sebagai akibat dari

sifat penguat jaringan dan efek regeneratif dari quersetin, kaemferol, epigenin dan luteolin. (3). Aktivitas antibiotika dari propolis antara lain berasal dari turunan asam organik seperti sinamat, ferulat, benzoat, kafeat, kumarin, terpen dan turunan-turunan berikutnya seperti limonen, p-simen, eugenol, galangin dan quersetin. (4) Sifat antifungal berasal dari pinosembrin, quersetin, sakauranetin dan lainnya. (5) Sifat antivirus, anti tumor serta anti kanker propolis yang berasal dari Artepillin C dan turunan-turunan asam organik seperti fenetil kafeat (CAPE) (4, 5).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan diantaranya di Brazil, Selandia Baru, dan Jepang, menyatakan bahwa dalam ekstrak etanol propolis terdapat kandungan CAPE terbanyak (6-7%) yang berasal dari Selandia Baru, sedangkan kandungan Artepillin C terbanyak (> 5%) berasal dari Brazil (6, 7, 8).

Penelitian yang dilakukan oleh suatu lembaga di Indonesia menyatakan bahwa ada beberapa aktivitas komponen yang terkandung didalam ekstrak propolis, salah satunya adalah aktivitasnya sebagai anti kanker, benzil kafeat dan fenetil kafeat yang telah diuji terhadap semua jenis sel kanker, terutama terhadap colon 26-L5 carcinoma, dengan konsentrasi efektif yang dapat membunuh 50% sel kanker (EC50), masing-masing sama dengan 1,01 μM dan 0,30 μM . Nilai ini hampir sama atau sama dengan EC50 dari 5-fluorouracil, salah satu kemoterapi anti kanker yang telah digunakan dalam kedokteran modern (2).

Menurut penelitian yang telah dilakukan dalam menetapkan metode-metode untuk menganalisis keberadaan Artepillin C dan CAPE dalam suatu sediaan, menggunakan peralatan yang lebih canggih antara lain Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan *Photodiode Array Detector* (PDA), *High Performance Thin Liquid Chromatography* (HPTLC), Kromatografi Gas (KG), dan spektrometer massa. Salah satu cara analisis Artepillin C dan CAPE yang paling banyak digunakan adalah dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (8, 9, 29).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi adalah metode yang sesuai untuk menguji keberadaan Artepillin C dan CAPE, dalam kebanyakan produk. Karena dalam analisisnya biasanya dipengaruhi oleh beberapa senyawa lainnya (aglikon flavonoid, fenolat aldehyd, turunan polifenol) maka dari itu sampel dibuat dalam konsentrasi yang tinggi, selain itu ada beberapa peneliti telah melakukan percobaan tersebut dengan menggunakan metode KCKT (3).

Tujuan dengan mengetahui adanya CAPE dan Artepillin C dalam sediaan propolis yang selama ini sudah beredar di Indonesia khususnya di Jakarta tersebut, sehingga dapat dikatakan sebagai antikanker. Sejauh ini metode yang digunakan untuk analisis kedua zat tersebut pada umumnya adalah menggunakan *HPLC-MS* dan bergradien serta dilengkapi dengan detektor PDA, namun pada penelitian ini akan dicoba dilakukan validasi terhadap analisis CAPE dan Artepillin C secara KCKT. Pada penelitian

ini, sampel yang digunakan dalam bentuk cairan yang sudah terekstraksi sehingga dilakukan pengenceran dengan menggunakan pelarut tertentu dan dengan konsentrasi tertentu, sehingga hasil pengenceran tersebut dapat dianalisa dengan menggunakan KCKT.

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Menentukan kondisi yang optimum dan melakukan validasi metode analisis Artepillin C dan CAPE dengan metode KCKT.
2. Menganalisis Artepillin C dan CAPE dalam beberapa sampel sediaan propolis yang beredar dipasaran yang berasal dari Indonesia, Australia, Brazil, dan Selandia Baru.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. LEBAH MADU

Lebah madu adalah salah satu jenis serangga dari sekitar 20.000 spesies lebah. Saat ini ada sekitar tujuh spesies lebah madu yang dikenal dengan sekitar 44 subspecies. Semua spesies ini termasuk dalam genus *Apis*, salah satunya *Apis mellifera* merupakan lebah paling unggul dalam memproduksi madu yang berasal dari Eropa. Mereka memproduksi dan menyimpan madu yang dihasilkan dari nektar bunga. Selain itu mereka juga membuat sarang dari lilin, yang dihasilkan oleh para lebah pekerja di koloni lebah madu. Lebah madu yang ada di alam Indonesia adalah *A. andreniformis*, *A. cerana* dan *A. dorsata*, serta khusus di Kalimantan terdapat *A. koschevnikovi* (10).

Sebagaimana diketahui, sumber makanan lebah adalah sari madu bunga (nektar), yang tidak dijumpai pada musim dingin. Oleh karena itu, lebah mencampurkan nektar yang mereka kumpulkan pada musim panas dengan cairan khusus yang dikeluarkan tubuh mereka. Campuran ini menghasilkan zat bergizi yang baru, yaitu madu dan menyimpannya untuk musim dingin mendatang. Upaya lebah menjaga mutu madu tidak terbatas hanya pada pengaturan kelembaban dan panas. Didalam sarang terdapat jaringan pemeliharaan kesehatan yang sempurna untuk mengendalikan

segala peristiwa yang mungkin menimbulkan bakteri. Prinsipnya adalah mencegah zat-zat asing masuk sarang. Untuk itu, dua penjaga selalu ditempatkan pada pintu sarang. Jika suatu zat asing atau serangga memasuki sarang walau sudah ada tindakan pencegahan ini, semua lebah bertindak untuk mengusirnya dari sarang (11).

Untuk benda asing yang lebih besar yang tidak dapat dibuang dari sarang, digunakan cara pertahanan lain. Lebah membalsam benda asing tersebut. Mereka menghasilkan suatu zat yang disebut propolis (getah lebah) untuk pembalsaman. Getah lebah ini dihasilkan dengan cara menambahkan cairan khusus yang mereka keluarkan dari tubuh kepada getah yang dikumpulkan dari pohon-pohon seperti pinus, hawwar, dan akasia. Getah lebah juga digunakan untuk menambal keretakan pada sarang. Setelah ditambalkan pada retakan, getah tersebut mengering ketika bereaksi dengan udara dan membentuk permukaan yang keras. Dengan demikian sarang dapat bertahan dari ancaman luar (11).

B. PROPOLIS

1. Sejarah propolis

Kata propolis sendiri berasal dari kombinasi dua kata dalam bahasa Yunani yaitu, "*pro*" artinya pertahanan, dan "*polis*" yang berarti kota, dengan demikian propolis artinya pertahanan kota atau sarang.

Penggunaan propolis mempunyai sejarah yang panjang dan telah digunakan sejak lebih kurang 300 tahun sebelum Masehi dan sampai abad ke-21 sekarang ini masih tetap digunakan sebagai obat dalam rumah tangga. Propolis digunakan sebagai obat sebenarnya sudah dilakukan sejak abad ke-12. Orang-orang Yunani dan Romawi telah menggunakan propolis untuk mengobati bengkak. Orang Mesir selain menggunakan propolis sebagai obat, juga memakainya sebagai perekat pada pembuatan kano (12).

Bagi lebah sendiri propolis berfungsi melindungi seluruh sarang dan tempat lebah ratu menyimpan telurnya dari hama yang menyebabkan kebusukan telur-telurnya yaitu *Bacillus larvae*. Hal inilah yang mendasari digunakannya propolis sebagai antibiotika. Propolis juga telah populer sebagai makanan kesehatan di berbagai belahan dunia, termasuk Amerika, Jepang dan negara-negara di Eropa, digunakan untuk meningkatkan kesehatan dan membantu mencegah berbagai macam penyakit seperti inflamasi, sakit jantung, diabetes, dan kanker. Kandungan kimia dari propolis tergantung pada tumbuh-tumbuhan di daerah tempat propolis tersebut dikumpulkan. Propolis yang berasal dari Eropa, Amerika Utara dan Amerika Selatan, Asia, dan Afrika berbeda dalam komposisi kandungannya. Hingga saat ini lebih dari 300 senyawa kimia telah diidentifikasi dari propolis, diantaranya adalah senyawa-senyawa fenol seperti flavonoid dan turunan asam sinamat telah dilaporkan sebagai komponen utama dari propolis (12).

2. Penggunaan dari Propolis

Penelitian yang telah dilakukan terhadap hewan coba yaitu mencit jantan, menyatakan bahwa propolis dan komponen kimianya telah dilaporkan mempunyai beberapa aktivitas biologis seperti antikanker, antioksidan, antiinflamasi, antiseptik, anti-jamur, antibakteri, astringent, spasmolitik, dan anestetik lokal. Sediaan propolis juga telah digunakan untuk penyembuhan luka, regenerasi jaringan, penyembuhan luka bakar, penyakit kulit yang menahun, herpes simplex dan genital, dan beberapa penyakit kulit lain. Disamping itu juga digunakan untuk membantu mengatasi nyeri pada reumatik, keseleo, dan sakit gigi (*toothache*), karena efek anestetik lokalnya yang dikatakan lima kali lebih efektif dari kokain (2).

Ekstrak etanol dari propolis yang dikumpulkan dari beberapa propinsi di China telah dilaporkan dapat menghambat aktivitas hyaluronidase, suatu enzim penyebab inflamasi. Ekstrak yang sama juga pada konsentrasi 0,003%, mampu menghambat lebih dari 80% pelepasan histamin. Pada konsentrasi 10 mg/kg, propolis secara signifikan mengurangi peningkatan serum GOT, GPT, TG, dan HTG pada kerusakan liver yang diinduksi oleh pemberian alkohol secara kronik pada tikus. Ekstrak etanol propolis yang berasal dari Cina juga dilaporkan dapat mengobati luka (tukak) pada lambung dan mengurangi keasaman lambung yang berlebih, sedangkan terhadap ekstrak metanol dari propolis asal Cina menunjukkan aktivitas antikanker yang sangat potent. (2).

3. Kandungan kimia propolis

Tabel 1.
Komponen kimia propolis (13)

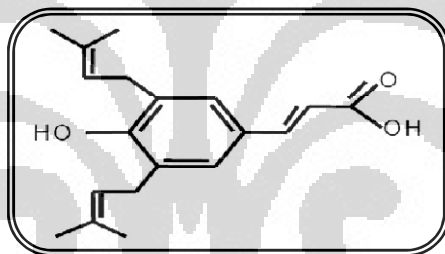
Komponen kimia	Komponen grup	Jumlah
Resin	Flavonoid, asam fenolik, ester	45-50%
Lilin dan asam lemak	Lilin lebah	23-35%
<i>Essensial oil</i>	Minyak atsiri	10%
Pollen	Protein arginin dan prolin	5%
Senyawa organik dan mineral lain	14 <i>trace minerals</i> , umumnya Fe dan Zn, lainnya Au, Ag, Hg, Cs, La, Sb Keton, lakton, kuinon, steroid, asam benzoat, vitamin (B3), dan gula	5%

Komponen-komponen lain, dari hasil ekstraksi, isolasi dan elusidasi struktur kimianya ditemukan 14 senyawa murni berupa: 1. krisin, 2. galangin, 3. izalpinin, 4. apigenin, 5. ekhtokrisin, 6. pinostrobin, 7. pinosembrin, 8. asam isoferulat, 9. 3,4-asam dimetoksisinamat, 10. benzil ferulat, 11. benzil kafeat, 12. fenetil kafeat (CAPE), 13. Artepillin C termasuk dua senyawa baru turunan flavonoid, 14. 3-O-[(S)-2-metilbutiroil]pinobanksin, dan 15. 6-sinamilkrisin (2, 14).

Kelebihan propolis dibanding antibiotika lainnya adalah efek sampingnya yang kecil. Satu-satunya efek samping yang terjadi dan itu pun jarang yaitu timbulnya reaksi alergi bila digunakan secara lokal. Sedangkan bila diberikan per oral tidak ada efek samping yang terjadi (12).

Kelebihan lain yaitu tidak menimbulkan resistensi. Sifat antivirus dan antikanker propolis yang berasal dari turunan-turunan asam organik seperti CAPE, yang memiliki khasiat mencegah kanker usus besar, penyakit yang menewaskan 60.000 orang Amerika setiap tahun. Sedangkan dari yayasan kesehatan di Amerika melaporkan dalam *Cancer Research* bahwa CAPE mencegah pembentukan jaringan bakal kanker pada tikus yang terkena bahan kimia pemicu kanker (4, 12).

C. ARTEPILLIN C



Gambar 1. Rumus struktur Artepillin C

Data fisika-kimia (15)

Nama IUPAC : asam 3-(4-hidroksi-3,5-bis(3-metil-2-butenil)fenil)-2-propenoat

Nama lain : Artepillin C (ARC)

Pemerian : serbuk kristal putih, hampir putih

Kemurnian : 98%

Rumus molekul : $C_{19}H_{24}O_3$

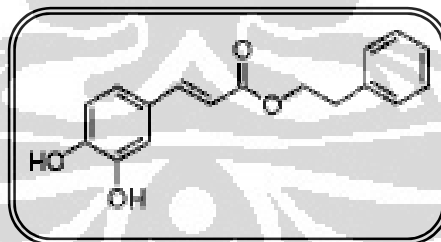
Berat molekul : 300,39 gram/mol

Kelarutan : metanol

ARC merupakan suatu serbuk kristal putih, yang larut dalam metanol. Rumus molekul dari Artepillin C adalah $C_{19}H_{24}O_3$ dengan berat molekul 300,39 gram/mol, dan disimpan pada suhu 2-10°C, dan hindari kontak langsung dengan cahaya matahari (15).

Artepillin C merupakan komponen aktif biologis yang terkandung dalam suplemen propolis, yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba, immunomodulator, antioksidan, induktor apoptosis, antitumor dan antikanker. Penelitian secara *in vitro* menunjukkan bahwa Artepillin C memiliki efek sitotoksik pada kanker sel saluran cerna, kanker sel paru-paru, dan secara *in vivo* terhadap kanker sel usus (16, 17).

D. FENETIL KAFEAT (CAPE)



Gambar 2. Rumus struktur asam kafeat fenetil ester

Data fisika-kimia (18, 19)

Nama IUPAC : 3-(3,4-Dihidroksifenil)-2-asam propenoat 2-feniletil ester

Nama lain : Caffeic acid phenethyl ester (CAPE),

Fenetil kafeat

Pemerian : serbuk putih

Kemurnian : >99%

Rumus molekul : $C_{17}H_{16}O_4$

Berat molekul : 284,31 gram/mol

Kelarutan : etanol, DMSO, aseton atau asetonitril

CAPE merupakan suatu serbuk putih, yang larut dalam DMSO, etanol, aseton atau asetonitril, dan tidak larut dalam air. Rumus molekul dari CAPE adalah $C_{17}H_{16}O_4$ dengan berat molekul 284,31 gram/mol, dan disimpan pada suhu $-20^{\circ}C$, serta ketidakersatukan dengan agen pengoksida yang kuat dan kontak langsung dengan cahaya matahari (19).

Fenetil kafeat adalah faktor penghambat spesifik dari transkripsi inti, NF- κ B. CAPE secara signifikan dapat menekan jalan enzim lipooksigenase dari metabolisme asam arakidonat selama terjadi inflamasi. CAPE menghambat HIV-1 integrase, dan juga menghambat proliferasi dari sel yang telah bertransformasi. CAPE menginduksi apoptosis pada fibroblast yang telah bertransformasi, dan mempengaruhi sinyal transduksi EGF sehingga mengaktifkan protein c kinase dan ornithin dekarboksilase (19).

Sampai saat ini hanya sedikit yang diketahui mengenai seberapa efektif CAPE diabsorpsi setelah pemberian oral. Namun, ada beberapa penelitian terbaru mengenai CAPE yang diberikan secara oral. Beberapa peneliti, telah mengembangkan dan memvalidasi metode analisis baru untuk menentukan CAPE dalam plasma dan urin tikus. Mereka menunjukkan CAPE

diabsorpsi dengan cepat dan diekskresi melalui urin sebagai molekul yang tak termodifikasi dan sebagai konjugat glukoronida walaupun dalam jumlah yang sedikit bila dibandingkan dengan jumlah yg diberikan. Efek CAPE pada sistem imun tikus menunjukkan kapasitas immunomodulator ketika diberikan secara oral. CAPE telah menunjukkan dapat mengurangi risiko aterosklerosis pada tikus setelah pemberian oral. CAPE telah diabsorpsi dengan cepat tetapi juga cepat dimetabolisme dan diekskresi. Namun, penelitian pada binatang menunjukkan pemberian oral CAPE berhubungan dengan efek biologi *in vivo* yang juga dapat didemonstrasikan secara *in vitro* (20).

E. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi merupakan teknik analisis yang paling cepat berkembang dalam kimia analitik. Penggunaannya yang sangat banyak terdiri atas berbagai metode dalam kromatografi cair (21).

1. Metode dalam kromatografi cair dibagi atas dua macam: (21)

a. Kromatografi Cair Retensif

Pemisahan dicapai melalui interaksi antara zat terlarut dengan fase diam. Tipe ini mencakup fase normal, fase terbalik, kromatografi ion.

b. Kromatografi Cair Non Retensif

Pemisahan yang dicapai tergantung pada perbedaan besar molekul zat terlarut dimana terjadi interaksi antara zat terlarut dengan pori-pori yang

terdapat di permukaan fase diam. Tipe ini dikenal sebagai kromatografi eksklusi.

2. Keuntungan KCKT antara lain: (21)

a. Waktu analisis cepat

Waktu yang diperlukan biasanya kurang dari 1 jam, seringkali hanya 15 menit hingga 30 menit. Untuk analisis yang mudah, waktu yang diperlukan kurang dari 5 menit.

b. Daya pisah baik

c. Peka

Kepekaannya sangat tergantung pada jenis detektor dan eluen yang digunakan.

d. Pemilihan kolom dan eluen bervariasi

e. Kolom dapat dipakai kembali

f. Dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil

g. Mudah memperoleh kembali cuplikan

Tidak seperti kebanyakan detektor dalam kromatografi gas, detektor KCKT tidak merusak komponen zat yang dianalisis, sehingga zat yang dielusi dapat dikumpulkan dengan mudah setelah melewati detektor.

h. Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah

Hal ini sangat bergantung kepada detektor yang digunakan, namun detektor KCKT dapat mendeteksi zat sampai dengan kadar ppm (part per million).

3. Instrumentasi (21)

Alat KCKT terdiri dari beberapa bagian, yaitu pompa, injektor, kolom, detektor, dan integrator.

a. Pompa

Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluen ke dalam kolom. Pompa, segel-segel pompa dan semua penghubung dalam sistem kromatografi harus terbuat dari bahan yang secara kimiawi tahan terhadap fase gerak. Bahan yang umum digunakan adalah gelas, baja nirkarat, Teflon, dan batu nilam. Pada sistem kromatografi cair yang relatif murah membutuhkan pompa yang dapat menghasilkan tekanan minimal 103 atmosfer.

Jenis-jenis pompa:

1) Pompa tekanan tetap

Pompa ini merupakan tipe yang paling populer karena harganya relatif tidak mahal dan dapat bekerja pada berbagai kecepatan alir.

Karakter dari pompa ini adalah:

- a) Kecepatan alir dapat bervariasi dengan mengubah volume penarikan setiap siklus penarikan oleh pompa.
- b) Pengaliran eluen dapat dilakukan secara kontinyu.
- c) Tidak ada batasan pada ukuran penampung eluen ataupun waktu operasi.
- d) Perubahan eluen cepat dan akurat.
- e) Harus menggunakan suatu tipe peredam pulsa aliran eluen.

2) Pompa semprit

Pompa ini menggunakan satu piston yang bekerja menghasilkan suatu aliran yang konstan.

Karakter dari pompa ini adalah:

- a) Aliran eluen dikontrol dengan mengubah tegangan pada motor digital.
- b) Kapasitas penampung eluen terbatas (250-500 ml).
- c) Aliran tanpa pulsa dapat dicapai.
- d) Dapat dihasilkan tekanan yang relative lebih tinggi (207-483 atm).
- e) Gradasi eluen dapat dicapai menggunakan dua atau lebih pompa yang di operasikan bersama-sama.

3) Pompa tekanan uap

Pompa ini menggunakan piston besar yang digerakkan oleh tenaga gas. Pompa ini telah jarang digunakan.

Karakter pompa ini adalah:

- a) Sumber tekanan gas yang rendah (1-10 atm) dapat menghasilkan tekanan yang besar (hingga 400 atm), dikarenakan perbedaan luas dari kedua piston.
- b) Aliran eluen tanpa pulsa dapat dicapai.
- c) Laju alir yang cepat dapat dicapai bagi tujuan preparatif.
- d) Gradasi elusi terjadi dan dirasakan sangat tidak menguntungkan.

b. Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom.

Jenis-jenis injektor:

1. Aliran henti

Aliran dihentikan, penyuntikkan dilakukan pada tekanan atmosfer, setelah sistem ditutup aliran dilanjutkan kembali.

2. Septum

Merupakan injektor langsung pada aliran, dapat dipakai pada tekanan sampai 60-70 atm tetapi tidak dapat dipakai untuk pelarut kromatografi cair.

3. Katup jalan kitar

Biasa dipakai untuk menyuntikkan volume yang lebih dari 10 μ l.

4. Auto injektor

Merupakan otomatisasi dari katup jalan kitar.

c. *Guard* kolom

Partikulat yang berasal dari sampel dan eluen dapat menyumbat kolom sehingga aliran eluen terganggu. Penyebabnya adalah sampel yang kotor ataupun eluen yang terkontaminasi.

Guard kolom bertindak sebagai penyaring kimia untuk menahan material yang mungkin dapat merusak atau menyumbat kolom yang berakhir dengan memendeknya umur kolom. Dengan panjang 1-5 cm dan berisikan fase diam yang mirip dengan kolom, *guard* kolom diletakkan diantara injektor dan kolom. *Guard* kolom harus memiliki diameter dalam yang sama dengan kolom yang digunakan.

Fase gerak atau eluen dan sampel harus selalu disaring melalui membran 0,45 μm , khususnya jika mereka mengandung dapar, garam-garam atau senyawa kimia yang sukar larut. Hanya perlu *HPLC grade* yang tidak perlu disaring.

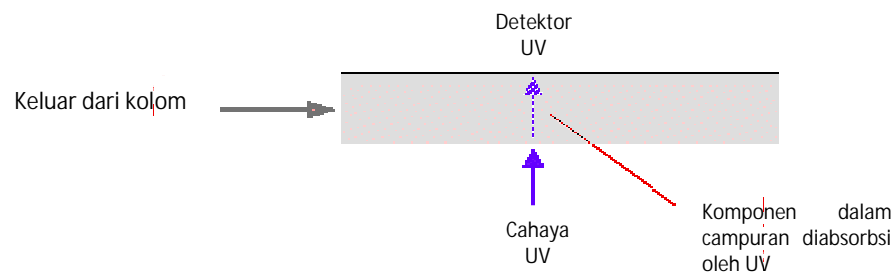
d. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen yang terdapat di dalam sampel yang dianalisis. Untuk menahan tekanan tinggi, kolom dibuat dari bahan yang kuat seperti *stainless steel* atau campuran logam dengan gelas. Terdapat dua jenis kolom, yaitu kolom analitik dan kolom preparatif. Kolom analitik memiliki diameter dalam yang lebih besar yakni 6 mm atau lebih dan dapat dipakai untuk ukuran cuplikan yang lebih besar.

e. Detektor (21, 22)

Detektor berfungsi untuk mengidentifikasi komponen-komponen sampel di dalam fase gerak dan mengukur jumlahnya. Ada beberapa cara untuk mendeteksi substansi yang telah melewati kolom. Metode umum yang mudah dipakai untuk menjelaskan yaitu penggunaan serapan ultra-violet.

Banyak senyawa-senyawa organik menyerap sinar UV dari beberapa panjang gelombang. Jika menyinarakan sinar UV pada larutan yang keluar melalui kolom dan sebuah detektor pada sisi yang berlawanan, maka akan mendapatkan pembacaan langsung berapa besar sinar yang diserap.



Gambar 3. Detektor UV

Macam-macam detektor yang dapat digunakan yaitu :

1. Detektor serapan optik

Digunakan untuk mendeteksi komponen zat yang menyerap cahaya di daerah ultraviolet (190-400 nm), cahaya tampak (400- 700 nm) dan infrared (2-25 μm). Fase gerak yang digunakan harus tidak memiliki serapan atau hanya memiliki serapan atau hanya memiliki serapan yang kecil pada panjang gelombang analisis.

2. Detektor spektrofotometri UV-Vis

Detektor jenis ini merupakan detektor yang paling banyak digunakan dan sangat berguna untuk analisis dibidang farmasi karena kebanyakan senyawa obat mempunyai struktur yang dapat menyerap sinar UV-Vis. Detektor ini didasarkan pada adanya penyerapan radiasi ultraviolet (UV) dan sinar tampak (Vis) pada kisaran panjang gelombang 190-800 nm oleh spesies solute yang mempunyai struktur-struktur atau gugus-gugus kromoforik.

3. Detektor indeks bias

Memberikan respon akibat perubahan indeks bias yang disebabkan oleh cuplikan.

4. Detektor fluoresensi

Digunakan untuk mendeteksi komponen-komponen zat yang dapat berfluoresensi. Akan tetapi dapat juga digunakan untuk komponen yang tidak berfluoresensi, namun komponen tersebut harus diderivatisasi terlebih dahulu dengan penggunaan reagen yang sesuai. Detektor fluoresensi lebih sensitif jika dibandingkan dengan detektor UV-Vis.

5. Detektor elektrokimia

Pendeteksian tergantung pada sifat hantaran molekul zat terlarut. Deteksi dimungkinkan apabila terjadi transfer secara reversibel oleh suatu zat melalui gugus fungsional tertentu. Detektor ini relatif selektif karena hanya komponen polar saja yang dapat dideteksi.

6. Detektor *evaporative light scattering* (ELSD)

Detektor ini lebih sensitif jika dibandingkan dengan detektor indeks bias, dengan batas deteksi 5 ng/25 μ l. Keuntungan utama menggunakan detektor ini adalah detektor ini memiliki respon yang sama untuk semua zat yang tidak menguap.

7. Detektor spektrometri massa

8. Detektor *photodiode-array* (PDA)

Detektor PDA merupakan detektor UV-Vis dengan berbagai keistimewaan. Detektor ini mampu memberikan kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses (*single run*). Selama proses berjalan, suatu kromatogram pada panjang gelombang yang diinginkan (biasanya antara 190-400) dapat ditampilkan. Dengan demikian PDA lebih banyak menghasilkan informasi komposisi sampel dibandingkan dengan detektor UV-Vis. Dengan detektor ini, juga diperoleh spektrum UV tiap puncak yang terpisah sehingga dapat dijadikan sebagai alat yang penting untuk memilih panjang gelombang maksimal untuk sistem KCKT yang digunakan. Dan akhirnya dengan detektor ini pula, dapat dilakukan uji kemurnian puncak dengan membandingkan antara spektra analit dengan spektra senyawa yang sudah diketahui.

f. Integrator

Integrator berfungsi untuk menghitung luas puncak.

Ada 2 macam integrator, yaitu:

- Integrator piringan yang bekerja secara mekanik
- Integrator digital atau elektronik, dapat memberikan ketelitian tinggi dan waktu integrasi yang singkat.

4. Teori Kolom (21)

a. Efisiensi kolom

Efisiensi kolom menunjukkan kemampuan kolom untuk menghasilkan puncak sempit dan perbaikan pemisahan. Efisiensi kolom diketahui dengan menghitung jumlah plat teori (N) dan panjang kolom yang sesuai dengan *theoretical plate* (*Height Equivalent to a Theoretical Plate*, HETP). Yang dimaksud dengan HETP adalah panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom. Kolom yang baik memiliki HETP yang kecil dan N yang besar.

$$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2$$

$$HETP = \frac{L}{N}$$

Keterangan :

N = Jumlah pelat teoritis

HETP = Panjang lempeng teoritik

t_R = Waktu retensi

W = Lebar puncak

L = Panjang kolom

b. Resolusi

Merupakan suatu ukuran apakah suatu senyawa terpisah secara baik atau tidak dengan senyawa lainnya. Resolusi didefinisikan sebagai jarak (t_R) antara dua puncak dibagi rata-rata lebar (W) dua puncak yang diukur pada alas puncak.

$$R = \frac{2(t_{RA} - t_{RB})}{(W_A + W_B)}$$

Keterangan :

R = Resolusi

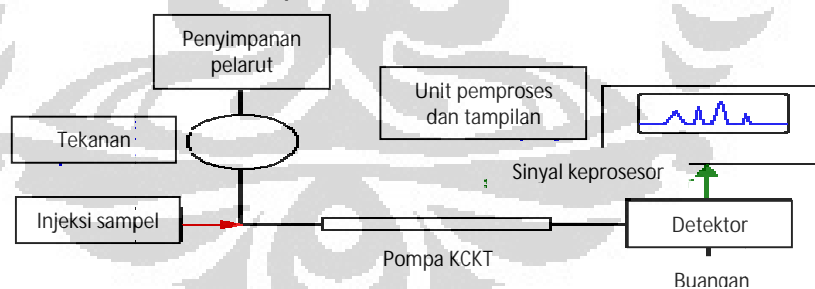
t_{RB} = Waktu retensi spesi B

t_{RA} = Waktu retensi spesi A

W_B = Lebar puncak spesi B

W_A = Lebar puncak spesi A

Pemisahan dikatakan baik apabila nilai resolusi lebih besar dari 1,5.



Gambar 4. Diagram alir HPLC

5. Fase Gerak (21)

Tidak seperti dalam kromatografi gas, fase gerak pada KCKT merupakan salah satu pengubah yang mempengaruhi pemisahan. Variasi

fase gerak pada KCKT sangat beragam dalam hal kepolaran dan selektifitasnya terhadap komponen dalam sampel. Keragaman fase gerak inilah yang membuat KCKT lebih disukai daripada KG.

Fase gerak yang baik harus mempunyai sifat-sifat sebagai berikut:

- Murni
- Tidak bereaksi dengan kolom
- Sesuai dengan detektor
- Dapat melarutkan cuplikan
- Selektif terhadap komponen
- Viskositasnya rendah
- Memungkinkan dengan mudah untuk memperoleh cuplikan kembali bila diperlukan
- Harganya wajar
- Dapat memisahkan dengan baik

6. Analisis Kuantitatif (23)

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu:

a. Baku luar

Dibuat kurva kalibrasi antara luas puncak terhadap konsentrasi dari berbagai macam konsentrasi larutan sampel yang akan dianalisis, disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kadar sampel yang diperoleh dengan

cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi atau perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan.

b. Baku dalam

Baku dalam dapat digunakan untuk memperbaiki ketelitian. Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan dihitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Dibuat kurva antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar.

Keuntungan metode ini adalah kesalahan pada volume injeksi dapat dieliminir. Kesulitan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat.

Syarat baku dalam yang ideal:

- Murni dan mudah diperoleh
- Tidak terdapat dalam sampel atau cuplikan
- Mempunyai puncak yang terpisah baik dari cuplikan
- Mempunyai sifat fisikokimia yang mirip dengan cuplikan
- Tidak bereaksi dengan cuplikan dan fase gerak
- Bukan merupakan metabolit dari cuplikan
- Mempunyai respons detektor yang hampir sama dengan cuplikan pada konsentrasi yang digunakan

- Harus terelusi dekat dengan puncak yang diukur.

7. Kesesuaian Sistem (24)

Pada penggunaan metode kromatografi, seperti kromatografi cair kinerja tinggi atau kromatografi gas, umumnya dikehendaki adanya kepastian kesesuaian dan keefektifan sistem operasional yang digunakan. Untuk memastikan keefektifan sistem operasional akhir, perlu dilakukan uji kesesuaian sistem sebelum digunakan. Pada hakekatnya pengujian semacam itu didasarkan atas konsep bahwa elektronik, peralatan, zat uji, dan kondisi operasional analitik membentuk suatu sistem analitik tunggal yang dapat diuji fungsinya secara keseluruhan. Data spesifik dikumpulkan dari penyuntikan ulang larutan uji dan larutan baku. Data-data ini disesuaikan terhadap nilai maksimum dan minimum, seperti efisiensi, presisi internal, faktor ikutan, resolusi, waktu retensi, bentuk kurva kalibrasi, respons dan perolehan kembali, seperti yang tertera pada masing-masing monografi.

Suatu parameter yang berguna adalah keberulangan dari penyuntikan ulang larutan baku, yang paling baik dinyatakan dalam simpangan baku relatif. Penyuntikan ulang larutan baku umumnya tertera dalam masing-masing monografi, hasil pengukurannya diperbandingkan untuk memastikan apakah persyaratan presisi telah dipenuhi. Bila tidak dinyatakan lain dalam masing-masing monografi, untuk perhitungan digunakan data kromatogram lima kali hasil penyuntikan ulang, jika dinyatakan batas simpangan baku relatif 2,0% atau kurang, dan digunakan data kromatogram penyuntikan

ulang enam kali, jika dinyatakan batas simpangan baku relatif lebih dari 2,0%.

Faktor ikutan bermanfaat untuk membatasi asimetri yang diperbolehkan. Faktor ikutan (T_f) didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak, $W_{0,05}$, dibagi oleh dua kali jarak f , dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak, jarak-jarak tersebut diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar. Untuk suatu puncak yang simetris, faktor ikutan (T_f) besarnya satu, dan besarnya harga ini akan bertambah, jika kromatogram makin tampak berekor. Meningkatnya keasimetrisan dari puncak akan menyebabkan presisi kurang dapat dipercaya.

Harga resolusi (R), merupakan fungsi efisiensi kolom, N , untuk memastikan terpisahnya komponen-komponen yang terelusi berdekatan, untuk memastikan efisiensi pemisahan sistem secara umum, serta untuk memastikan baku internal terpisah dari obat.

Uji kesesuaian sistem harus dilaksanakan sebelum injeksi sampel, pada setiap adanya perubahan signifikan dalam peralatan atau reagen penting. Analisis sampel tidak dapat diterima bila ketentuan dari kesesuaian sistem tidak terpenuhi.

F. VALIDASI METODE ANALISIS (21, 27)

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya.

Validasi metode diperlukan dalam suatu proses analisis untuk memastikan hasil analisis dapat dipertanggungjawabkan. Suatu metode analisis perlu divalidasi apabila metode tersebut baru dikembangkan untuk suatu permasalahan khusus. Validasi juga dilakukan jika ada revisi dari metode yang sudah ada untuk memecahkan suatu permasalahan analisis yang baru. Selain itu proses validasi juga diperlukan jika diterapkan metode rutin pada laboratorium yang berbeda dengan alat dan oleh analis yang berbeda pula. Seiring dengan berjalannya waktu, proses validasi metode juga perlu dilakukan untuk memastikan bahwa metode tersebut masih dapat diandalkan.

Ada beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis. Untuk menentukan parameter-parameter yang digunakan, perlu diperhatikan tujuan dari penelitian yang akan dilakukan. Parameter yang sering digunakan untuk pengembangan metode analisis antara lain kecermatan (*accuracy*), keseksamaan (*precision*), selektifitas (spesifisitas), linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi, ketangguhan (*ruggedness*), serta kekuatan (*robustness*).

1. Kecermatan

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan dilakukan dengan dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked placebo recovery*) atau metode penambahan bahan baku (*standard addition method*).

Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis kembali.

Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel placebo (eksipten obat, cairan biologos) kemudian ditambahkan analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi.

2. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen.

3. Selektifitas

Selektifitas suatu metode adalah kemampuan metode tersebut untuk mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektifitas seringkali dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cecaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan.

4. Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linearitas yang dapat diterima. Dalam praktik digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50-150 % kadar analit dalam sampel.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai bila nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 tergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung yaitu simpangan baku residual (S_y), sehingga nantinya akan diperoleh standar deviasi fungsi regresi (S_{x_0}) dan koefisien variasi fungsi regresi (V_{x_0}).

Syarat-syarat dari kelinearan garis yaitu :

- 1) Koefisien korelasi (r) $\geq 0,9990$
- 2) Jumlah kuadrat sisa masing-masing titik temu (r_i) mendekati nol (0), $(r_i)^2$ sekecil mungkin ≈ 0 . r_i diperoleh dari : $R_i = y_i - (bx_i + a)$
- 3) Koefisien fungsi regresi (V_{x_0}) $\leq 2,0\%$ untuk sediaan farmasi dan $\geq 5,0\%$ untuk sediaan biologi.

4) Kepekaan analisis ($\Delta y/\Delta x$)

$$\frac{\Delta}{\Delta} = \frac{2 - 1}{2 - 1} \approx \frac{3 - 2}{3 - 2} \approx \frac{- -1}{- -1}$$

5. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Sedangkan batas kuantitasi adalah kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui regresi linier dari kurva kalibrasi.

6. Perolehan kembali (*Recovery*)

Perolehan kembali suatu analit adalah perbandingan antara respons detektor yang diperoleh dari sejumlah analit yang ditambahkan ke dan diekstraksi dari sampel dengan respons detektor yang diperoleh dari kadar sebenarnya dari standard murni. Perolehan kembali analit tidak harus 100%, tetapi tingkat perolehan kembali analit dan baku dalam harus konsisten, presisi, dan dapat terulang (*reproducible*). Uji perolehan kembali dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel pada tiga rentang kadar (rendah, sedang, dan tinggi) dengan standard murni yang mewakili perolehan kembali 100%.

G. ANALISIS ARTEPILLIN C DAN ASAM KAFEAT FENETIL ESTER

Beberapa contoh analisis yang telah dilakukan antara lain:

1. Analisis propolis dari suatu benua dan daerah Adriatik Kroasia (3)

Kondisi analisis

Kolom : Lichrochart® RP-18, (12.5 x 0.4 cm, 5 µm);

binary LC pump

Fase gerak : Asetonitril : asam asetat 10% (36:75) (A)
dan asetonitril : asam asetat 10% (45:55) (B)

pH akhir = 2,64

bergradien: pada menit ke-30 diubah fase gerak

A menjadi fase gerak B

Laju alir : 1 mL min⁻¹

Vol. Injeksi : 10 µL

Detektor : PDA

2. Kandungan flavonoid dari propolis yang berasal dari bagian barat Romania dan hubungannya dengan aktifitas antioksidan (25)

Kondisi analisis

Kolom : Zorbax® SB-C18 column (250mm x4.6mm,5µm)

Fase gerak : asetonitril : air (48 : 52)

Laju alir : 0,3 mL min⁻¹

Vol. Injeksi : 20 µL

Detektor : PDA

3. Penetapan kadar asam fenolat yang terpilih didalam propolis terkonsentrat dalam hal standarisasi untuk pembuatan obat secara KCKT (9)

Kondisi analisis

Kolom : Lichrosphere® 100 RP18e (250 x 4 mm, 5 µm)
dengan guard column 100 RP18e (4 x 4 mm)

Fase gerak : 0,03 mM NaH₂PO₄.H₂O diasamkan dengan
H₃PO₄ (pH akhir 3): asetonitril (7:3)

Laju alir : 1,0 mL min⁻¹

Vol. Injeksi : 20 µL

Detektor : PDA

4. Analisis propolis dari *Baccharis dracunculifolia* DC (compositae) and efek yang terjadi pada fibroblas tikus (26)

Kondisi analisis

Kolom : SHIM-PACK CLC-ODS® C-18 column
(250mm×4.6 mm; 5µm)

Fase gerak : aquadest : asam asetat (19:1) (pelarut A) dan
methanol (pelarut B)
bergradien: 70–60% A (0–15 min), 60–50% A
(15–30 min), 50–40%, A (30–45 min), 40–25% A
(45–65 min), 25% A (65–85 min), 25–10% A

(85–95 min), 10–70% A (95–105 min) and 70%
A (105–115 min)

Laju alir : 1,0 mL min⁻¹

Vol. Injeksi : 20 µL

Detektor : PDA

5. Metode validasi kuantifikasi Artepillin C yang berasal dari propolis Brazil
(28)

Kondisi Analisis

Kolom : RP-Shim-Pack CLC ODS® (C18) column
(Shimadzu, Tokyo, Japan; 150 × 4.6 mm i.d.).

Fase gerak : asam fosfat 0.1% : asetonitril (1:1, v/v)

Laju alir : 1 mL/min.

Detektor : UV-vis

6. Aktivitas antioksidan dan kandungan dari propolis yang dikumpulkan dari
berbagai wilayah di Cina (29)

Kondisi Analisis

Kolom : RP-C18 (2x250mm i.d., 5µm)

Fase gerak : 0,1% asam format dalam air (A) : 0,1% asam
format dalam asetonitril (B)
bergradien: 20-80% B (0-60 menit)

Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor : PDA

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI DAN WAKTU

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Kuantitatif Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia selama lebih kurang 4 (empat) bulan yaitu dari bulan Agustus sampai November 2009.

B. BAHAN

Bahan-bahan yang digunakan adalah Aquabidestilata (Otsuka, Jepang), Asam format pro analisis (Merck, Jerman), Asetonitril pro HPLC (Merck, Jerman), Standar Artepillin C (Wako, Jepang), Standar CAPE (Chromadex, Singapura), Metanol pro HPLC (Merck, Jerman), Sampel yang diuji adalah propolis diantaranya dalam bentuk ekstrak cair yang berwarna coklat dengan inisial DM dan berasal dari Selandia Baru (A), ekstrak cair berwarna putih gading dengan inisial MA dan berasal dari Australia (B), ekstrak cair berwarna coklat dengan inisial GL dan berasal dari Brazil (C) dan ekstrak cair berwarna coklat dengan inisial AP dan berasal dari Indonesia (D).

C. ALAT

Alat yang digunakan adalah KCKT LC 6A (Shimadzu, Jepang), Pompa KCKT LC 6A (Shimadzu, Jepang), kolom 100-5C18 25 cm x 4,6 mm (Kromasil, Swedia) ukuran partikel 8 μm , detektor UV SPD-6AV (Shimadzu, Jepang), data processor Class LC-10, dan interface CBM 102 (Shimadzu, Jepang), KCKT Waters 2695 (Alliance, USA), kolom 100-5C18 25 cm x 4,6 mm (Lichrosphere, Jerman) ukuran partikel 5 μm , detektor PDA 2996 (Waters, USA), data prosesor Empower pro, *auto injector*, syringe 25 μL (Hamilton, USA), filter eluen 0,45 μm (Whatman, USA), spektrofotometer UV-Vis UV-1601 (Shimadzu, Jepang), timbangan analitik, alat-alat gelas, pipet volume.

D. CARA KERJA

1. Pembuatan larutan induk standar Artepillin C 200 $\mu\text{g/mL}$

Ditimbang Artepillin C $\pm 5,0$ mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL dan dilarutkan dengan metanol, ditambahkan hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan Artepillin C dengan konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$. Lakukan pengenceran larutan induk untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah.

2. Pembuatan larutan induk standar CAPE 100 µg/mL

Ditimbang CAPE \pm 5,0 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL dan dilarutkan dengan asetonitril, ditambahkan hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan CAPE dengan konsentrasi 100 µg/mL. Lakukan pengenceran larutan induk untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah.

3. Pencarian Kondisi Analisis Optimum

a. Penentuan panjang gelombang optimum

Dibuat larutan standar Artepillin C dan CAPE dengan konsentrasi 10,0 µg/mL, kemudian serapannya diukur dengan spektrofotometer pada range 200-400 nm. Setelah itu ditentukan panjang gelombang optimumnya.

b. Pemilihan fase gerak untuk analisis

Larutan standar Artepillin C dan CAPE dengan konsentrasi 1,0 µg/mL disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke dalam injektor KCKT dengan menggunakan komposisi 1,5 % asam format dalam air: 1,5 % asam format dalam asetonitril dengan perbandingan yang bervariasi, yaitu 60:40 dan 30:70 (v/v). Kecepatan alir yang digunakan 1,5; 1,8; 0,8; 1,0; 1,2 mL/menit. Setelah itu ditentukan variabel-variabel keefektifan kolom, yaitu N, HETP, *tailing factor* (Tf), dan resolusi. Penyuntikan larutan standar Artepillin C dan CAPE tersebut diulang sebanyak 3 kali.

4. Validasi metode analisis

a. Pembuatan kurva kalibrasi dan pengujian linearitas

Larutan standar Artepillin C dengan konsentrasi yaitu 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; dan 0,4 µg/mL serta CAPE dengan konsentrasi yaitu 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 µg/mL masing-masing disuntikkan ke dalam kolom pada kondisi terpilih. Data serapan yang didapat kemudian diplot ke kurva kalibrasi selanjutnya dilakukan analisis hubungan antara konsentrasi dan luas puncak (area) sehingga didapat persamaan garis linier $y = a + bx$.

b. Penentuan LOD dan LOQ

Dengan metode statistik, LOD dan LOQ ditentukan dari hasil kurva kalibrasi yang diperoleh. Rumus untuk perhitungannya adalah sebagai berikut :

$$\text{LOD} = \frac{3 S_y/x}{b} \qquad \text{LOQ} = \frac{10 S_y/x}{b}$$

dimana b merupakan nilai kemiringan (slope) dari persamaan kurva kalibrasi $y = a + bx$.

c. Uji presisi

Larutan standar Artepillin C dengan konsentrasi 0,01 µg/mL; 0,20 µg/mL; dan 0,4 µg/mL serta CAPE dengan konsentrasi 0,05 µg/mL; 0,3 µg/mL; dan 0,5 µg/mL disuntikkan sebanyak 20,0 µL

ke dalam kolom dengan kondisi terpilih, diulang sebanyak 6 kali, kemudian dicatat luas puncaknya dan dihitung koefisien variasinya.

d. Uji Perolehan Kembali (UPK)

Ditimbang Sampel A, sampel B, sampel C, dan sampel D masing-masing sebanyak $\pm 50,0$ mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL yang telah ditara ditimbangan, selanjutnya di larutkan dengan metanol, tambahkan hingga batas labu ukur. Kemudian ambil 1,0 mL larutan sampel tersebut masukkan kedalam labu ukur 25,0 ml, tambahkan 1,0 mL larutan standar 6,67 $\mu\text{g/mL}$ (untuk UPK sampel A konsentrasi sedang Artepillin C). Selanjutnya dilarutkan dengan pelarut metanol hingga batas labu ukur. Kemudian di dalamnya Hal yang sama dilakukan uji perolehan kembali untuk konsentrasi rendah dan tinggi. Uji perolehan kembali dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel pada tiga rentang kadar (rendah, sedang, dan tinggi) dengan standar murni yang mewakili perolehan kembali 100%.

5. Analisis Artepillin C dan CAPE dalam sampel

a. Pengambilan sampel

Sampel diambil dari produk propolis dengan perbedaan negara asal pengambilan propolis yang dijual secara bebas di Jakarta.

- b. Pengenceran sampel dan analisis sampel menggunakan KCKT detektor PDA

Ditimbang sampel propolis sebanyak $\pm 50,0$ mg dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 mL yang telah ditara didalam timbangan. Selanjutnya dilarutkan dengan menggunakan pelarut metanol, tambahkan hingga batas labu ukur 10,0 mL. Kemudian dilakukan pengenceran hingga didapat konsentrasi tertentu. Masukkan larutan sampel kedalam *auto injector* dengan volume 20 μ L. Kondisi analisis yang digunakan sama pada saat menganalisis sampel dengan KCKT detektor UV. Selanjutnya dibandingkan spektrum serapan standar dengan spektrum serapan yang terdapat didalam sampel.

- c. Pengenceran sampel dan analisis sampel propolis menggunakan KCKT dengan detektor UV (25)

Ditimbang Sampel propolis sebanyak $\pm 50,0$ mg dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 mL yang telah ditara didalam timbangan. Selanjutnya dilarutkan dengan menggunakan pelarut metanol, tambahkan hingga batas labu ukur 10,0 mL. Kemudian dilakukan pengenceran hingga didapat konsentrasi tertentu. Masukkan larutan sampel menggunakan *syringe* pada volume 20 μ L, catat luas puncaknya.

BAB IV

HASIL PERCOBAAN DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PERCOBAAN

1. Pencarian Kondisi Analisis Optimum

a. Penentuan panjang gelombang optimum

Panjang gelombang optimum yang didapat untuk analisis Artepillin C dan CAPE adalah 315 nm. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 10.

b. Pemilihan fase gerak untuk analisis

Digunakan komposisi fase gerak 1,5% asam format dalam air: 1,5% asam format dalam asetonitril dengan perbandingan yang bervariasi, yaitu 60:40 dan 30:70 (v/v). Kecepatan alir yang digunakan 1,5; 1,8; 0,8; 1,0; 1,2 mL/menit. Dari hasil percobaan dipilih fase gerak asam format 1,5% dalam air : asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40 v/v), dengan kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8, lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit. Hasil percobaan dapat dilihat pada Gambar 11, 12, 13, 14, 15 serta Tabel 2 dan Tabel 7.

2. Validasi metode analisis

a. Pembuatan kurva kalibrasi dan pengujian linearitas

Persamaan garis linear untuk Artepillin C adalah $y = 643,10 + 87116,01x$ dengan koefisien korelasi (r) adalah 0,9999. Persamaan garis linear untuk CAPE adalah $y = 157,25 + 57649,30x$ dengan koefisien korelasi, (r), adalah 0,9999. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 29 dan Gambar 30 serta Tabel 3 dan Tabel 8.

b. Penentuan LOD dan LOQ

Batas deteksi dan kuantitasi Artepillin C berturut-turut adalah 0,0017 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,0057 $\mu\text{g/mL}$. Batas deteksi dan kuantitasi CAPE berturut-turut yaitu 0,0050 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,016 $\mu\text{g/mL}$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 9.

c. Uji presisi

Larutan Artepillin C dengan konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,4 $\mu\text{g/mL}$ masing-masing memberikan nilai koefisien variasi 0,80%; 0,57% dan 1,27%. Larutan CAPE dengan konsentrasi 0,05 $\mu\text{g/mL}$; 0,3 $\mu\text{g/mL}$; dan 0,5 $\mu\text{g/mL}$ masing-masing memberikan nilai koefisien variasi berturut-turut 0,53%, 0,94%, dan 0,93%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5 dan Tabel 10.

d. Uji perolehan kembali (UPK)

Hasil uji perolehan kembali Artepillin C pada sampel A 100,86%, 100,59%, dan 101,63%. Sedangkan hasil uji perolehan kembali CAPE pada sampel A 98,87%, 100,57%, dan 101,56%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6 dan Tabel 11.

e. Penetapan kadar Artepillin C dan CAPE

Hasil penetapan kadar CAPE pada sampel A 0,382 $\mu\text{g/mL}$ dan sampel D 0,291 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan Artepillin C tidak terdeteksi pada keseluruhan sampel. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 21, 22, 23 dan 24 serta Tabel 12.

3. Analisis Artepillin C dan CAPE dalam propolis menggunakan KCKT detektor PDA

Keseluruhan sampel dianalisis menggunakan KCKT detektor PDA menunjukkan hanya sampel A dan sampel D yang terdeteksi adanya CAPE, sedangkan Artepillin C tidak terdeteksi pada keseluruhan sampel. Hasil percobaan dapat dilihat pada Gambar 17, 18, 19 dan 20. Sebagai verifikasi bahwa itu benar sampel yang mengandung Artepillin C dan CAPE dilakukan *spiking* standar ke dalam sampel, hasil kromatogram dapat dilihat pada Gambar 27 dan 28.

4. Analisis Artepillin C dan CAPE dalam propolis menggunakan KCKT detektor UV

Analisis dilakukan dengan menganalisa sampel menggunakan KCKT detektor PDA setelah itu dilanjutkan menggunakan KCKT detektor UV. Beberapa sampel memiliki waktu retensi yang sama dengan waktu retensi standar Artepillin C dan CAPE serta ada pula yang tidak sama, hasil kromatogram sampel dapat dilihat pada Gambar 21, 22, 23 dan 24. Sebagai verifikasi bahwa itu benar sampel yang mengandung Artepillin C dan CAPE dilakukan *spiking* standar ke dalam sampel, hasil kromatogram dapat dilihat pada Gambar 25 dan 26.

B. PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini dilakukan validasi metode analisis Artepillin C dan CAPE dalam produk propolis secara kromatografi cair kinerja tinggi. Latar belakang penelitian ini adalah karena saat ini suplemen makanan telah menjadi salah satu trend untuk dikonsumsi, terutama yang sering digunakan oleh kalangan masyarakat salah satunya adalah yang berasal dari lebah madu dan sebagaimana diketahui memiliki berbagai macam khasiat, antara lain memiliki efek sebagai anti kanker. Maka dari itu perlu dicari suatu metode valid yang nantinya dapat diaplikasikan untuk menentukan Artepillin C dan CAPE dalam sampel, sehingga produk-produk yang beredar sekarang ini benar-benar bisa dipertanggung jawabkan.

Penelitian tentang Artepillin C dan CAPE telah dilakukan di beberapa negara menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan *Photodiode Array Detector* (PDA), *High Performance Thin Liquid Chromatography* (HPTLC), Kromatografi Gas (KG), dan spektrometer massa. Namun pada penelitian ini akan dicoba dilakukan validasi terhadap analisis Artepillin C dan CAPE secara KCKT. Metode KCKT dipilih karena waktu analisisnya yang cepat serta cara kerjanya relatif sederhana. KCKT yang digunakan dilengkapi dengan detektor UV, karena Artepillin C dan CAPE memiliki gugus kromofor (gugus yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dan gugus ausokrom (gugus yang memiliki pasangan elektron bebas) (3, 21, 28, 29).

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah propolis yang saat ini beredar di pasaran, yang berasal dari berbagai negara diantaranya Indonesia, Australia, Brazil, dan Selandia Baru. Propolis yang digunakan adalah propolis yang berbentuk cair yang telah diekstraksi, sehingga sampel propolis yang digunakan sudah dalam bentuk etanol ekstrak propolis (EEP). Pemilihan lokasi pengambilan sampel berdasarkan penyebaran yang berada di Jakarta. Informasi sampel didapat dari multi level marketing (MLM) yang menawarkan berbagai macam produk, salah satunya adalah propolis.

Metode ekstraksi dilakukan berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh berbagai penelitian, dimana mereka mengambil dari propolis alam asli yang berbentuk padat selanjutnya diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol atau etanol yang dipanaskan selama 1 jam pada suhu 60°C

bersamaan dengan pengocokan, selanjutnya disentrifugasi. Karena sampel yang didapat sudah dalam bentuk ekstraknya maka sampel-sampel tersebut hanya diencerkan sehingga didapat konsentrasi tertentu dari setiap sampelnya. (28, 30)

Metode yang digunakan pada penelitian ini relatif lebih sederhana bila dibandingkan dengan metode yang telah dilakukan di beberapa negara luar. Sejauh ini metode terbaru yang digunakan untuk analisis Artepillin C dan CAPE adalah menggunakan KCKT yang dilengkapi dengan PDA dan spektrometer masa, sebuah detektor yang nantinya memberikan informasi spektrum ion molekul dan fragmen molekul spesifik yang nantinya dapat digunakan untuk identifikasi analit tertentu. Sehingga dengan menggunakan metode tersebut, kemungkinan positif palsu tidak terjadi. Namun demikian penelitian ini juga membuktikan dengan menggunakan metode yang relatif sederhana, analisis terhadap Artepillin C dan CAPE dapat dilakukan dan untuk membuktikan bahwa dalam sampel tersebut mengandung kedua zat tersebut maka dilakukan *spiking* terhadap sampel, yaitu dengan penambahan standar kedalam sampel. Walaupun ada dari beberapa sampel pada penelitian ini tidak terdeteksi adanya Artepillin C dan CAPE, namun bila melihat nilai parameter-parameter yang sesuai dengan persyaratan validasi masuk dalam batas yang diperbolehkan, dapat dikatakan metode yang digunakan pada penelitian ini sudah cukup valid, sehingga analisis Artepillin C dan CAPE dengan metode ini dapat diaplikasikan untuk menentukan Artepillin C dan CAPE dalam sampel.

1. Penentuan panjang gelombang optimum

Dari hasil percobaan, didapat panjang gelombang maksimum untuk Artepillin C adalah 313 nm dan panjang gelombang maksimum untuk CAPE adalah 321 nm. Selanjutnya ditentukan titik perpotongan dari kedua zat tersebut untuk ditentukan panjang gelombang optimum, maka didapat panjang gelombang optimum 315 nm.

2. Pemilihan fase gerak untuk analisis

Pada penggunaan fase gerak asam format 1,5% dalam air-asam format 1,5% dalam asetonitril dengan komposisi 30:70 (v/v), dengan laju alir 0,8 mL/menit, 1,0 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Pada saat analisis yang lebih dulu keluar adalah CAPE dengan waktu retensi berturut-turut 5,586 menit, 4,537 menit dan 3,675 menit. Artepillin C karena lebih non polar dibanding dengan CAPE maka keluar terakhir dengan waktu retensi berturut-turut 9,424 menit, 7,774 menit dan 6,205 menit. Fase gerak ini mempunyai jumlah pelat teoritis besar, HETP kecil dan resolusi besar.

Pada penggunaan fase gerak asam format 1,5% dalam air-asam format 1,5% dalam asetonitril dengan komposisi 60:40 (v/v), dengan laju alir 1,0 mL/menit, 1,5 mL/menit dan 1,8 mL/menit, karena pada kecepatan alir tersebut untuk Artepillin C keluar terlalu lama, maka digunakan metode gradien dimana pada kecepatan alir 1,5 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-20, lalu dari menit ke-20 hingga menit ke-24 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-24 diubah kembali menjadi 1,8

mL/menit. Hasil waktu retensi dari kedua zat tersebut adalah untuk CAPE keluar pada waktu retensi 20,249 menit sedangkan Artepillin C waktu retensinya 50,759 menit. Pada kecepatan alir yang disebutkan diatas didapat waktu retensi terlama sehingga untuk menghasilkan kondisi yang efisien digunakan kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8, lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit. Waktu retensi yang diperoleh untuk CAPE didapat waktu retensi 8,379 menit dan untuk Artepillin C diperoleh waktu retensi 19,515 menit. Fase gerak ini mempunyai jumlah pelat teoritis besar, HETP kecil dan resolusi besar.

Dari hasil optimasi fase gerak akhirnya dipilih fase gerak asam asetat asam format 1,5% dalam air-asam format 1,5% dalam asetonitril dengan komposisi 60:40 (v/v). Fase gerak ini dipilih berdasarkan variabel-variabel keefektifan kolom, yaitu N, HETP, dan *tailing factor* (Tf).

3. Validasi metode analisis

Validasi yang dilakukan pertama kali adalah pembuatan kurva kalibrasi. Tujuan pembuatan kurva kalibrasi adalah untuk mengetahui kelinieran hubungan antara konsentrasi Artepillin C dan CAPE dengan area yang dihasilkannya. Koefisien korelasi (r) yang semakin mendekati 1 berarti semakin linier.

Kurva kalibrasi Artepillin C dibuat dari konsentrasi 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 dan 0,4 $\mu\text{g/mL}$. Dari hasil uji linearitas didapat persamaan garis $y =$

643,10 + 87116,01x dengan koefisien korelasi (r) adalah 0,9999. Kurva kalibrasi CAPE dibuat dari konsentrasi 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 µg/mL. Dari hasil uji linearitas didapat persamaan garis $y = 157,25 + 57649,30x$ dengan koefisien korelasi (r) adalah 0,9999. Nilai korelasi tersebut dirasakan sudah cukup bagus. Dari kurva kalibrasi Artepillin C didapat batas deteksi dan kuantitasi, yaitu 0,0017 µg/mL dan 0,0058 µg/mL, sedangkan untuk CAPE batas deteksinya adalah 0,0050 µg/mL dan batas kuantitasnya adalah 0,0167 µg/mL.

Setelah pembuatan kurva kalibrasi, dilakukan uji presisi. Percobaan ini bertujuan untuk mengetahui hasil keterulangan penyuntikan satu larutan dalam satu hari. Dari tiga konsentrasi yang digunakan, diperoleh hasil koefisien variasi (KV), yang cukup bagus dan kurang dari 2%. Koefisien variasi Artepillin C pada konsentrasi 0,01 µg/mL; 0,2 µg/mL; dan 0,4 µg/mL masing-masing memberikan nilai koefisien variasi berturut-turut 0,80%; 0,57% dan 1,27%. Koefisien variasi CAPE pada konsentrasi 0,05 µg/mL; 0,3 µg/mL; dan 0,5 µg/mL masing-masing memberikan nilai koefisien variasi berturut-turut 0,53%, 0,94%, 0,93%.

Uji akurasi ditentukan dengan uji perolehan kembali (UPK) yang menggunakan metode adisi, dimana pada saat sebelum melakukan pengenceran dilakukan penambahan larutan baku Artepillin C dan CAPE yang diketahui kadarnya. Lalu uji perolehan kembali diketahui dengan mengurangi kadar sampel yang tidak ditambahkan standar lalu membagi

hasil yang didapat dengan konsentrasi Artepillin C dan CAPE yang ditambahkan.

Hasil validasi Artepillin C yang diperoleh dalam metode ini jika dibandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh nilai LOD dan LOQ yang lebih kecil dibanding dengan hasil penelitian yang telah ada. Nilai LOD menggunakan metode ini adalah 0,0017 $\mu\text{g/mL}$ dan LOQ adalah 0,0057 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan penelitian sebelumnya diperoleh nilai LOD 0,0036 $\mu\text{g/mL}$ dan LOQ 0,012 $\mu\text{g/mL}$ selain itu juga pada pembuatan kurva kalibrasi rentang yang dibuat untuk Artepillin C menggunakan metode ini antara 0,01 $\mu\text{g/mL}$ hingga 0,4 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan hasil penelitian yang telah ada tersebut menyatakan rentang kurva kalibrasi yang dibuat antara 0,05 $\mu\text{g/mL}$ hingga 15 $\mu\text{g/mL}$. Menggunakan metode ini juga dapat ditentukan validasi CAPE sedangkan pada penelitian yang telah ada hanya membuktikan bahwa CAPE terdeteksi didalam propolis, sehingga dapat disimpulkan bahwa dengan metode dan alat yang lebih sederhana nilai validasi ini masih masuk dalam persyaratan validasi, sehingga dapat dikatakan bahwa dengan metode ini valid. (28)

4. Analisis Artepillin C dan CAPE dalam sampel propolis

Metode yang digunakan pada penelitian disesuaikan dengan kondisi instrument dan bahan yang terdapat pada laboratorium. Sampel propolis ditimbang sebanyak $\pm 50,0$ mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL yang telah ditara pada saat penimbangan. Selanjutnya dilarutkan dengan

pelarut metanol sehingga didapat konsentrasi 5000 $\mu\text{g/mL}$, kemudian dilakukan pengenceran kembali dengan menggunakan labu ukur 25,0 mL dengan volume pemipetan 1 mL sehingga diperoleh konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$, lalu disuntikan ke KCKT dengan volume penyuntikan 20 μL . Fase gerak yang digunakan seharusnya asam format 1,5% dalam air : asam format 1,5% dalam asetonitril dengan komposisi 30:70 (v:v), setelah diaplikasikan ke sampel terlalu banyak puncak-puncak yang muncul dalam kromatogram tersebut sehingga dari puncak-puncak tersebut tidak ada pemisahan dari puncak lainnya. Untuk CAPE sendiri terdapat dua puncak dimana salah satunya adalah puncak CAPE dengan waktu retensi yang relatif sama dengan waktu retensi larutan baku CAPE. Dilakukan dengan berbagai cara apapun puncak tersebut tidak memisah, sedangkan untuk Artepillin C waktu retensi yang keluar hampir sama dengan waktu retensi larutan baku. Oleh karena itu dipilih fase gerak asam format 1,5% dalam air-asam format 1,5% dalam asetonitril dengan komposisi 60:40 (v/v) dengan kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8, lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, maka diperoleh hasil puncak untuk CAPE sendiri tidak berhimpitan dengan puncak-puncak dari zat lain, begitu juga dengan Artepillin C.

Propolis merupakan campuran kompleks yang kaya akan kandungan alami diantaranya Lilin dan asam lemak, flavonoid, pollen, *essensial oil* serta senyawa organik dan mineral lainnya. Campuran kompleks ini lah yang

menyebabkan matriks propolis yang didapatkan kurang bagus. Matriks yang kurang bagus ini lah yang menyebabkan positif palsu sering terjadi pada analisis Artepillin C dan CAPE. Oleh karena itu dilakukan uji analisis terlebih dahulu menggunakan KCKT dengan detektor PDA kemudian pada kondisi yang sama dilakukan analisis dengan detektor UV. Hasil analisis yang berbeda disebabkan karena perbedaan alat KCKT dan detektor serta pada KCKT detektor PDA menggunakan *auto injector*. Selain itu perbedaan kondisi kolom mempengaruhi hasil analisis. Penggunaan kolom KCKT detektor PDA menggunakan kolom 100-5C18 25 cm x 4,6 mm (Lichrosphere) dengan ukuran partikel 5 μm sedangkan kolom yang digunakan pada KCKT detektor UV kolom 100-5C18 25 cm x 4,6 mm (Kromasil) dengan ukuran partikel 8 μm . Perbedaan-perbedaan tersebut yang menyebabkan perbedaan hasil analisis. Hasil analisis pada penggunaan KCKT dengan detektor PDA, CAPE terdeteksi pada sampel A dan D tetapi pada sampel B dan C tidak terdeteksi, sedangkan Artepillin C tidak terdeteksi dari keseluruhan sampel.

BAB V

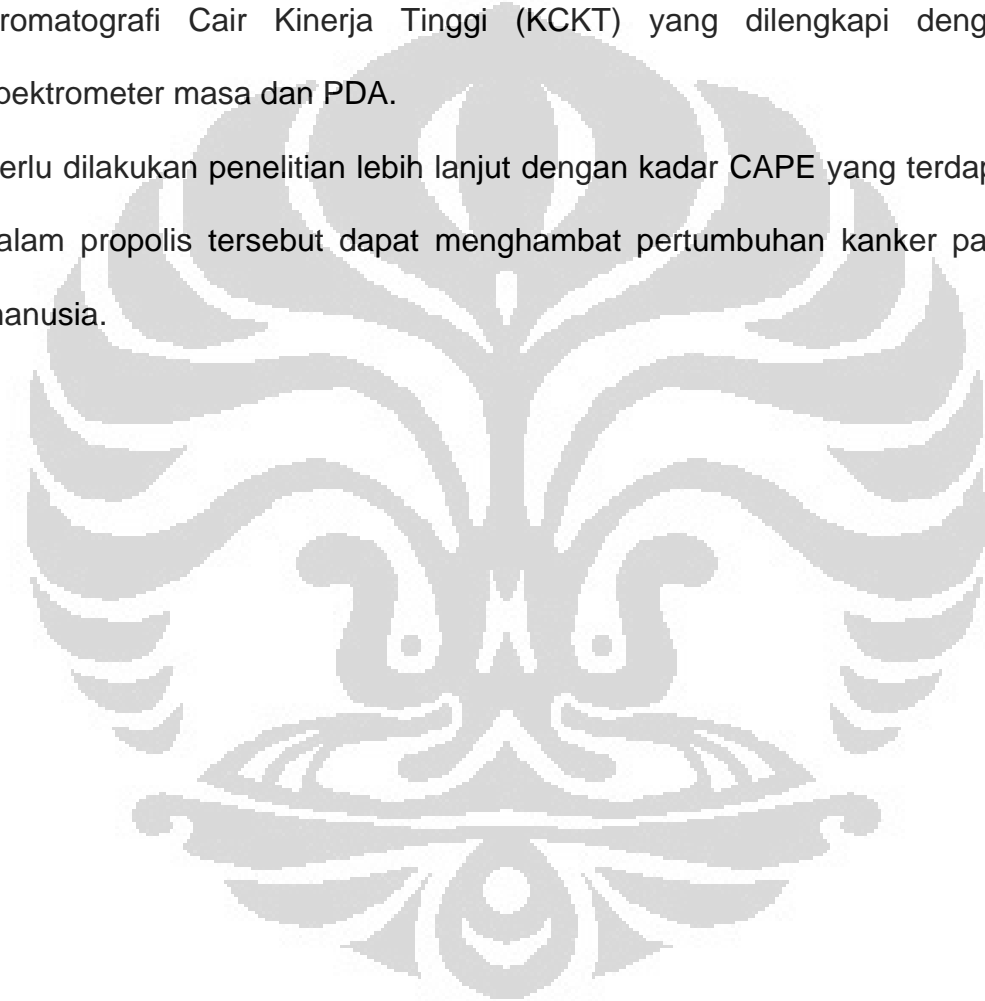
KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Kondisi analisis pada penelitian ini menggunakan fase gerak campuran asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit pada panjang gelombang optimum 315 nm.
2. Metode KCKT dapat digunakan untuk analisis Artepillin C dan CAPE dalam propolis dengan validitas yang baik.
3. Kadar CAPE dari sampel bervariasi, untuk sampel A yang berasal dari Selandia baru 0,382 µg/mL dan sampel D dari Indonesia 0,291 µg/mL, sedangkan sampel B dan C yang berasal dari Australia dan Brazil tidak terdeteksi adanya CAPE. Artepillin C tidak terdeteksi pada keseluruhan sampel.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan analisis kuantitatif lebih lanjut untuk memeriksa Artepillin C dan CAPE pada sampel-sampel lainnya yang masih beredar dan dilakukan menggunakan alat yang sensitivitasnya lebih tinggi seperti Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan spektrometer masa dan PDA.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan kadar CAPE yang terdapat dalam propolis tersebut dapat menghambat pertumbuhan kanker pada manusia.



DAFTAR ACUAN

1. Anonim. 2004. *Informatorium Suplemen Makanan Indonesia* edisi I jilid 2. Jakarta: Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia.
2. Anonim. 2006. Uji Pendahuluan Aktifitas Anti Kanker dari Propolis dan Komponen Aktifnya. *Majalah Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia*. **7** (1):5-7.
3. Kosalec, I., Marina, B., Stjepan, P. 2003. Analysis of Propolis from the Continental and Adriatic Regions of Croatia. *J. Acta Pharma*. **53**: 275-285.
4. Anonim. *Lima Alasan Propolis Digunakan Sebagai Obat*. <http://docwied.com>, 21 Agustus 2009, pk. 14.25.
5. Fan, K., Sekhon, B. K., Ahmed, I., Ma, G.Y., Roubin, N. 2006. *Anti-cancer Activities of Propolis Extracts from Five Different Geographic Regions*. Australia: Herbal Medicines Research and Education Centre, Faculty of Pharmacy, University of Sydney, NSW.
6. Yoshihiro, U., Shutaro, A., Azusa, H., Junji, T., Nagasawa, H., Hori, H. 2006. *Artepillin-C Isoprenomics: Design and Synthesis of Artepillin-C Analogues as Antiatherogenic Antioxidants*. Jepang: Department of Biological Science and Technology, Faculty of Engineering, The University of Tokushima.
7. Demestre, M., Messer, M., Maruta, H. 2008. CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester)-Based Propolis Extract (Bio 30) Suppresses the Growth of Human Neurofibromatosis (Nf) Tumor Xenografts in Mice. *J. Phytother. Res*. **22**: 226 - 230.

8. Ahmed, I., Peng, G., Roubin, N. 2006. *A Comparative Study on Fingerprint Patterns of Propolis from Different Geographic Regions. J. Food Chem.* **84**: 329-339
9. Krzek, J., Jolanta, K., Urszula, H., Aneta, N. 2006. Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography Determination of Selected Phenolic Acids in Propolis Concentrates in Terms of Standardization for Drug Manufacturing Purposes. *J. AOAC Internat.* **89** (2):352-358.
10. Sesil Indera Kurnia. 1990. *Produk dari Pengolahan Madu Lebah*. Bogor: Teknologi Pangan dan Gizi, ITB.
11. Rokim Abdul Karim. 2007. *Panduan Lengkap Pengobatan Penyakit dengan Propolis Diamond*. Jakarta: PT Lebah Permata Khatulistiwa. hlm. 1-2.
12. Wiwin Winingsih. 2008. *Kediaman Lebah Sebagai Antibiotik dan Antikanker*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
13. Karlina Hardjawinata, Warna, D., Hening, P. 2007. *Peningkatan Manfaat Madu Produksi Nasional Dibanding dengan Propolis Terhadap Bakteri Penyebab Penyakit Gigi dan Mulut (Berdasarkan Uji Invitro Aktifitas Anti Bakteri)*. Bandung: Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Padjajaran. hlm. 1-2, 5-7.
14. Katsuhiro, H., Sadaaki, K., Noriko, I., Nobuko, O., Kunio, Y. 1999. Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a Novel Potent Antioxidant. *Chem. Pharm. Bull.* **47**(11):1521-1524.
15. Anonim. *Artepillin-c from Propolis*.
<http://www.wako-chemicals.de>, 22 Agustus 2009, pk. 11.47.
16. Anonim. *Brazilian Propolis*.
<http://www.brazilianpropolis.org/>, 19 Agustus 2009, pk. 12.03.

17. Niraldo, P., Sheila, R. A. L., Yoshihiro, U., Daisuke, K., Hideko, N. 2008. Anti-inflammatory Effects of a Bioavailable Compound, Artepillin-C, in Brazilian Propolis. *Eur J. Pharmacol.* **587**:296-301.
18. Anonim. *Biology Activity from CAPE*.
<http://www.tocris.com>, 4 agustus 2009, pk. 15.36.
19. Anonim. *Caffeic Acid Phenethyl Ester*.
<http://www.sigmaaldrich.com>, 7 juli 2009, pk. 18.37.
20. Roos, T. U. 2006. *The Polyphenols Resveratrol and Caffeic Acid Phenethyl Ester: their influence on growth-related signaling pathways in vascular smooth muscle cells*. München: der Fakultät für Chemie und Pharmazie, der Ludwig-Maximilians-Universität München. hlm. 7.
21. Harmita. 2007. *Buku Ajar Analisis Fisiko Kimia*. Depok: FMIPA UI. hlm. 115-128 dan 144-162.
22. Ibnu Ghatib Ganjar dan Abdul, R. *Kimia Farmasi Analisis*. 2007. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. hlm. 379-417.
23. Johnson, E. L. and Stevenson, R. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB Bandung. hlm. 1-51, 230-255, dan 278-301.
24. Anonim. 1995. *Farmakope Indonesia edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm. 1016.
25. Coneac, G., Gafițanu, E., Bandur, G., Pinzaru, I. A. 2008. Flavonoid Contents of Propolis from the West Side of Romania and Correlation with the Antioxidant Activity. *Buletinul Științific al Universității "Politehnica" din Timisoara*. **53**(67): 1-2.

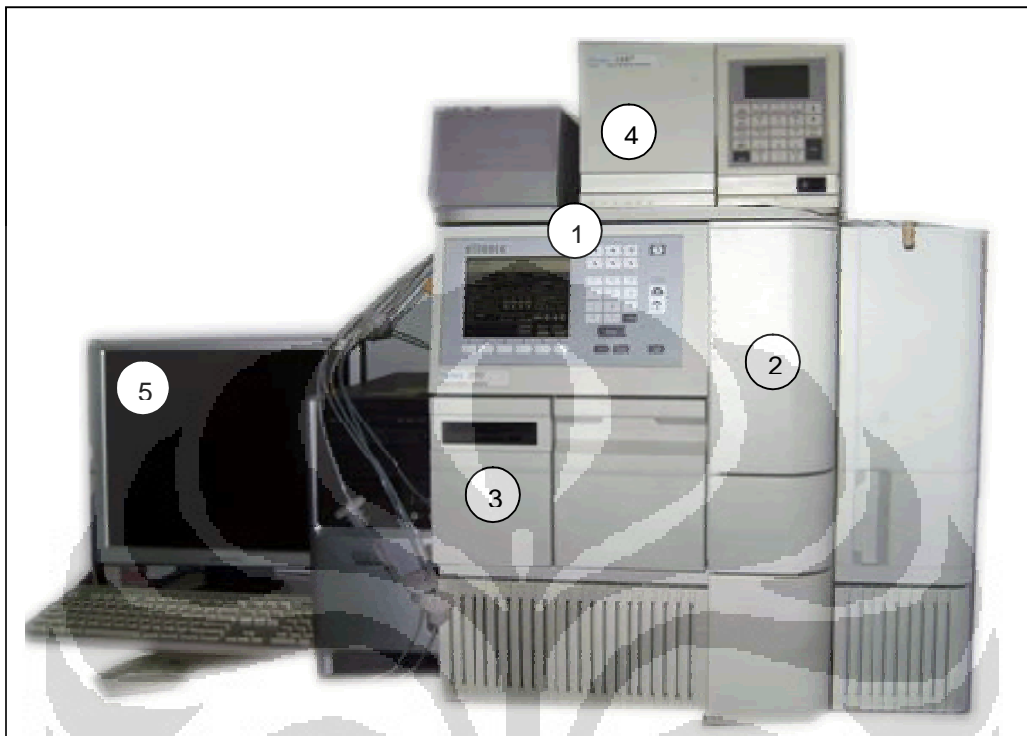
26. de Funari, C. S., Cristiano., Vicente, O. F., Monica, B. M. 2007. Analysis of Propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its Effects on Mouse Fibroblasts. *J. of Ethnopharmacology* **111**: 206-212.
27. Satiadarma, K., Muhammad, M., Daryono, H. T., Rahmana, E. K. 2004. *Asas Pengembangan Prosedur Analisis*. Surabaya: Airlangga University Press. Ed. I. hlm: 46-51.
28. Matsuda, A.H., Ligia, B. A. 2008. Validated Method for the Quantification of Artepillin-C in Brazilian Propolis. *J. Phytochem. Anal.***19**: 179–183.
29. Mok. R.A., Kumazawa, S., Yumiko, U., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., Nakayama, T. 2007. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of China. *J. Food Chem* **101**: 1383-1392.
30. Kumazawa, S., Tomoko, H., Tsutomo. N. 2003. Antioxidant Activity of Propolis Geographic Origins. *J. Food Chem* **84**: 329-339.



Gambar 5. Alat kromatografi cair kinerja tinggi

Keterangan:

1. Kolom 100 – 5 C18 25 cm x 4,6 mm (Kromasil, Swedia), ukuran partikel 8 μm
2. Injektor
3. Pompa LC-6A (Shimadzu, Jepang)
4. Detektor UV SPD 6AV (Shimadzu, Jepang)
5. Interface CBM 102 (Shimadzu, Jepang)
6. Komputer processor Class LC-10



Gambar 6. Alat kromatografi cair kinerja tinggi

Keterangan:

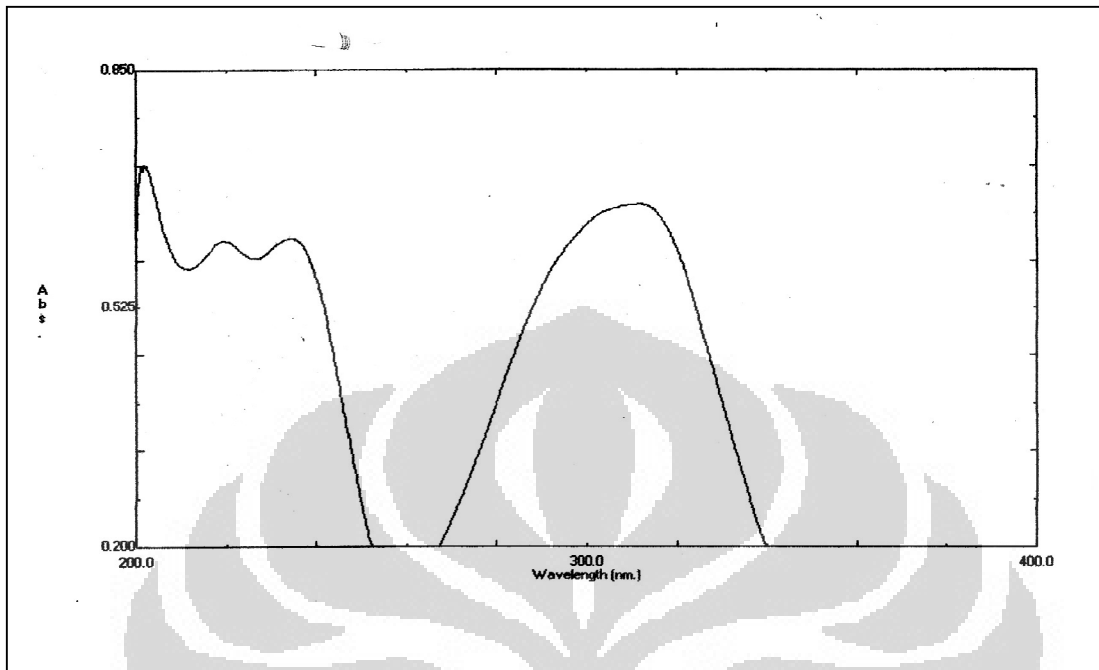
1. KCKT Waters 2695 (Alliance, USA)
2. Kolom 100 – 5 C18 25 cm x 4,6 mm (Lichrosphere, Jerman), ukuran partikel 5 μm
3. *Auto injector*
4. Detektor PDA 2996 (Waters, USA)
5. Komputer processor Empower pro



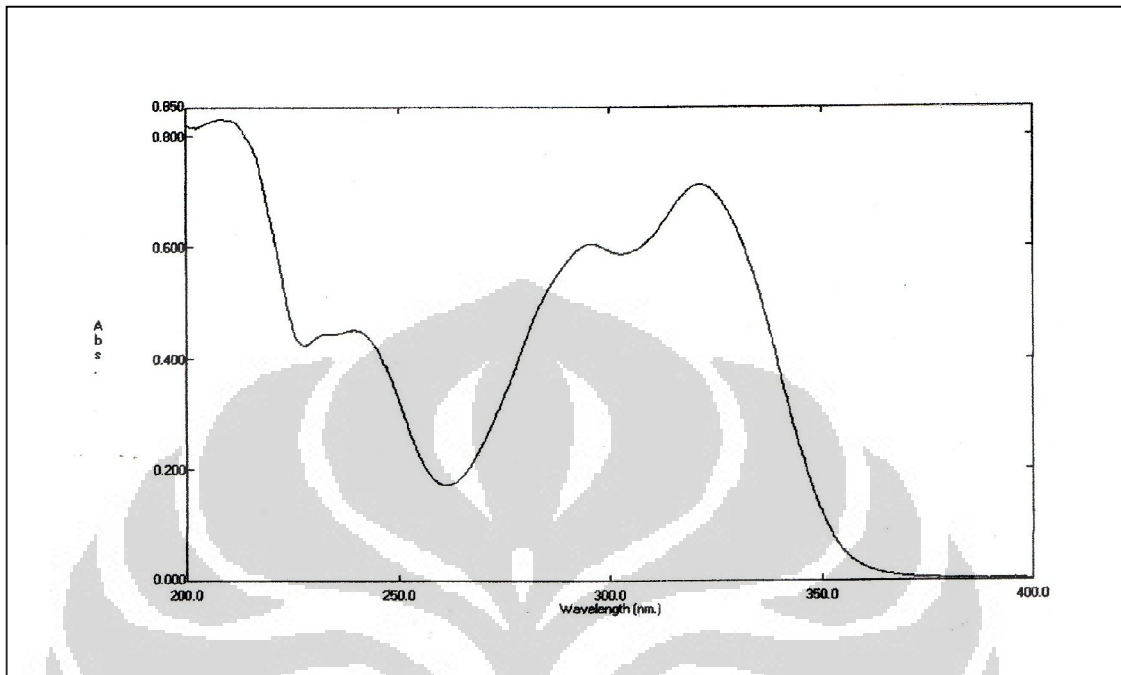
Gambar 7. Sampel propolis

Keterangan :

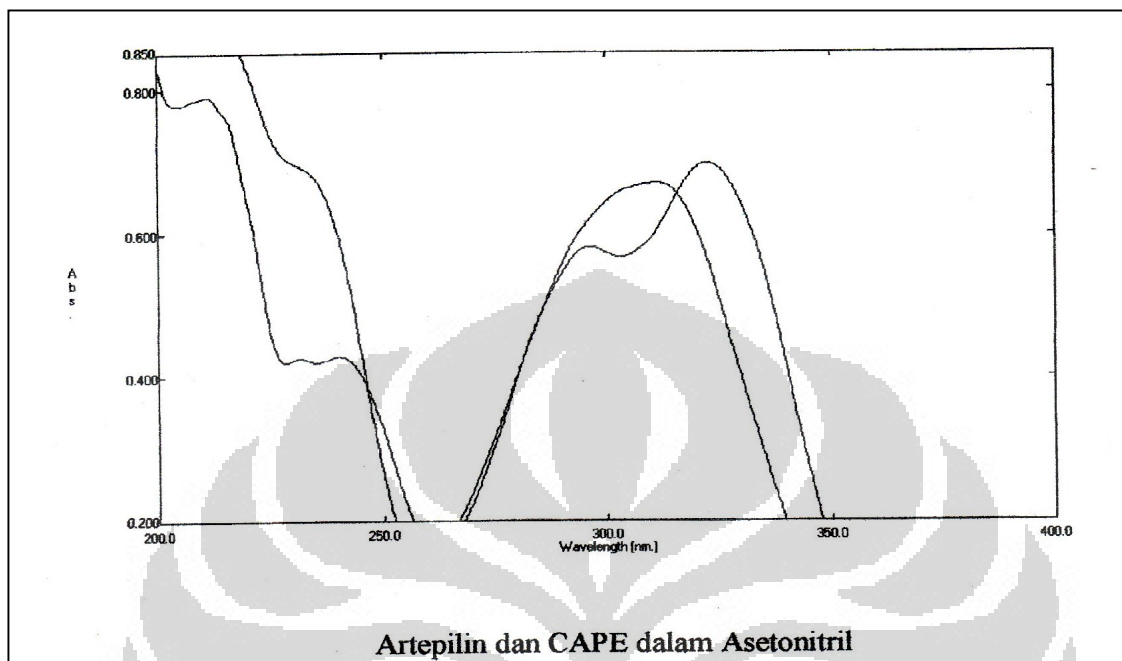
- A. Selandia Baru
- B. Australia
- C. Brazil
- D. Indonesia



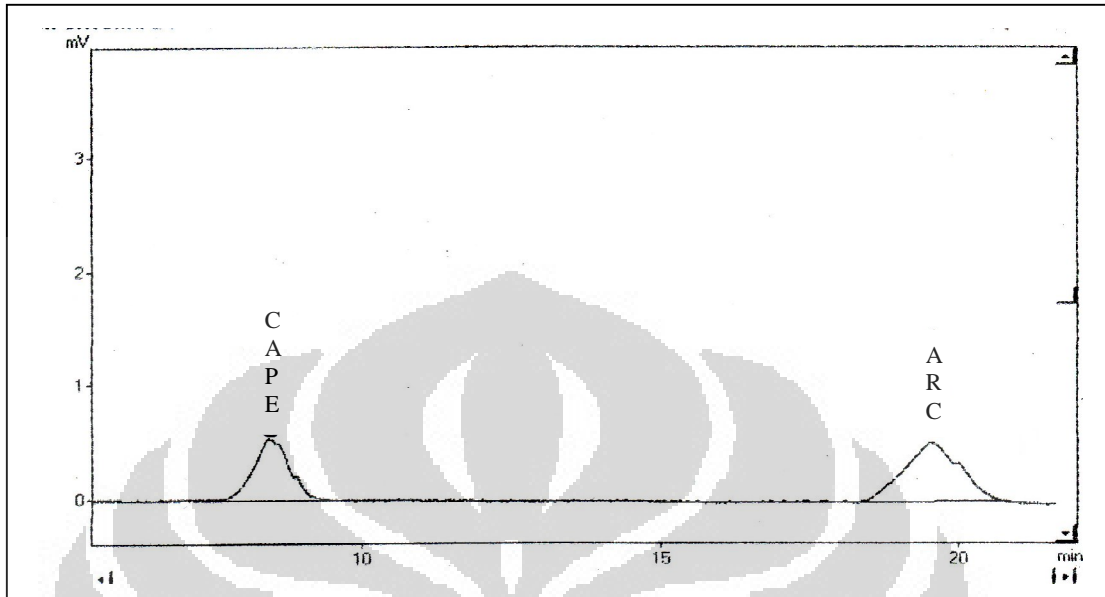
Gambar 8. Spektrum serapan larutan standar Artepillin C 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dalam pelarut metanol, panjang gelombang maksimum 313 nm



Gambar 9. Spektrum serapan larutan standar CAPE 10,0 µg/mL dalam pelarut asetonitril, panjang gelombang maksimum 321 nm

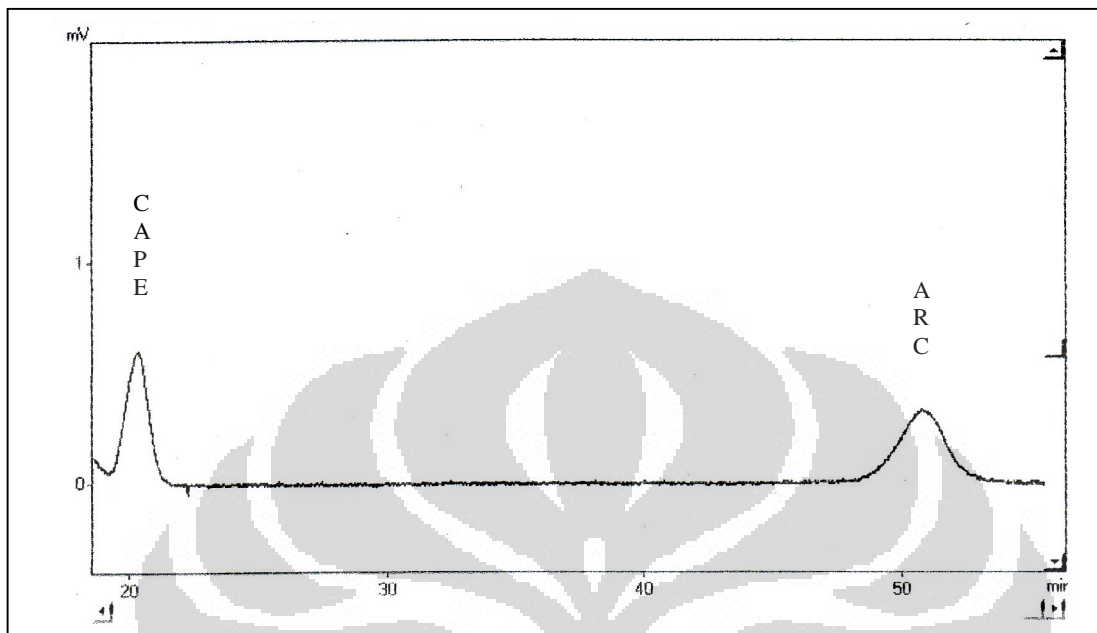


Gambar 10. Spektrum serapan larutan standar campuran 10,0 $\mu\text{g/mL}$ dalam pelarut asetonitril, panjang gelombang maksimum 315 nm



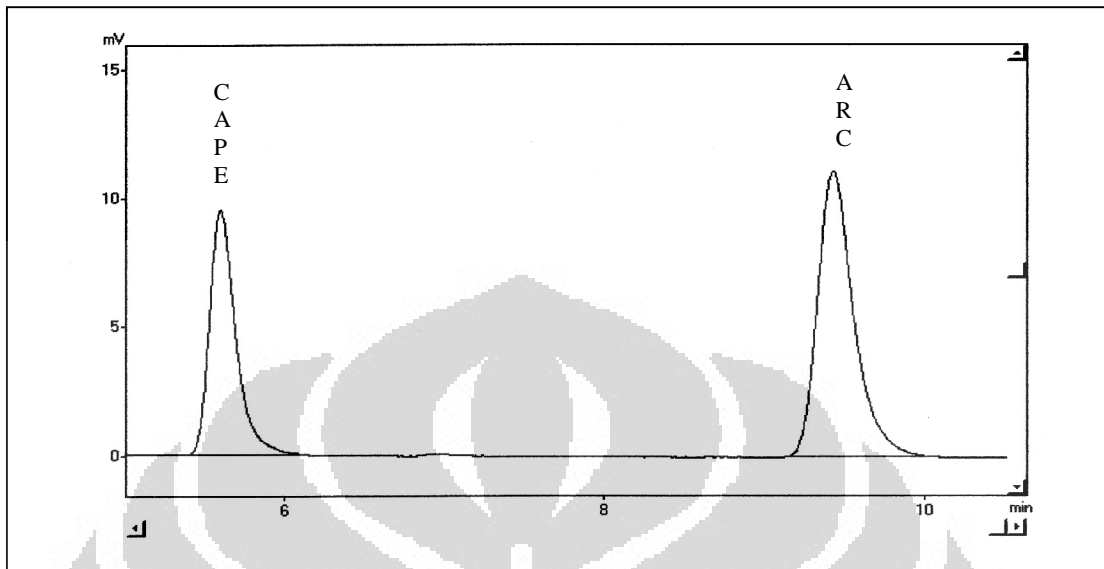
Gambar 11. Kromatogram larutan standar Artepillin C dan CAPE 1 μ g/mL.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran 8 μ m, fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μ L, panjang gelombang 315 nm, detektor UV, waktu retensi CAPE 8,379 menit dan ARC 19,515 menit.



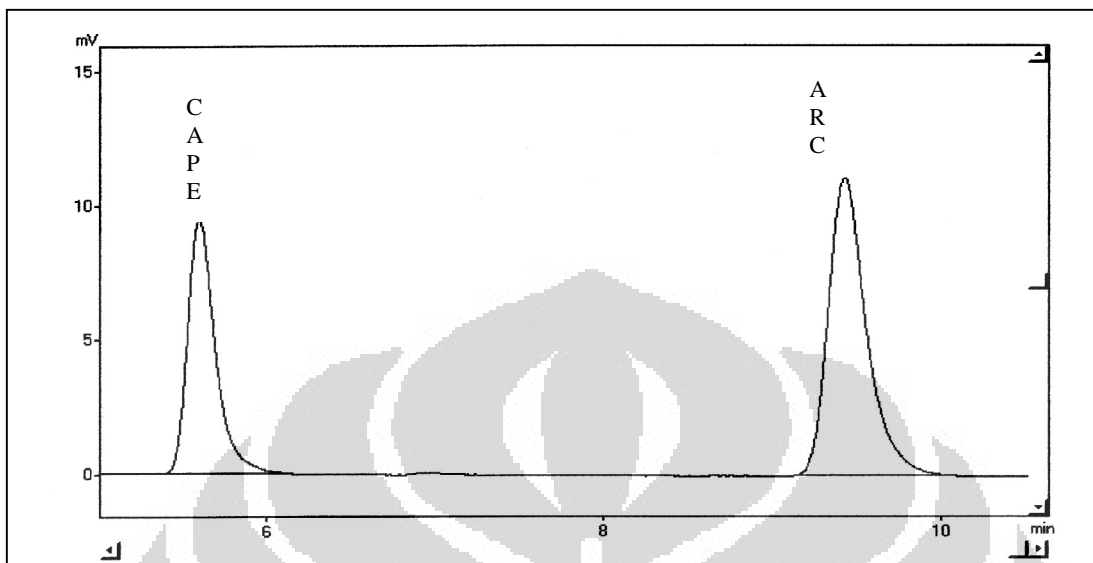
Gambar 12. Kromatogram larutan standar Artepillin C dan CAPE 1 μ g/mL.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μ m, fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,5 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-20 lalu dari menit ke-20 hingga menit ke-25 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-25 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μ L, panjang gelombang 315 nm, detektor UV, waktu retensi CAPE 20,249 menit dan ARC 50,759 menit.



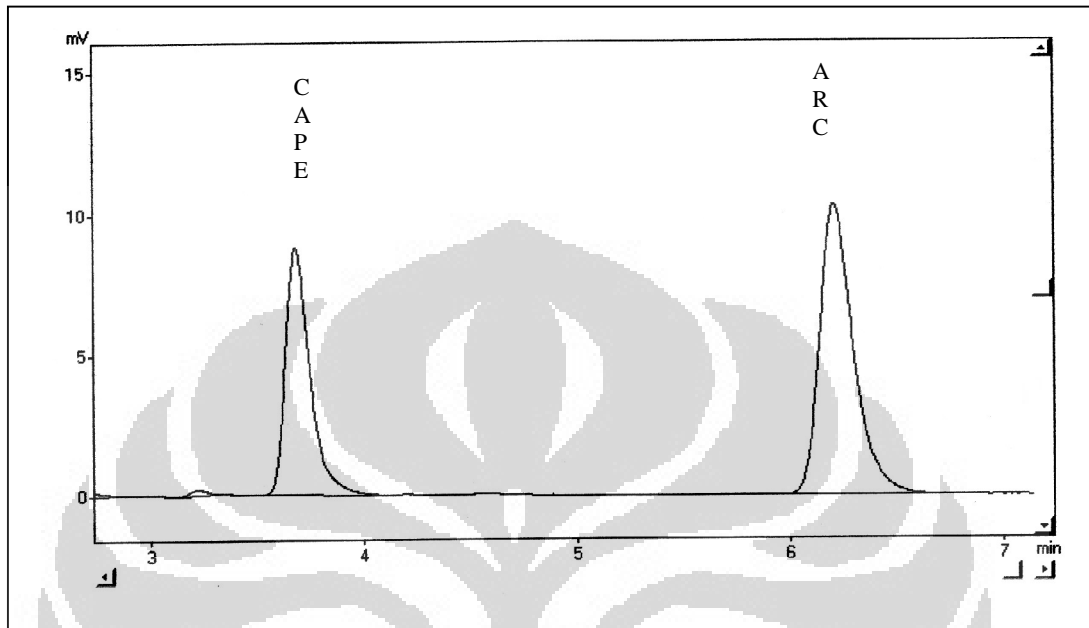
Gambar 13. Kromatogram larutan standar Artepillin C dan CAPE 1 μ g/mL.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μ m, fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (30:70), kecepatan alir 0,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μ L, panjang gelombang 315 nm, detektor UV, waktu retensi CAPE 5,586 menit dan ARC 9,424 menit.



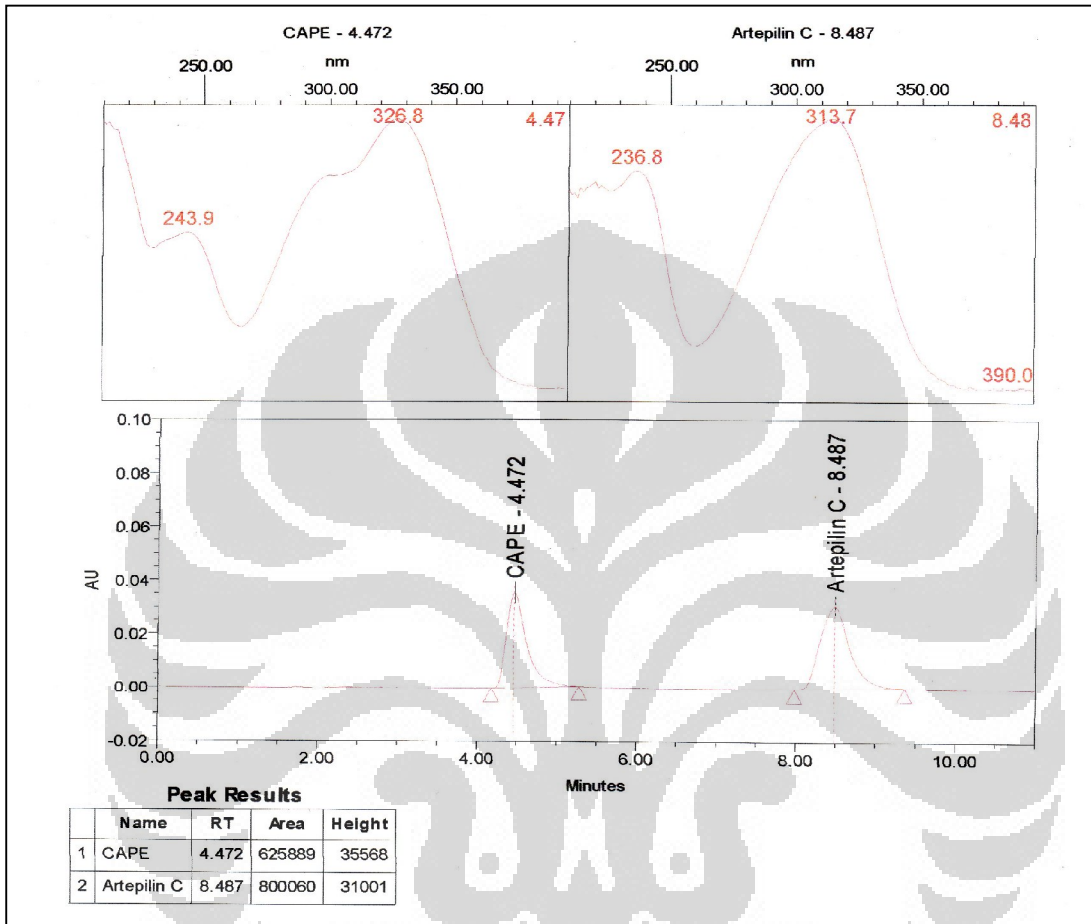
Gambar 14. Kromatogram larutan standar Artepillin C dan CAPE 1 μ g/mL.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μ m, fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (30:70), kecepatan alir 1,0 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μ L, panjang gelombang 315 nm, detektor UV, waktu retensi CAPE 4,562 menit dan ARC 7,753 menit.



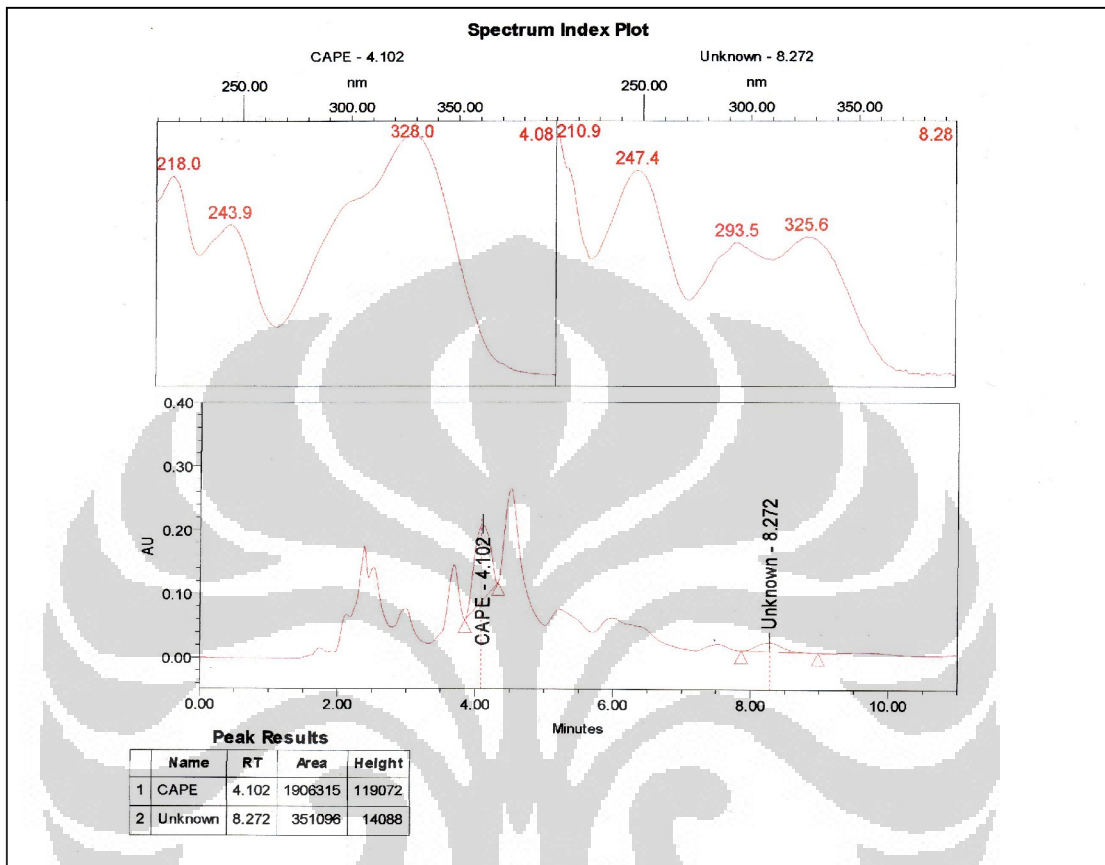
Gambar 15. Kromatogram larutan standar Artepillin C dan CAPE 1 μ g/mL.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μ m, fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (30:70), kecepatan alir 1,2 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μ L, panjang gelombang 315 nm detektor UV, waktu retensi CAPE 3,675 menit dan ARC 6,205 menit.



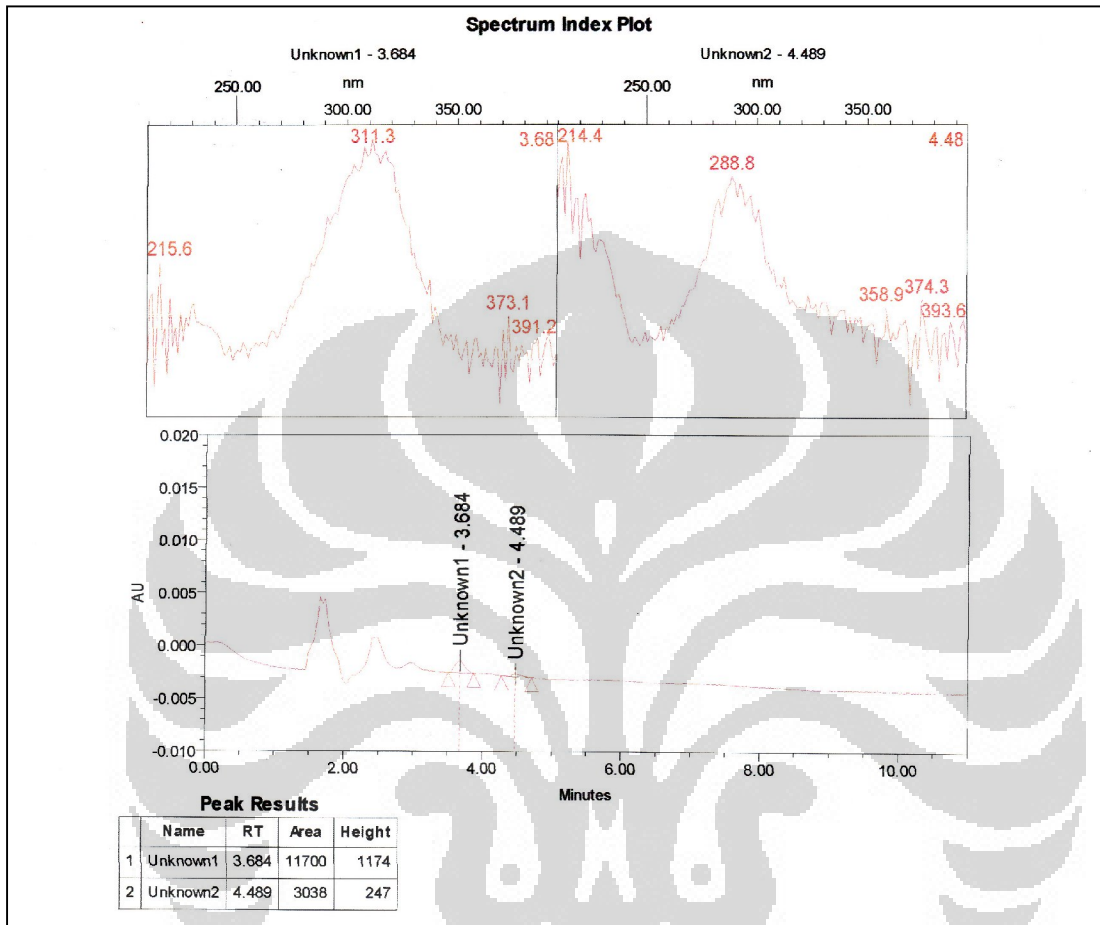
Gambar 16. Kromatogram standar campuran menggunakan KCKT dengan detektor PDA.

Kondisi: Kolom Lichrosphere 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 5 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, panjang gelombang 315 nm, volume penyuntikan 20,0 μL dengan *auto injector*, waktu retensi CAPE 4,472 menit dan ARC 8,487 menit.



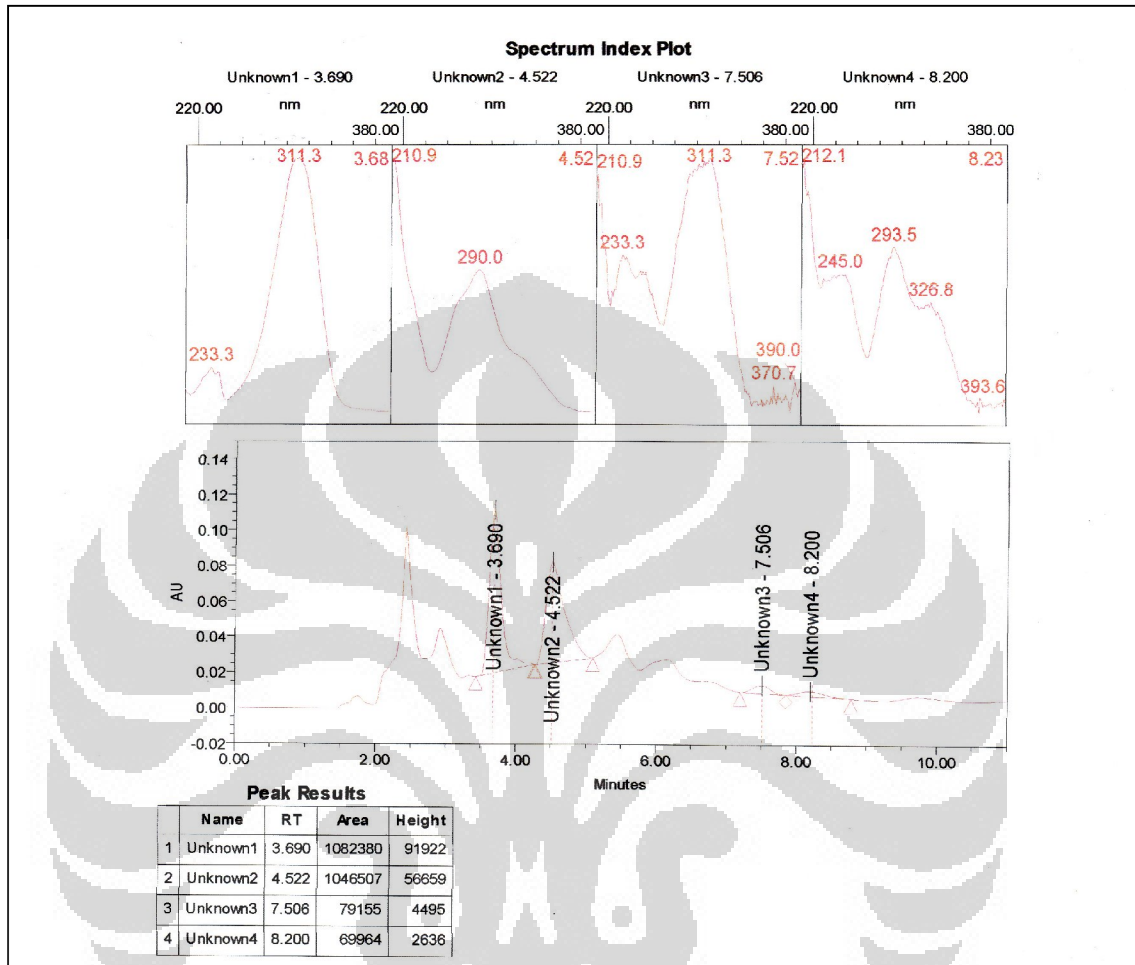
Gambar 17. Kromatogram sampel A (Selandia Baru) menggunakan KCKT dengan detektor PDA.

Kondisi: Kolom Lichrosphere 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 5 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, panjang gelombang 315 nm, volume penyuntikan 20,0 μL dengan *auto injector*, waktu retensi CAPE: 4,102 menit.



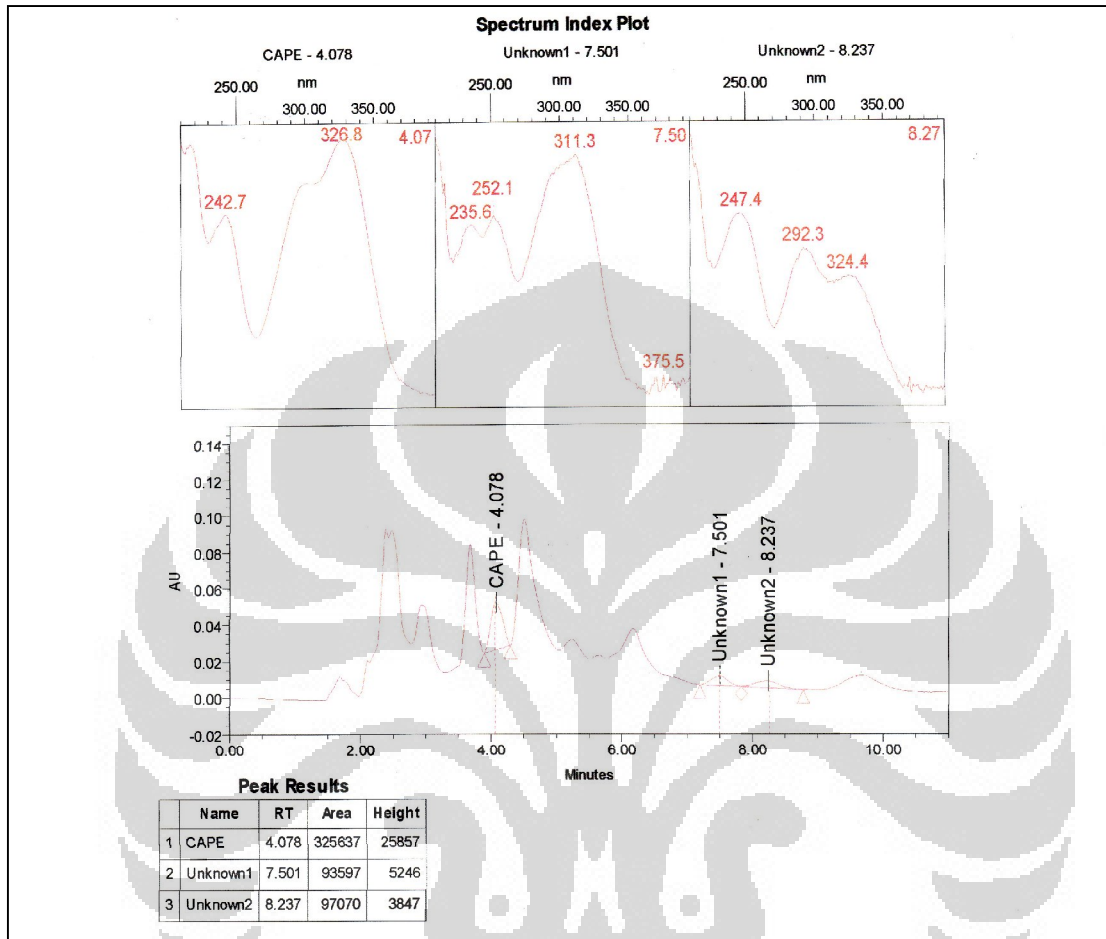
Gambar 18. Kromatogram sampel B (Australia) menggunakan KCKT dengan detektor PDA.

Kondisi: Kolom Lichrosphere 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 5 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, panjang gelombang 315 nm, volume penyuntikan 20,0 μL dengan *auto injector*.



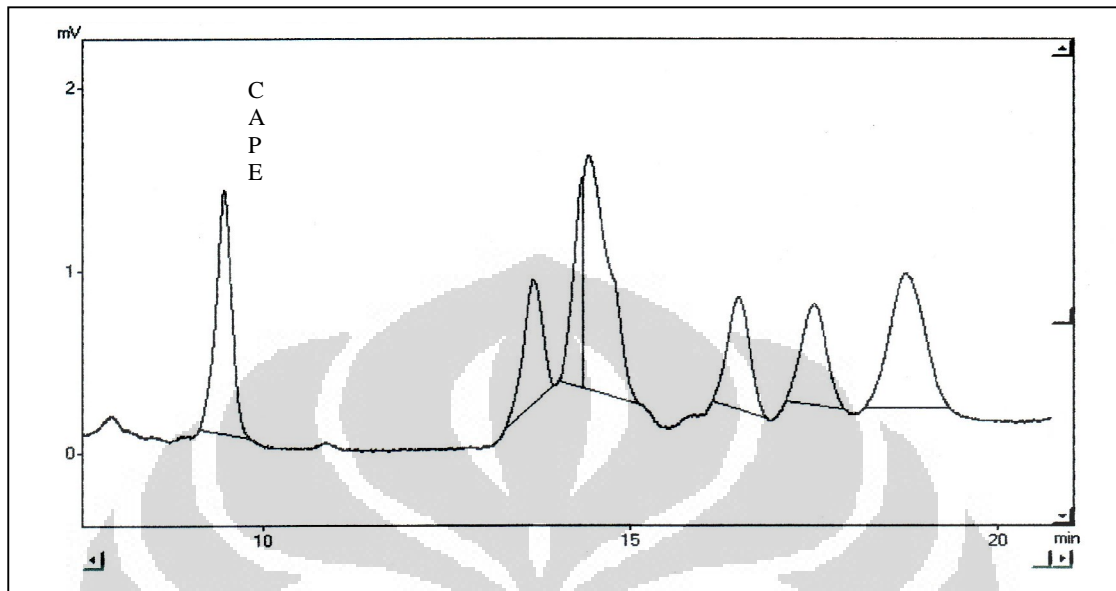
Gambar 19. Kromatogram sampel C (Brazil) menggunakan KCKT dengan detektor PDA.

Kondisi: Kolom Lichrosphere 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 5 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, panjang gelombang 315 nm, volume penyuntikan 20,0 μL dengan *auto injector*.



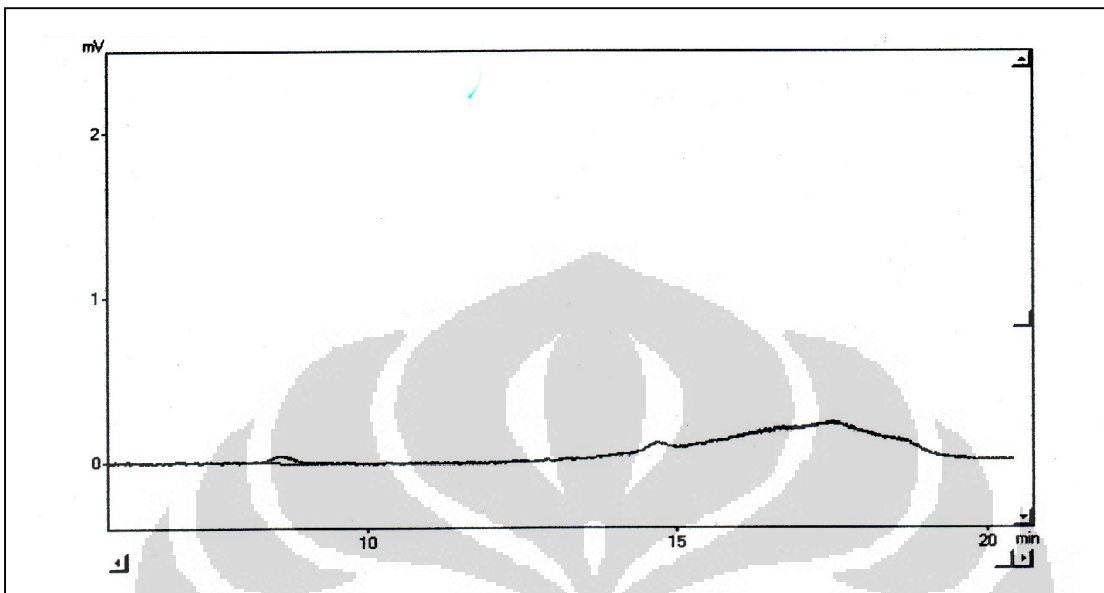
Gambar 20. Kromatogram sampel D (Indonesia) menggunakan KCKT dengan detektor PDA.

Kondisi: Kolom Lichrosphere 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 5 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, panjang gelombang 315 nm, volume penyuntikan 20,0 μL dengan *auto injector*, waktu retensi CAPE 4,078 menit.



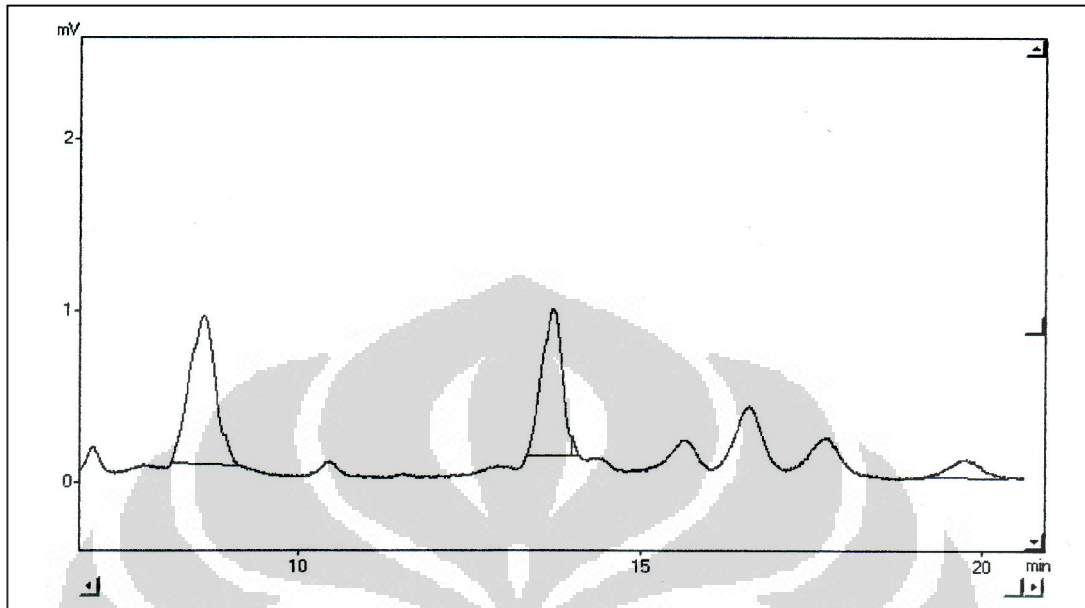
Gambar 21. Kromatogram sampel A (Selandia Baru) 207,6 $\mu\text{g/mL}$.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μL , panjang gelombang 315 nm, detektor UV, waktu retensi CAPE 9,427 menit.



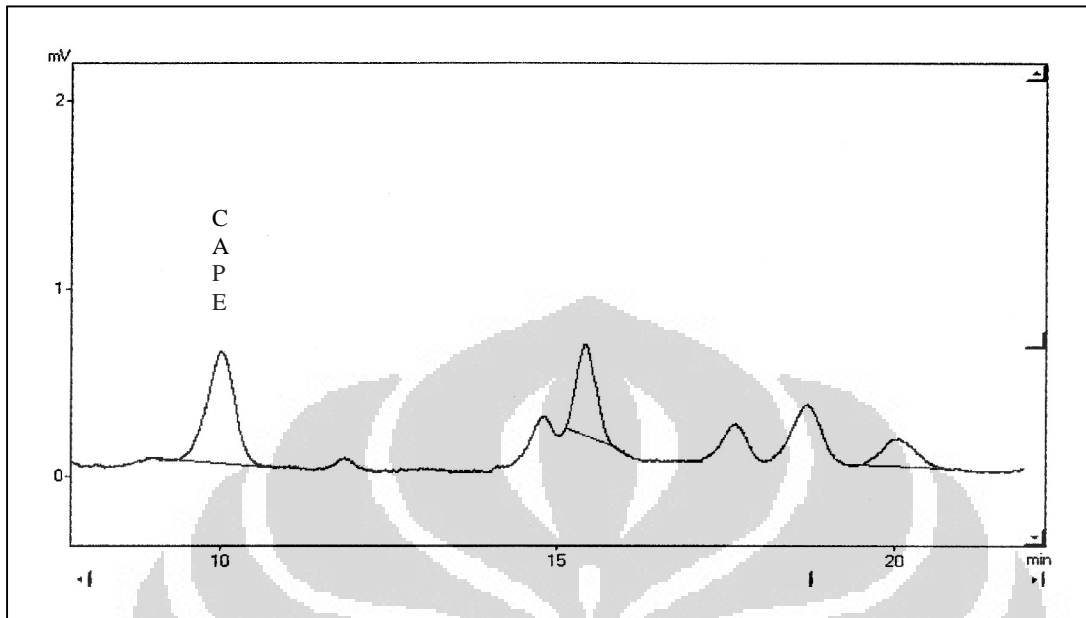
Gambar 22. Kromatogram sampel B (Australia) 236,0 $\mu\text{g/mL}$.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μL , panjang gelombang 315 nm, detektor UV.



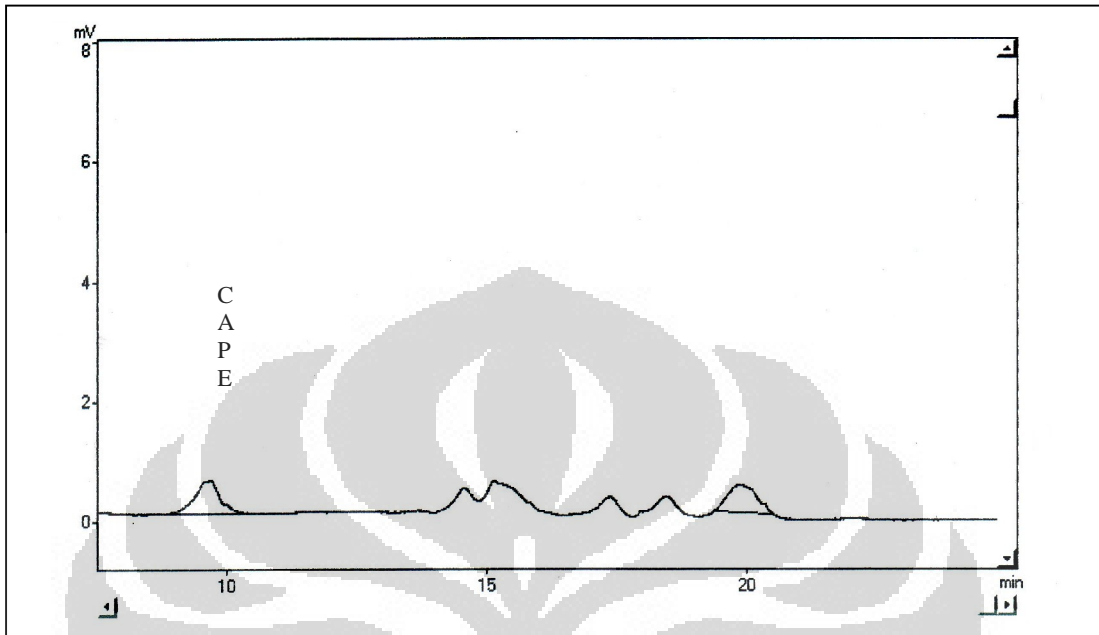
Gambar 23. Kromatogram sampel C (Brazil) 216,8 $\mu\text{g/mL}$.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8, lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μL , panjang gelombang 315 nm, detektor UV.



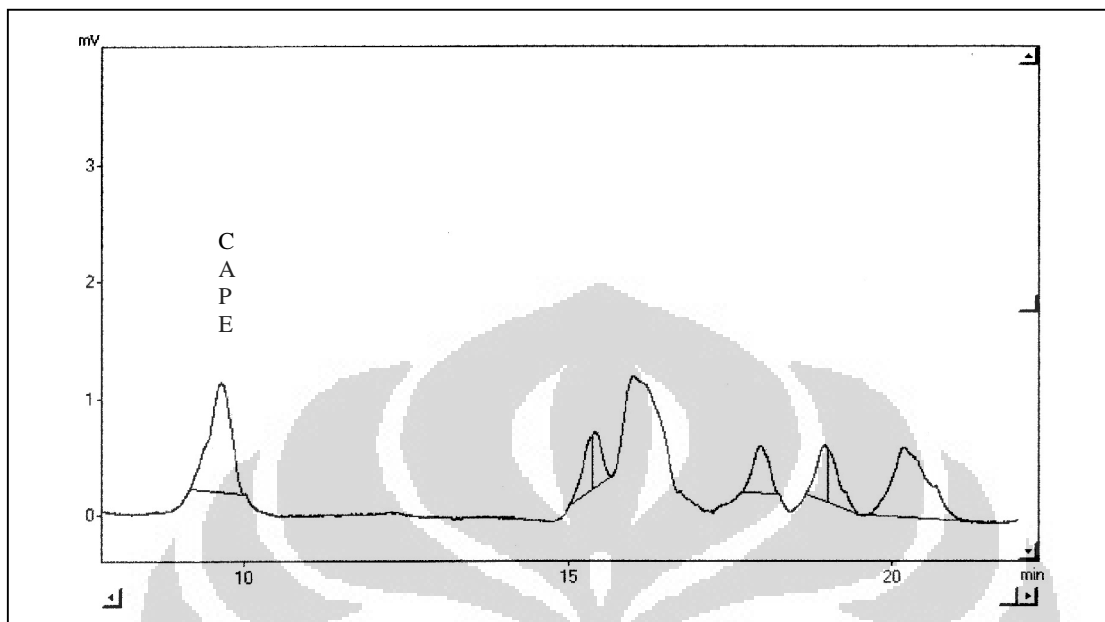
Gambar 24. Kromatogram sampel D (Indonesia) 272,8 $\mu\text{g/mL}$.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8, lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μL , panjang gelombang 315 nm, detektor UV, waktu retensi CAPE: 9,982 menit.



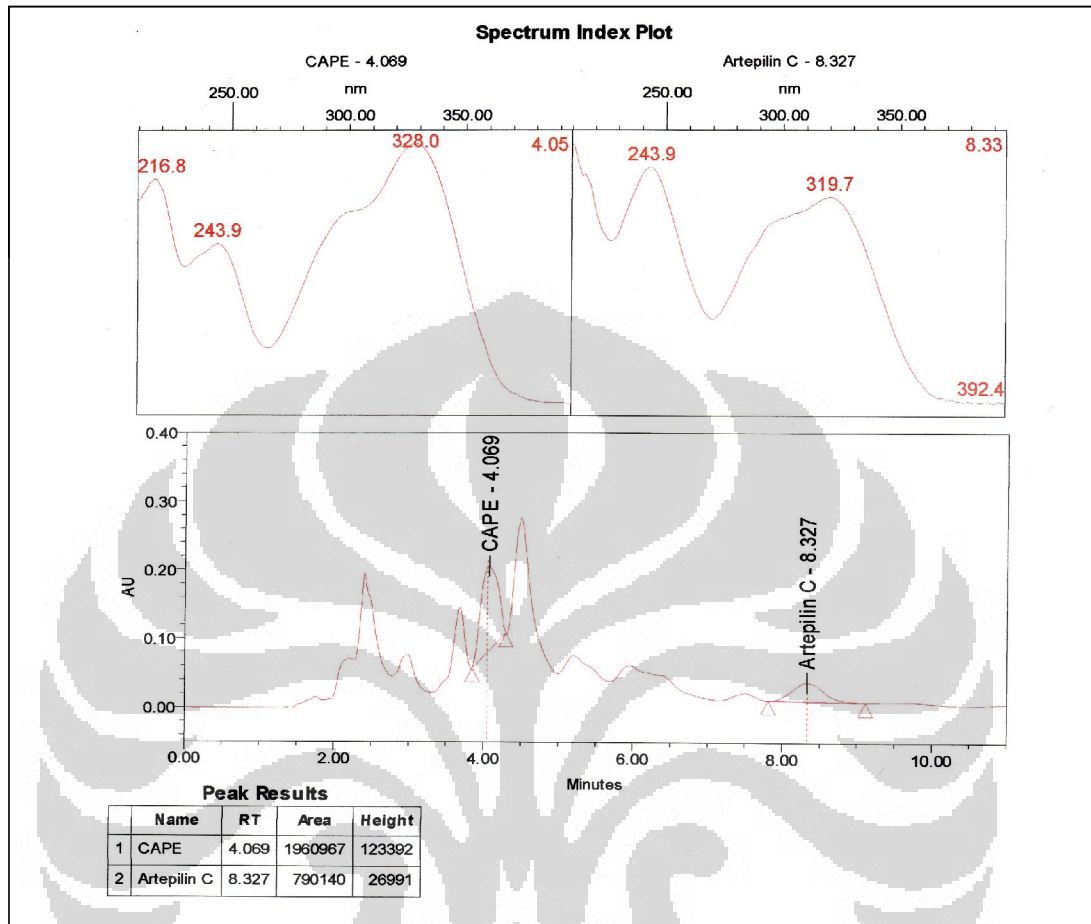
Gambar 25. Kromatogram hasil *spiking* sampel A (Selandia Baru).

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8, lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μL , panjang gelombang 315 nm, detektor UV, waktu retensi CAPE 9,631 menit.



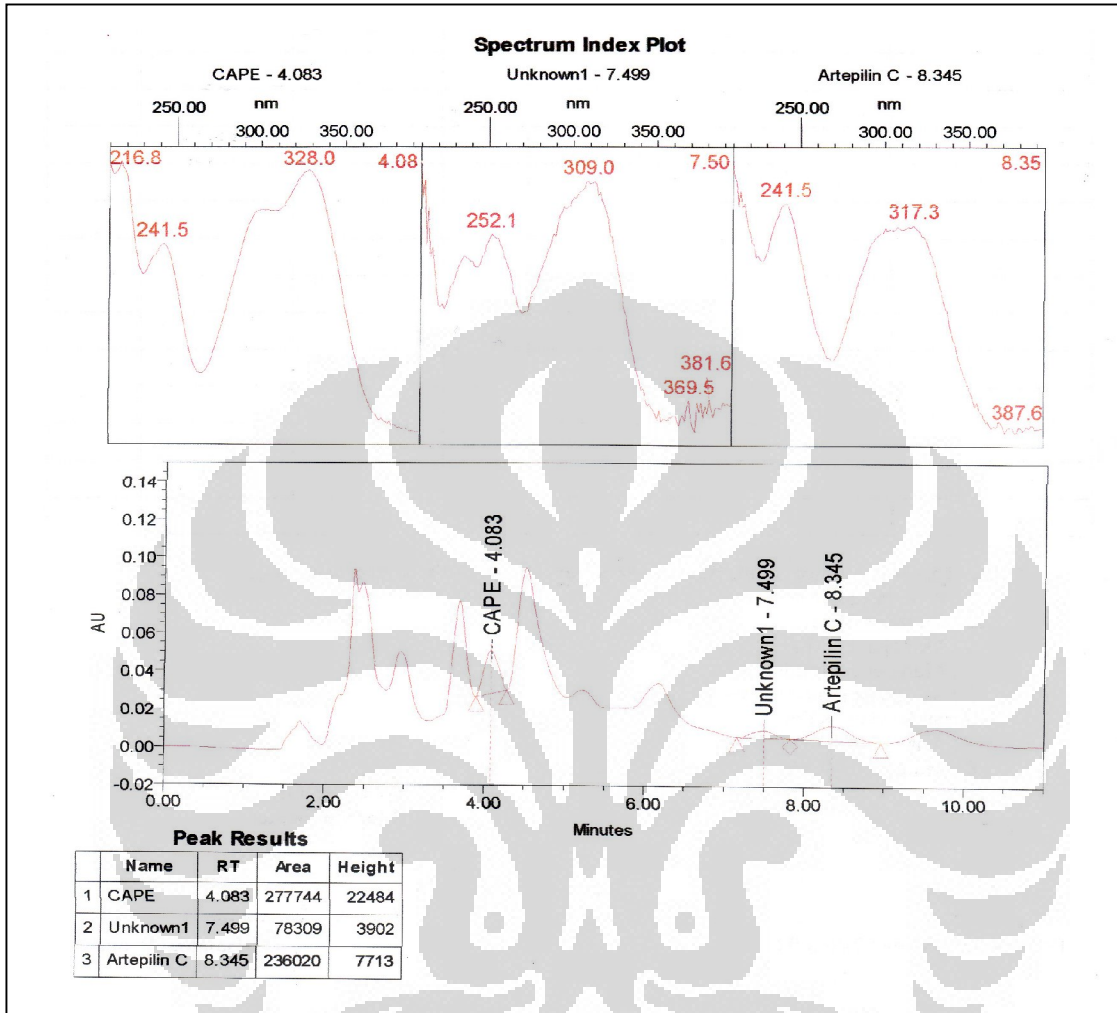
Gambar 26. Kromatogram hasil *spiking* sampel D (Indonesia).

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm), fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μ L, panjang gelombang 315 nm, detektor UV, waktu retensi CAPE 9,765 menit.



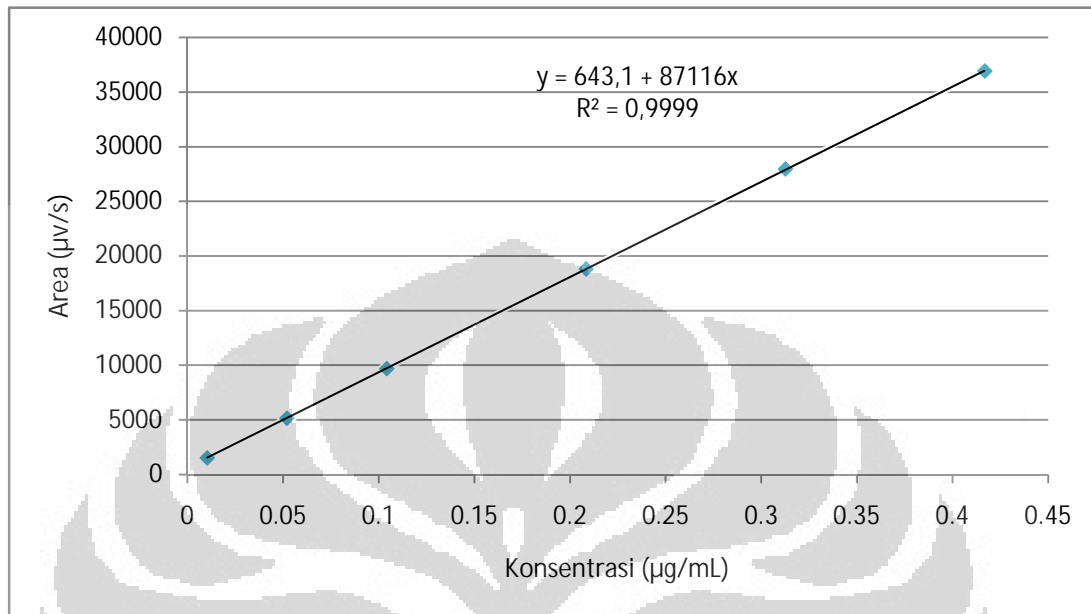
Gambar 27. Kromatogram hasil *spiking* sampel A (Selandia Baru) menggunakan KCKT dengan detektor PDA.

Kondisi: Kolom Lichrosphere 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 5 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, panjang gelombang 315 nm, volume penyuntikan 20,0 μL dengan *auto injector*, waktu retensi CAPE 4,089 menit.



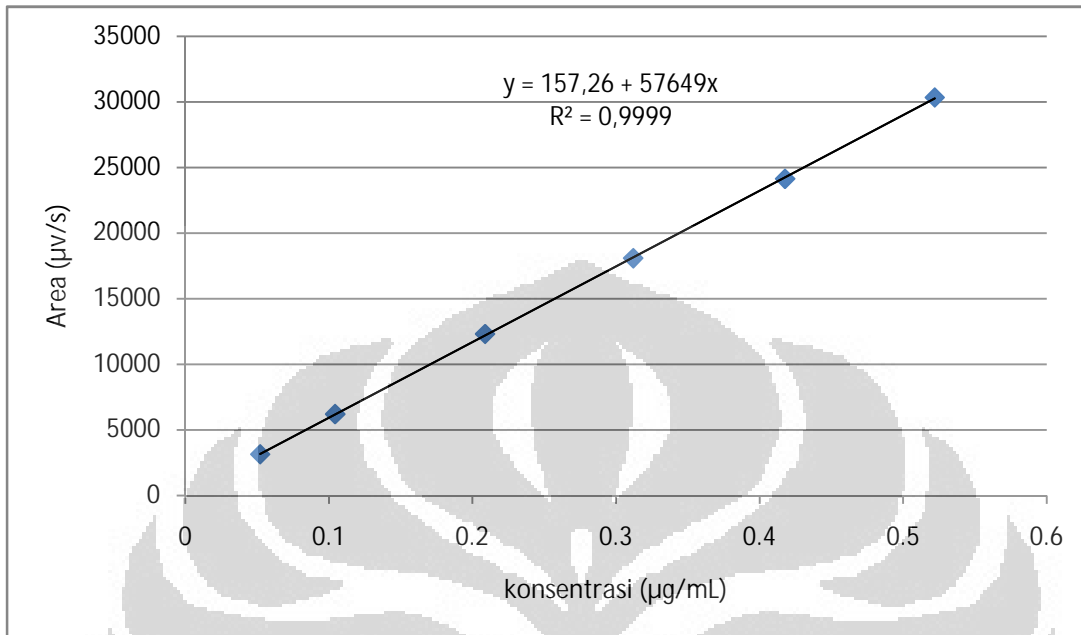
Gambar 28. Kromatogram hasil *spiking* sampel D (Indonesia) menggunakan KCKT dengan detektor PDA.

Kondisi: Kolom Lichrosphere 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 5 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, panjang gelombang 315 nm, volume penyuntikan 20,0 μL dengan *auto injector*, waktu retensi CAPE 4,083.



Gambar 29. Kurva kalibrasi standar Artepillin C.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm), fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 µL, panjang gelombang 315 nm, detektor UV.



Gambar 30. Kurva kalibrasi standar CAPE.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm), fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 µL, panjang gelombang 315 nm, detektor UV.

Tabel 2
Pemilihan Fase Gerak untuk Analisis Artepillin C

Komposisi fase gerak (asam format 1,5% dalam air : asam format 1,5% dalam asetonitril)	Kecepatan alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)	Faktor ikutan	Jumlah lempeng teoritis (N)	HETP (cm)
30:70 v/v	0,8	9,424	1	1775,22	0,0141
	1,0	7,753	1	1986,6	0,0126
	1,2	6,025	1	1642,95	0,0152
60:40 v/v	1,5	50,795	1	2116	0,0118
	1,8	19,515	1	1011,24	0,0247

Tabel 3
Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Pengujian Linearitas Artepillin C

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{v/s}$)
0,01	1547
0,05	5172
0,1	9703
0,2	18810
0,3	27954
0,4	36894

Persamaan garis kurva kalibrasi: $y = 643,1037 + 87116,0118x$ dengan koefisien korelasi, r , adalah 0,9999.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μL , panjang gelombang 315 nm, detektor UV.

Tabel 4
 Hasil Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Artepillin C

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{v/s}$)	Yi	(y-yi) ²
0,01	1547	1550,8	14,81264564
0,05	5172	5181,8	96,89646096
0,1	9703	9720,6	309,3096038
0,2	18810	18798	142,2199354
0,3	27954	27876	6152,582595
0,4	36894	36953	3486,760781
		$\Sigma =$	10202,58202

$S (y/x) = 50,5039$
 $b = 87116,0119$
 $x \text{ rata-rata} = 0,1841$
 $S_{x0} = 0,0006$
 $V_{x0} = 0,0031$
 $LOD = 0,0017 \mu\text{g/mL}$
 $LOQ = 0,0058 \mu\text{g/mL}$

Tabel 5
Hasil Perhitungan Uji Presisi Artepillin C

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{v/s}$)	Konsentrasi pengukuran ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi rata-rata ($\mu\text{g/mL}$)	Simpangan baku (SB)	Koefisien variasi (%) (KV)
0,01	1547	0,0104	0,0104	0,00008	0,8009
	1550	0,0104			
	1558	0,0105			
	1542	0,0103			
	1552	0,0104			
	1562	0,0105			
0,2	18810	0,2085	0,2071	0,0012	0,5719
	18643	0,2066			
	18768	0,2081			
	18645	0,2066			
	18526	0,2053			
	18731	0,2076			
0,4	36894	0,4161	0,4151	0,0052	1,2700
	37327	0,4211			
	36840	0,4155			
	36128	0,4073			
	37210	0,4197			
	36417	0,4106			

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μL , panjang gelombang 315 nm, detektor UV.

Tabel 6
Data Uji Perolehan Kembali Artepillin C

Sampel	Konsentrasi	Konsentrasi	Luas Puncak ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi	UPK (%)
	hasil sampel ($\mu\text{g/ml}$)	analit yang ditambahkan ($\mu\text{g/mL}$)		Terukur (ppm)	
Selandia Baru (A)	0,267	5,340	42230	0,477	100,86
		6,675	47313	0,536	100,59
		8,010	51593	0,585	101,63
Australia (B)	0,010	0,464	2258	0,018	99,29
		0,515	2441	0,021	99,80
		0,562	2610	0,022	98,54
Brazil (C)	0,033	0,660	5390	0,054	98,67
		0,825	6374	0,066	101,79
		0,990	6329	0,065	100,14
Indonesia (D)	0,052	1,040	8879	0,094	100,85
		1,300	9762	0,105	100,14
		1,560	10647	0,115	99,70

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μL , panjang gelombang 315 nm, detektor UV.

Tabel 7
Pemilihan Fase Gerak Untuk Analisis CAPE

Komposisi fase gerak (asam format 1,5% dalam air : asam format 1,5% dalam asetonitril)	Kecepatan alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)	Faktor ikutan	Jumlah lempeng teoritis (N)	HETP (cm)
30:70 v/v	0,8	5,586	1	961	0,02601
	1,0	4,562	1	940,44	0,02658
	1,2	3,675	1	900	0,0277
60:40 v/v	1,5	20,249	1	1337,45	0,01869
	1,8	8,379	1	256	0,0976

Tabel 8
Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Pengujian Linearitas CAPE

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{v/s}$)
0,05	3133
0,1	6191
0,2	12305
0,3	18079
0,4	24132
0,5	30334

Persamaan garis kurva kalibrasi: $y = 157,2563 + 57649,3086x$ dengan koefisien korelasi, r , adalah 0,9999.

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μL , panjang gelombang 315 nm, detektor UV.

Tabel 9
 Hasil Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi CAPE

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)	y_i	$(y-y_i)^2$
0,05	3133	3166,5	1120,763093
0,1	6191	6175,8	232,3917314
0,2	12305	12194	12252,01045
0,3	18079	18144	4184,537344
0,4	24132	24243	12310,39068
0,5	30334	30250	7059,696484
		$\Sigma =$	37159,78978

$$S (y/x) = 96,3843$$

$$b = 57,649$$

$$x \text{ rata-rata} = 0,2695$$

$$S_{x0} = 0,0016$$

$$V_{x0} = 0,0062$$

$$\text{LOD} = 0,0050 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{LOQ} = 0,0167 \mu\text{g/mL}$$

Tabel 10
Hasil Perhitungan Uji Presisi CAPE

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{v/s}$)	Konsentrasi pengukuran ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi rata-rata ($\mu\text{g/mL}$)	Simpangan baku (SB)	Koefisien variasi (%) (KV)
0,05	3133	0,0516	0,0518	0,000276	0,531538
	3169	0,0522			
	3146	0,0518			
	3131	0,0516			
	3134	0,0516			
	3160	0,0521			
0,3	18079	0,3109	0,3136	0,002974	0,948173
	18028	0,3100			
	18246	0,3138			
	18262	0,3141			
	18297	0,3147			
	18509	0,3183			
0,5	30334	0,5235	0,5243	0,0049	0,934699
	30113	0,5196			
	30704	0,5299			
	30082	0,5191			
	30319	0,5232			
	30738	0,5305			

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μL , panjang gelombang 315 nm, detektor UV.

Tabel 11
Data Uji Perolehan Kembali CAPE

Sampel	Konsentrasi hasil sampel ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi analit yang ditambahkan (μmL)	Luas Puncak ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi Terukur (ppm)	UPK (%)
Selandia Baru (A)	0,382	7,640	39994	0,691	98,87
		9,550	40300	0,696	100,57
		11,460	46661	0,806	101,56
Australia (B)	0,016	0,715	1807	0,028	100,15
		0,950	1990	0,031	100,00
		0,874	2137	0,034	100,00
Brazil (C)	0,381	7,620	39823	0,688	98,28
		9,522	40381	0,697	100,39
		11,437	46441	0,803	100,92
Indonesia (D)	0,291	5,820	29034	0,501	100,47
		7,275	29126	0,502	101,23
		8,370	34594	0,597	98,15

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 μm , fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 μL , panjang gelombang 315 nm, detektor UV.

Tabel 12
Data Penetapan Kadar CAPE

Sampel	Konsentrasi sampel (µg/ml)	Konsentrasi hasil sampel (µg/ml)	Luas Puncak (µV/s)
Selandia Baru (A)	207,6	0,382	22210
Indonesia (D)	272,8	0,291	16940

Kondisi: Kolom kromasil 100 – 5 C18 (25 cm x 4,6 mm) ukuran partikel 8 µm, fase gerak asam format 1,5% dalam air – asam format 1,5% dalam asetonitril (60:40), kecepatan alir 1,8 mL/menit dari menit ke-0 hingga menit ke-8 lalu dari menit ke-8 hingga menit ke-10 diubah menjadi 1,0 mL/menit selanjutnya pada menit ke-10 diubah kembali menjadi 1,8 mL/menit, volume penyuntikan 20,0 µL, panjang gelombang 315 nm, detektor UV.

Lampiran 1
Cara Memperoleh Persamaan Garis Linier

Persamaan garis $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum xi.yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[(N\sum x^2) - (\sum x)^2][(N\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$$

Lampiran 2

Cara Perhitungan Simpangan Baku dan Koefisien Variasi

$$\text{Rata-rata : } \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\text{Simpangan Baku : } SB = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{Koefisien Variasi : } KV = \frac{SB}{\bar{x}} \times 100\%$$

Contoh :

Hasil uji presisi standar Artepillin C 0,4168 µg/mL :

Konsentrasi rata-rata (\bar{x}) = 0,4151 µg/mL.

$$SB = \frac{\sqrt{(0,4168 - 0,4151)^2 + \dots + (0,4168 - 0,4151)^2}}{6 - 1}$$

$$SB = 0,005272$$

$$KV = \frac{0,005272}{0,4151} \times 100\%$$

$$= 0,22 \%$$

Lampiran 3
Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{(\sum (y - y_i))^2}{n - 2}}$$

Batas deteksi : $LOD = \frac{3S(y/x)}{b}$

Batas kuantitasi : $LOQ = \frac{10S(y/x)}{b}$

Contoh :

Persamaan kurva kalibrasi Artepillin C : $y = 643,1037 + 87116,01189x$

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{(1547 - 1550,8)^2 + \dots + (36894 - 36953)^2}{6 - 2}}$$

$$= 50,50391574$$

Batas deteksi Artepillin C : $LOD = \frac{3 \times 50,50391574}{87116,01189} = 0,001739195 \mu\text{g/mL}$

Batas kuantitasi Artepillin C : $LOQ = \frac{10 \times 50,50391574}{87116,01189} = 0,00579732 \mu\text{g/mL}$

Lampiran 4
Cara perhitungan uji perolehan kembali

Uji Perolehan Kembali (UPK) dihitung dengan rumus :

$$\text{UPK} = \frac{x' - x_0}{x^*o} \times 100\%$$

Keterangan :

x' = Berat (μg) total sampel yang telah ditambahkan standar berdasarkan hasil perhitungan menggunakan persamaan kurva kalibrasi

x_0 = Berat (μg) sampel berdasarkan hasil perhitungan menggunakan persamaan kurva kalibrasi

x^*o = Berat (μg) standar yang ditambahkan

Contoh :

Untuk uji perolehan kembali Artepillin C pada sampel A konsentrasi 0,267 $\mu\text{g}/\text{mL}$ didapat area 42230.

Dimasukkan ke dalam persamaan kurva kalibrasi didapatkan konsentrasi sebesar 0,477 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Jadi uji perolehan kembalinya adalah :

$$\begin{aligned} \text{UPK} &= \frac{x' - x_0}{x^*o} \times 100\% \\ &= \frac{0,477 - 0,267}{0,2084} \times 100\% \\ &= 100,86\% \end{aligned}$$

Sertifikat Analisis Artepillin C

CERTIFICATE OF ANALYSIS : 016-19131

1/1



Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan

Certificate of Analysis

Product Number : 016-19131
 Chemical Name : Artepillin C, from Propolis
 Grade : for Biochemistry
 Lot Number : PEJ4612
 Unit : 10mg

TEST	SPECIFICATION	RESULT
Appearance	White-nearly white, crystalline powder-powder	Passed
Solubility in methanol	to pass test(dissolve)	Dissolve
Assay (HPLC)	min. 98.0%	99.5%
Date of QC-Release		Jul. 18, 2008

M. Nanaura
 Mitsuo Nanaura General Manager
 Q.A. Departmennt

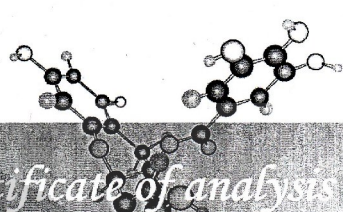
This is an electronically generated document

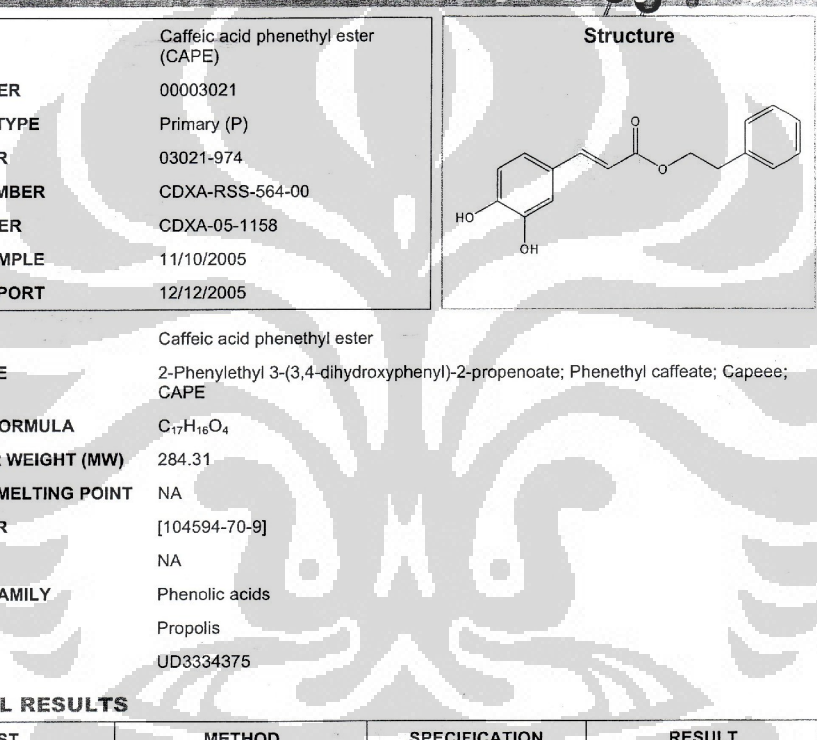
Date of issue : Jun. 10, 2009
 Issuing Number : 7502233

https://www.e-reagent.com/cgi-bin/gx.cgi/AppLogic+ufg280kisi_pr.ufg280kisi_sikenDisp

2009/06

Sertifikat Analisis CAPE



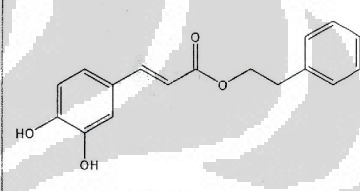


certificate of analysis

PRODUCT	Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)
PART NUMBER	00003021
STANDARD TYPE	Primary (P)
LOT NUMBER	03021-974
REPORT NUMBER	CDXA-RSS-564-00
CDXA NUMBER	CDXA-05-1158
DATE OF SAMPLE	11/10/2005
DATE OF REPORT	12/12/2005

NAME	Caffeic acid phenethyl ester
OTHER NAME	2-Phenylethyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoate; Phenethyl caffeate; Capeee; CAPE
CHEMICAL FORMULA	C ₁₇ H ₁₆ O ₄
MOLECULAR WEIGHT (MW)	284.31
PUBLISHED MELTING POINT	NA
CAS NUMBER	[104594-70-9]
EINECS	NA
CHEMICAL FAMILY	Phenolic acids
FROM	Propolis
RTECS	UD3334375

Structure



ANALYTICAL RESULTS

TEST	METHOD	SPECIFICATION	RESULT
Adjusted Purity	NA	NA	99.4%
HPLC	CDXA-CPM-093-00	NA	99.7%
NMR	NA	Conforms	Conforms
Mass Spec.	Direct Infusion, ESI (-)	Conforms	Conforms
Residual Solvent	CDXA-AM-001-00	NA	MTBE - 0.1%
Water	CDXA-AM-089-00	NA	0.2%
Appearance	NA	NA	Off-White Powder

ADJUSTED PURITY: 99.7% IS BASED ON (100% + 0.2% WATER - 0.1% SOLVENTS) X 99.7% HPLC

STORAGE CONDITIONS

STORAGE	-20 °C in a dry place.	
EXPIRATION DATE	11/2010 under the above conditions.	

CHROMADEX INC.

Tel: 949. 419. 0288 www.chromadex.com Fax: 949. 419. 0294

Brian Schaneberg, PhD

Digitally signed by Brian Schaneberg, DN: cn=Brian Schaneberg, o=CHROMADEX, ou=CHROMADEX, email=brian@chromadex.com, c=USA
Reason: I am approving this document.
Date: 2006.02.14 09:24:32 -0700

Page 1 of 4