

**VALIDASI METODE ANALISIS HPTLC UNTUK
ANALISIS *FUCOXANTHIN* DAN *ASTAXANTHIN*
SECARA SIMULTAN DAN APLIKASINYA
PADA ANALISIS EKSTRAK ALGA COKELAT
(*Padina australis*)**

**VALIDATION OF HPTLC ANALYSIS METHOD FOR
SIMULTANEOUS *FUCOXANTHIN* AND
ASTAXANTHIN ANALYSIS AND ITS APPLICATION
IN ANALYSIS BROWN ALGAE (*Padina australis*)
EXTRACT**

**HILMAN SYAMAMI ZAMAN
N011 19 1060**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**VALIDASI METODE ANALISIS HPTLC UNTUK
ANALISIS *FUCOXANTHIN* DAN *ASTAXANTHIN*
SECARA SIMULTAN DAN APLIKASINYA
PADA ANALISIS EKSTRAK ALGA COKELAT
(*Padina australis*)**

**VALIDATION OF HPTLC ANALYSIS METHOD FOR
SIMULTANEOUS *FUCOXANTHIN* AND
ASTAXANTHIN ANALYSIS AND ITS APPLICATION
IN ANALYSIS BROWN ALGAE (*Padina australis*)
EXTRACT**

**HILMAN SYAMAMI ZAMAN
N011 19 1060**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**VALIDASI METODE ANALISIS HPTLC UNTUK ANALISIS
FUcoxANTHIN DAN ASTAXANTHIN SECARA SIMULTAN DAN
APLIKASINYA PADA ANALISIS EKSTRAK ALGA COKELAT
(*Padina australis*)**

**VALIDATION OF HPTLC ANALYSIS METHOD FOR SIMULTANEOUS
FUcoxANTHIN AND ASTAXANTHIN ANALYSIS AND ITS
APPLICATION IN ANALYSIS BROWN ALGAE (*Padina australis*)
EXTRACT**

SKRIPSI

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

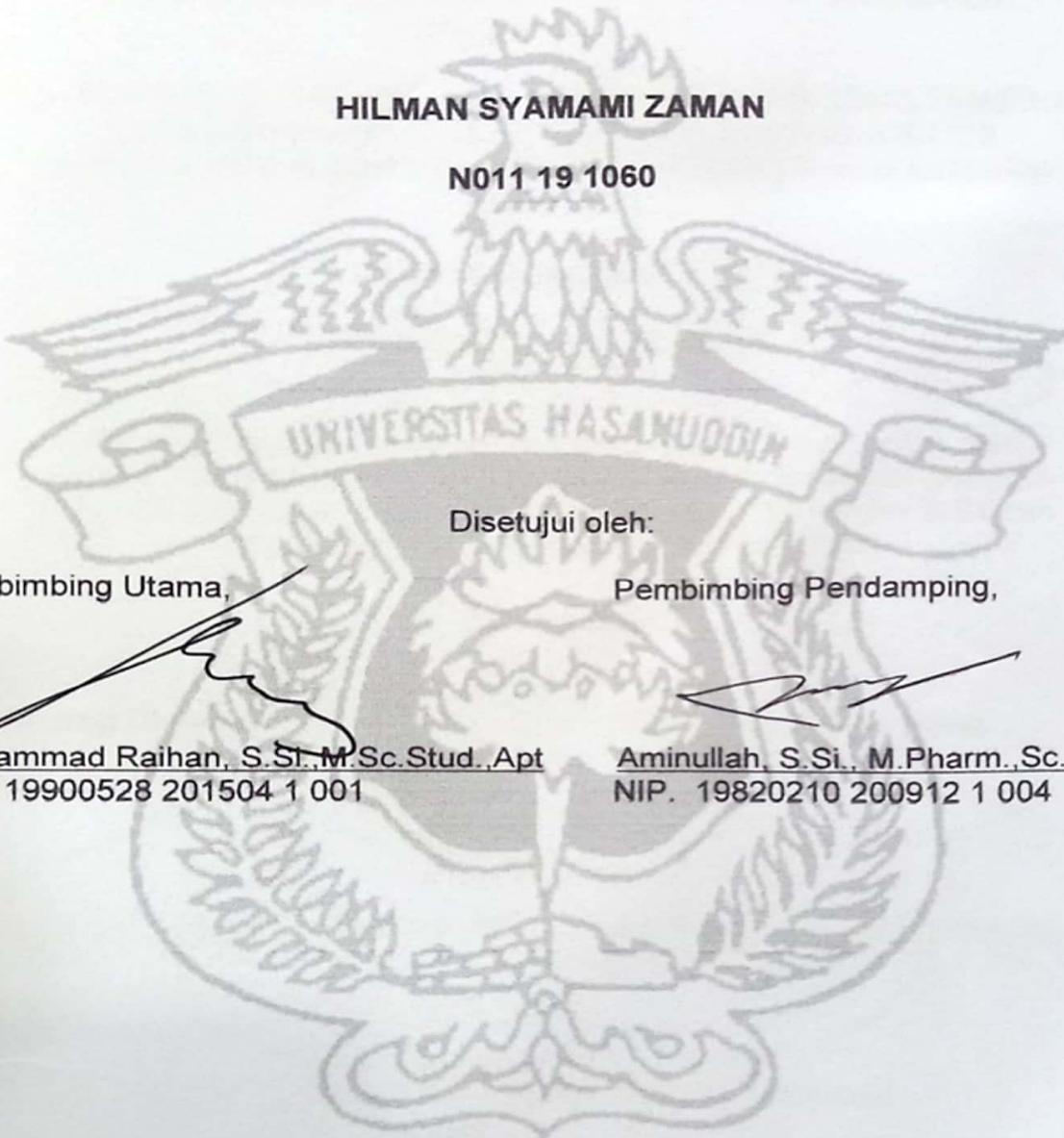
**HILMAN SYAMAMI ZAMAN
N011 19 1060**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**VALIDASI METODE ANALISIS HPTLC UNTUK ANALISIS
FUcoxanthin DAN ASTAXANTHIN SECARA SIMULTAN DAN
APLIKASINYA PADA ANALISIS EKSTRAK ALGA COKELAT
(*Padina australis*)**

HILMAN SYAMAMI ZAMAN

N011 19 1060



Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

Muhammad Raihan, S.St., M.Sc.Stud., Apt
NIP. 19900528 201504 1 001

Aminullah, S.Si., M.Pharm., Sc., Apt.
NIP. 19820210 200912 1 004

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

VALIDASI METODE ANALISIS HPTLC UNTUK ANALISIS
FUcoxANTHIN DAN ASTAXANTHIN SECARA SIMULTAN DAN
APLIKASINYA PADA ANALISIS EKSTRAK ALGA COKELAT
(*Padina australis*)

VALIDATION OF HPTLC ANALYSIS METHOD FOR SIMULTANEOUS
FUcoxANTHIN AND ASTAXANTHIN ANALYSIS AND ITS
APPLICATION IN ANALYSIS BROWN ALGAE (*Padina australis*)
EXTRACT

Disusun dan diajukan oleh:

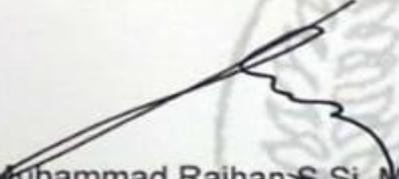
HILMAN SYAMAMI ZAMAN
N011 19 1060

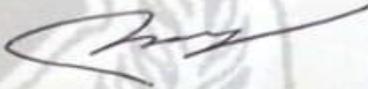
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam
rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Studi Farmasi fakultas
Farmasi universitas Hasanuddin Pada tanggal 13 Februari 2024 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

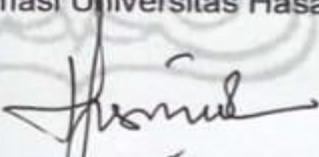
Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,


Muhammad Raihan, S.Si., M.Sc.Stud., Apt.
NIP. 19900528 201504 1 001


Aminullah, S.Si., M.Pharm., Sc., Apt.
NIP. 19820210 200912 1 004

Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin


Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt
NIP. 198601162 201012 2 009

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Hilman Syamami Zaman

Nim : N011 19 1060

Program Studi : Farmasi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul "Validasi Metode Analisis HPTLC untuk Analisis *Fucoxanthin* dan *Astaxanthin* Secara Simultan dan Aplikasinya Pada Analisis Ekstrak Alga Cokelat (*Padina australis*)" adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 13 Februari 2024

Yang menyatakan




Hilman Syamami Zaman

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji bagi Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas segala limpahan rahmat, taufik, karunia dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang diajukan untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar sarjana di Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi terdapat banyak kendala yang penulis hadapi, namun karena kemudahan yang diberikan oleh Allah Subhanahu Wa Ta'ala serta do'a dan dukungan dari orang-orang yang penulis cintai dapat mengatasi kendala-kendala tersebut. Dengan segala kerendahan hati dan ketulusan jiwa, ucapan rasa syukur dan terima kasih yang tiada henti-hentinya kepada:

1. Bapak Muhammad Raihan, S.Si., M.Sc.Stud., Apt. selaku pembimbing utama dan bapak Aminullah, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu, tenaga serta pikiran dan telah memberikan penulis kesempatan kembali untuk menyusun skripsi ini hingga selesai.
2. Dosen penguji, yaitu Bapak Drs. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt. dan Ibu Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. yang senantiasa memberikan kritik serta saran yang membangun untuk hasil penelitian yang lebih baik.
3. Laboran di laboratorium Farmakognosi-Fitokimia terkhusus pada kak Abdi dan Kak Nina serta laboran Biofarmaka, kak Dewi atas

arahan serta saran selama pelaksanaan penelitian dan penyiapan fasilitas penelitian di laboratorium.

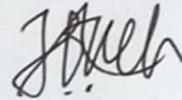
4. Kedua malaikat yang Allah kirimkan untuk penulis, ayahanda Syamsuri Yusuf dan ibunda Widya Rahmi yang telah memberikan waktu, tenaga, keringat, do'a, harta serta darahnya dan memberikan kepercayaan kepada penulis dalam memilih jalan hidupnya sendiri serta menjadi motivasi terbesar penulis dalam menyelesaikan skripsi ini di saat penulis hampir tidak akan menyelesaikannya. Segala hal yang diberikan tentunya tidak akan bisa penulis balas meskipun menghabiskan seluruh usia penulis.
5. Saudara-saudari penulis, Callia Syamami Al-Baehaqi dan Haikal Syamami Yusuf serta keluarga penulis yang selalu memberikan semangat dan menjadi tempat penulis untuk pulang.
6. Teman perantau dan seperjuangan penulis, Hikmat Al Hakim yang kurang lebih sudah bersama selama empat tahun ini. Terima kasih atas dukungan dan sarannya selama ini.
7. Rekan penelitian yang penulis tinggalkan, Fitrah Prana Mulya yang menemani penulis dalam melaksanakan penelitian dan dengan sabar menjawab setiap pertanyaan dan kebingungan penulis.
8. Kepada teman-teman Korps asisten Farmasetika 2019 "Farset Gemoy" Mahfud, Hikmat, Diki, Muram, Diany, Andipia, Ai, Ara, Ucha, Ina, Rissa, Hanin, Alya, Atikah, Hangga, Elma dan Arda

karena masih memberikan kepercayaan dan semangat meskipun sudah penulis tinggalkan di saat seharusnya masih mengawas.

9. Kepada Prof. Andi Dian Permana, S.Si, M.Si., Ph.D., Apt. selama perkuliahan memberikan banyak kesempatan dan pengalaman untuk melaksanakan penelitian serta permintaan maaf karena tidak bisa menyelesaikan skripsi seperti yang seharusnya.
10. Laboran Farmasetika, kak Sumi dan kakak-kakak asisten 2018, 2017, 2016 serta adik-adik asisten 2020 lucu dan menggemaskan yang telah memberikan banyak ilmu, kenangan, pembelajaran dan pengalaman selama menjadi asisten Farmasetika.
11. Teman-teman Angkatan 2019, DEX19EN, yang senantiasa memberikan semangat dan dukungan meskipun dengan beberapa kejadian belakangan ini.
12. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan namanya satu per satu atas bantuan dan kerja samanya kepada penulis.

Semoga Allah membalas semua kebaikan yang telah diberikan dan semoga karya ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan terkhusus dibidang kefarmasian.

Makassar, 13 Februari 2024



Hilman Syamami Zaman

ABSTRAK

HILMAN SYAMAMI ZAMAN. Validasi Metode Analisis HPTLC untuk Analisis *Fucoxanthin* dan *Astaxanthin* Secara Simultan dan Aplikasinya Pada Analisis Ekstrak Alga Cokelat (*Padina australis*) (Dibimbing oleh Muhammad Raihan dan Aminullah)

Alga cokelat (*Padina australis*) banyak terdapat di Indonesia namun belum banyak dimanfaatkan atau diaplikasikan dalam produk olahan. *Padina australis* berpotensi sebagai antioksidan alami. Salah satu jenis senyawa bioaktif yang menarik untuk diteliti adalah senyawa *xanthophyll*, seperti *fucoxanthin* dan *astaxanthin*. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui validitas metode HPTLC dan aplikasi metode analisis yang dikembangkan pada hasil ekstraksi *fucoxanthin* dan *astaxanthin* dari *Padina australis*. Pengujian dilakukan menggunakan metode KLT-Densitometri untuk mengetahui Linearitas, Akurasi, Presisi, LOD, LOQ dan kadar ekstrak *Padina australis*. Hasil validasi dan analisis kadar menggunakan metode KLT-Densitometri menunjukkan Linearitas *astaxanthin* dengan nilai koefisien determinasi 0,9956 dan 0,9953 untuk *fucoxanthin*. Nilai LOD 4,79 µg/mL untuk *astaxanthin* dan 15,98 µg/mL untuk *fucoxanthin*, dan LOQ yaitu 4,94 µg/mL untuk *astaxanthin* dan 16,48 µg/mL untuk *fucoxanthin*. Nilai akurasi dengan hasil persen perolehan kembali berkisar antara 102,19% - 127,19% untuk *astaxanthin* dan 94,94% - 105,55% untuk *fucoxanthin*. Nilai presisi dengan Simpangan Baku Relatif (RSD) yaitu 8,75% untuk *astaxanthin* dan 6,79% untuk *fucoxanthin*. Hasil kadar tidak terbaca untuk *astaxanthin* dan hasil kadar *fucoxanthin* menunjukkan rata-rata $0,0625 \pm 0,01$ untuk metode maserasi, $0,0882 \pm 0,0099$ untuk metode UAE dan $0,0664 \pm 0,017$ untuk metode MAE. Kedua senyawa yang dianalisis dapat dilakukan validasi dan aplikasi metode untuk penetapan kadar secara simultan.

Kata Kunci: *Padina australis*, *Astaxanthin*, *Fucoxanthin*, KLT-Densitometri, Validasi Metode Analisis

ABSTRACT

HILMAN SYAMAMI ZAMAN. Validation of HPTLC Analysis Method for Simultaneous *Fucoxanthin* and *Astaxanthin* Analysis and Its Application in Analysis Brown Algae (*Padina Australis*) Extract (Supervised by Muhammad Raihan and Aminullah)

Brown algae (*Padina australis*) is widely found in Indonesia but has not been widely utilised or applied in processed products. *Padina australis* has potential as a natural antioxidant. One type of bioactive compound that is interesting to study is xanthophyll compounds, such as *fucoxanthin* and *astaxanthin*. The purpose of this study was to determine the validity of the HPTLC method and the application of analytical methods developed on the extraction of *fucoxanthin* and *astaxanthin* from *Padina australis*. The test was conducted using KLT-Densitometry method to determine Linearity, Accuracy, Precision, LOD, LOQ and levels of *Padina australis* extract. The results of validation and analysis of levels using the KLT-Densitometry method show the linearity of *astaxanthin* with a coefficient of determination of 0,9956 and 0,9953 for fuxocanthin. The LOD value was 4,79 µg/mL for *astaxanthin* and 15,98 µg/mL for *fucoxanthin*, and LOQ was 4,94 µg/mL for *astaxanthin* and 16,48 µg/mL for *fucoxanthin*. Accuracy value with percent recovery ranged from 102,19% - 127,19% for *astaxathin* and 94,94% - 105,55% for *fucoxanthin*. Precision values with Relative Standard Deviation (RSD) were 8,75% for *astaxanthin* and 6,79% for *fucoxanthin*. The results of unreadable levels for *astaxanthin* and *fucoxanthin* showed an average of $0,0625 \pm 0,014$ for maceration method, $0,0882 \pm 0,0099$ for UAE method and $0,0664 \pm 0,017$ for MAE method. Both compounds analysed can be validated and method application for simultaneous determination of levels.

Keywords: *Padina australis*, *Astaxanthin*, *Fucoxanthin*, KLT-Densitometry, Analytical Method Validation

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PENINJUK SKRIPSI	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	
DAFTAR GAMBAR	
DAFTAR LAMPIRAN	
DAFTAR SINGKATAN	
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	4
I.3 Tujuan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Alga Cokelat (<i>Padina australis</i>)	5
II.1.1 Kandungan senyawa	6
II.1.2 Manfaat <i>Padina australis</i>	7
II.2 Senyawa Karotenoid	8

II.2.1	Karoten	9
II.2.2	<i>Xanthophyll</i>	9
II.2.2.1	<i>Astaxanthin</i>	9
II.2.2.2	<i>Fucoxanthin</i>	10
II.3	Ekstraksi	11
II.3.1	Pengertian Ekstraksi	11
II.3.2	Prinsip ekstraksi	12
II.3.3	Metode-metode ekstraksi	12
II.3.3.1	Maserasi	12
II.3.3.2	Perkolasi	13
II.3.3.3	Sokletasi	14
II.3.3.4	Refluks	15
II.3.3.5	Infusa	16
II.3.3.6	Dekokta	16
II.3.3.7	UAE (<i>Ultrasonic Assisted Extraction</i>)	17
II.3.3.8	MAE (<i>Microwave Assisted Extraction</i>)	17
II.4	Pemisahan Senyawa dengan Kromatografi	18
II.4.1	Kromatografi Lapis Tipis	18
II.4.2	KLT-Densitometri (HPTLC)	19
II.5	Validasi metode analisis	21
II.5.1	Akurasi	22
II.5.1.1	Metode simulasi (<i>Spiked-placebo recovery</i>)	22
II.5.1.2	Metode penambahan baku (<i>Standard addition method</i>)	23
II.5.2	Presisi	23
II.5.2.1	Keterulangan (<i>Repeatability</i>)	24

II.5.2.2 Presisi antara	24
II.5.2.3 Ketertiruan (<i>Reproducibility</i>)	24
II.5.3 Linearitas	25
II.5.4 LOD (<i>Limit of Detection</i>) dan LOQ (<i>Limited of Quantification</i>)	25
BAB III METODE PENELITIAN	27
III.1 Alat dan Bahan	27
III.2 Metode Penelitian	27
III.2.1 Validasi Metode Analisis	27
III.2.1.1 Linearitas	27
III.2.1.2 Akurasi	28
III.2.1.3 Presisi	28
III.2.1.4 LOD (<i>Limit of Detection</i>) dan LOQ (<i>Limit of Quantification</i>)	28
III.2.1.5 Perhitungan <i>percent recovery</i>	29
III.2.2 Pengambilan dan Penyiapan Alga Cokelat <i>(Padina australis)</i>	29
III.2.3 Aplikasi untuk penetapan kadar ekstrak <i>Padina australis</i>	30
III.2.3.1 Ekstraksi maserasi	30
III.2.3.2 Ekstraksi UAE (<i>Ultrasonic Assisted Extraction</i>)	30
III.2.3.3 Ekstraksi MAE (<i>Microwave Assisted Extraction</i>)	30
III.2.4 Analisis kadar menggunakan HPTLC	31
III.3 Analisis Data dan Penarikan Kesimpulan	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	32
IV.1 Validasi Metode Analisis	32
IV.1.1 Linearitas	32
IV.1.2 Akurasi	34

IV.1.3	Presi	36
IV.1.4	LOD (<i>Limit of Detection</i>) dan LOQ (<i>Limit of Quantification</i>)	37
IV.2	Ekstraksi	38
IV.3	Aplikasi untuk penetapan kadar ekstrak	
	<i>Padina australis</i>	39
BAB V PENUTUP		43
V.1	Kesimpulan	43
V.2	Saran	43
DAFTAR PUSTAKA		45
LAMPIRAN		50

DAFTAR TABEL

Tabel

1. Rentang kesalahan yang diizinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks	23
2. Hasil uji linearitas baku <i>astaxanthin</i> dan <i>fucoxanthin</i>	33
3. Hasil pengukuran akurasi <i>astaxanthin</i>	35
4. Hasil pengukuran akurasi <i>fucoxanthin</i>	35
5. Hasil pengukuran presisi <i>astaxanthin</i>	36
6. Hasil pengukuran presisi <i>fucoxanthin</i>	36
7. Hasil perhitungan LOD dan LOQ baku <i>astaxanthin</i>	37
8. Hasil perhitungan LOD dan LOQ baku <i>fucoxanthin</i>	37
9. Hasil ekstraksi alga cokelat (<i>Padina australis</i>)	38
10. Hasil luas area dan persen kadar <i>astaxanthin</i> hasil ekstraksi maserasi	40
11. Hasil luas area dan persen kadar <i>fucoxanthin</i> hasil ekstraksi maserasi	40
12. Hasil luas area dan persen kadar <i>astaxanthin</i> hasil ekstraksi UAE	41
13. Hasil luas area dan persen kadar <i>fucoxanthin</i> hasil ekstraksi UAE	41
14. Hasil luas area dan persen kadar <i>astaxanthin</i> hasil ekstraksi MAE	41
15. Hasil luas area dan persen kadar <i>fucoxanthin</i> hasil ekstraksi MAE	41

DAFTAR GAMBAR

1. Alga cokelat <i>Padina australis</i>	5
2. Struktur <i>astaxanthin</i>	10
3. Struktur <i>fucoxanthin</i>	11
4. Proses maserasi	13
5. Perkolator	14
6. Alat sokletasi	15
7. Alat refluks	16
8. Alat sonikator	17
9. Ekstraksi dengan metode MAE	18
10. Grafik linearitas baku <i>astaxanthin</i>	33
11. Grafik linearitas baku <i>fucoxanthin</i>	34
12. Profil KLT ekstrak alga cokelat di UV 366 nm	39
13. Hasil densitogram ekstrak alga cokelat dan baku <i>astaxanthin</i> <i>fucoxanthin</i> di UV 366 nm	39
14. Densitogram linearitas	52
15. Densitogram akurasi	53
16. Densitogram presisi	57
17. Densitogram kadar <i>astaxanthin</i> dan <i>fucoxanthin</i>	62
18. Sampel <i>Padina australis</i>	66
19. Proses pengeringan <i>Padina australis</i>	66
20. Proses maserasi	66

21. Proses UAE	66
22. Proses MAE	66
23. <i>Chamber</i> CAMAG	66
24. Proses penyaringan ekstrak	67
25. Proses penguapan pelarut	67
26. Proses penotolan ekstrak	67
27. Proses elusi sampel	67
28. Pengukuran luas area dengan KLT Densitometri	67

DAFTAR LAMPIRAN

1. Skema kerja penelitian	50
2. Perhitungan	52
3. Dokumentasi Penelitian	66
4. Hasil Kromatogram Validasi Metode Analisis	68
5. Hasil Kromatogram Ekstrak	75
6. <i>Certificate of Analysis</i> Baku	78

DAFTAR SINGKATAN

HPLC	= <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPTLC	= <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
TLC	= <i>Thin Layer Chromatography</i>
μl	= Mikroliter
AUC	= <i>Area Under Curve</i>
KCKT	= Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
LOD	= <i>Limit of Detection</i>
LOQ	= <i>Limit of Quantification</i>
mL	= Mililiter
nm	= Nanometer
μg/mL	= <i>Parts per million</i>
R _f	= <i>Retardation factor</i>
UV	= <i>Ultra Violet</i>
Vis	= <i>Visible</i>

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Dalam beberapa tahun terakhir, permintaan konsumen akan produk-produk yang bersumber secara alami untuk meningkatkan kesehatan dan mengurangi penyakit terus meningkat (Plaza dkk., 2010). Permintaan ini menyebabkan peningkatan minat terhadap sumber makanan alami, farmasi, dan produk kosmetik baru (Yamamoto dkk., 2011; Kanda dkk., 2014). Dalam konteks ini, lingkungan laut telah dianggap sebagai reservoir senyawa alami yang potensial (Alves dkk., 2016). Di antara organisme yang ada di lingkungan ini, alga cokelat menjadi salah satu kandidat yang menjanjikan. Alga cokelat merupakan kelompok organisme produsen fotosintesis polifiletik yang mewakili sumber komponen kimia yang menarik dengan aktivitas biologis bernilai tinggi. (Agrios dkk., 2005). Salah satu alga cokelat yang menarik untuk diteliti adalah *Padina australis*.

Padina australis, alga cokelat yang ditemukan di beberapa negara Asia Tenggara termasuk Vietnam, Malaysia, Indonesia dan Thailand, termasuk kelas Heterokontophyta dan anggota Phaeophyceae (Salosso dkk., 2020). *Padina australis* banyak terdapat di Indonesia namun belum banyak dimanfaatkan atau diaplikasikan dalam produk olahan. *Padina australis* berpotensi sebagai antioksidan alami dan mengandung senyawa aktif di dalamnya seperti flavonoid, alkaloid, tanin, triterpenoid, saponin, fenolat, dan pigmen seperti klorofil a, klorofil c, karotenoid, *fucoxanthin*,

fukoxantol dan β - karoten (Hidayati dkk., 2017). Berdasarkan penelitian oleh Balasubramaniam, dkk. (2020), identifikasi senyawa bioaktif dilakukan menggunakan sistem HPTLC untuk visualisasi cepat. Dalam penelitian tersebut dilaporkan adanya senyawa bioaktif seperti *fucoxanthin*, *lutein*, *astaxanthin*, *canthaxanthin* dan *zeaxanthin*.

Salah satu jenis senyawa bioaktif yang menarik untuk diteliti adalah senyawa *xanthophyll*, seperti *fucoxanthin* dan *astaxanthin*. *Fucoxanthin* adalah senyawa yang termasuk dalam kelompok *xanthophyll* yang dianggap sebagai metabolit sekunder dan salah satu pigmen ganggang cokelat yang paling melimpah dan khas. Beberapa contoh alga yang dapat dimakan yang mengandung *fucoxanthin* termasuk dalam genus *Undaria*, *Padina*, *Sargassum*, *Laminaria*, *Eisenia*, *Alaria*, *Cystoseira*, atau *Hijikia* (Li dkk., 2018). *Astaxanthin* ditemukan di berbagai mikroorganisme dan hewan laut (Higuera dkk., 2006). *Astaxanthin* merupakan ketokarotenoid yang termasuk dalam kelompok terpen dan terbentuk dari lima prekursor karbon, isopentenil difosfat, dan dimetilalil difosfat. *Astaxanthin* diproduksi oleh sejumlah alga, tanaman, bakteri, dan jamur (Hastings dkk., 2016). Pada beberapa spesies alga cokelat, *astaxanthin* dilaporkan bersamaan dengan adanya *fucoxanthin* (Balasubramaniam dkk., 2020; Waghmode dkk., 2019).

Senyawa *xantophyll* pada beberapa spesies alga cokelat lain seperti *Sargassum polycystum* ditemukan mengandung *astaxanthin*, *fucoxanthin*, β -*cryptoxanthin* dan *zeaxanthin* (Balasubramaniam dkk., 2020). *Sargassum crassifolium* hanya ditemukan *fucoxanthin* (Heriyanto dkk., 2017) dan

Bifurcaria bifurcate hanya terdapat *fucoxanthin* dan *zeaxanthin* (Garcia-Perez dkk., 2022). Pengukuran *astaxanthin* dan *fucoxanthin* secara simultan pada *Padina australis* belum dilakukan dan kedua senyawa tersebut masih dapat ditemukan pada *Padina australis*. Oleh karena itu, diperlukan pengukuran *astaxanthin* dan *fucoxanthin* secara simultan dan sederhana karena sampai saat ini belum ada validasi secara simultan terhadap senyawa bioaktif *astaxanthin* dan *fucoxanthin* pada *Padina australis*.

Dalam konteks ini, validasi metode analisis senyawa bioaktif menjadi sangat penting, terutama dalam kaitannya dengan penelitian potensi alga sebagai sumber senyawa bioaktif. Validasi metode bertujuan untuk memastikan bahwa metode yang digunakan menghasilkan data yang akurat, reliabel, dan objektif. Validasi metode melibatkan pengujian dan evaluasi metode analisis yang digunakan dalam suatu studi atau pengujian untuk memastikan bahwa metode tersebut sesuai dengan tujuan yang diinginkan (Gandjar, 2014). Untuk menganalisis senyawa-senyawa bioaktif seperti *fucoxanthin* dan *astaxanthin*, diperlukan metode analisis yang akurat, sensitif, dan efisien. Salah satu metode yang digunakan dalam analisis senyawa-senyawa ini adalah *High Performance Thin Layer Chromatography* (HPTLC).

HPTLC adalah teknik untuk memisahkan senyawa kimia terlarut berdasarkan migrasi diferensial mereka pada lapisan tipis sorben, yang disusun pada pelat pendukung, menggunakan fase gerak cair. Istilah

kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (HPTLC) diciptakan dari pengenalan ukuran partikel rendah, pelat TLC kinerja tinggi, meskipun konsep tersebut telah diperluas untuk menggabungkan semua pengembangan instrumen baru. Oleh karena itu, HPTLC sekarang identik dengan TLC instrumental selain istilah yang digunakan untuk menggambarkan pelat ini. HPTLC, atau yang setara, kromatografi planar, terdiri dari semua teknik kromatografi yang menggunakan fase stasioner terbuka planar yang ada sebagai atau pada lapisan bidang (Poole, C.F., 2011).

Dalam konteks analisis senyawa *xanthophyll* secara simultan menggunakan metode HPTLC, masih terdapat kebutuhan untuk mengembangkan metode validasi yang sesuai dengan persyaratan analisis kimia modern.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka rumusan masalah yang timbul dari penelitian ini adalah;

1. Bagaimana validitas metode HPTLC untuk menganalisis senyawa *fucoxanthin* dan *astaxanthin* pada *Padina australis*?
2. Bagaimana aplikasi metode analisis yang dikembangkan pada hasil ekstraksi *fucoxanthin* dan *astaxanthin* dari *Padina australis*?

I.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan uraian rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah;

1. Untuk mengetahui validitas metode HPTLC untuk menganalisis senyawa *fucoxanthin* dan *astaxanthin* pada *Padina australis*.
2. Untuk mengetahui aplikasi metode analisis yang dikembangkan pada hasil ekstraksi *fucoxanthin* dan *astaxanthin* dari *Padina australis*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Alga Cokelat (*Padina australis*)

Padina australis merupakan salah satu jenis alga coklat yang banyak ditemukan di perairan pantai Indonesia. Jenis alga ini memiliki klasifikasi sebagai berikut:



Gambar 1. Alga coklat *Padina australis* (Hanyuda dkk., 2011)

Kingdom : Chromista
Phylum : Ochrophyta
Class : Phaeophyceae
Order : Dictyotales
Family : Dictyotaceae
Genus : Padina
Spesies : *Padina australis*

Padina australis merupakan satu-satunya genus alga coklat yang mengalami kalsifikasi dan memiliki thallus berbentuk kipas berwarna kuning kecoklatan dengan lebar hingga 4 cm dan tinggi 7 cm. Fragmennya tampak

seperti daun pipih berwarna coklat muda dengan garis radial pada setiap daunnya, membentuk septa atau ruas yang berfungsi sebagai pengukur kualitas air di sekitar habitatnya (Kasanah dkk., 2022). Margin sel *Padina australis* berbentuk meristematik yang menggulung ketika pertumbuhannya dimulai. Thalli terdiri dari dua atau lebih lapisan sel yang tebal (hingga 20 lapisan) dan tegak hingga tidak tegak tergantung. Spesies *Padina* tersebar luas di daerah pantai beriklim hangat hingga tropis di mana mereka dapat ditemukan dari zona intertidal yang lebih rendah hingga zona subtidal yang dalam (Hanyuda dkk., 2011).

II.1.1 Kandungan senyawa

Padina australis merupakan salah satu spesies alga coklat yang bernilai ekonomi tinggi karena dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak, pupuk, dan suplemen nutrisi, serta berpotensi untuk dimanfaatkan dalam bidang farmasi (Saloso dkk., 2011). *Padina australis* diketahui memiliki sifat antioksidan, antiinflamasi, antihipertensi, antibakteri, antidiabetes, dan larvasida. Hal ini diyakini karena adanya senyawa *fucoxanthin* dan fucoidan yang paling melimpah pada spesies alga coklat ini (Sadvika dkk., 2022). Ekstrak etanol *Padina australis* mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi dengan nilai IC₅₀ sebesar 92,17 µg/mL (Hidayati dkk., 2022). Beberapa penelitian menyatakan bahwa ekstrak atau bahan aktif yang terdapat pada *Padina australis* mempunyai efek antiinflamasi saraf pada konsentrasi 0,05-0,4 mg/ml (Barbalace., 2019). Selain itu, ekstrak etanol dari alga ini juga

memiliki efek penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* (Salosso dkk., 2020).

II.1.2 Manfaat *Padina australis*

Karotenoid bertindak sebagai pigmen fotoprotektif dengan menangkap spesies oksigen reaktif selama perubahan fotokimia selama fotosintesis. Senyawa ini dianggap sebagai antioksidan yang sangat baik karena adanya gugus fungsi unik seperti ikatan arenat, asetilena, hidroksil, dan keto pada cincin ionon. Pigmen ini telah banyak dikembangkan dan digunakan secara komersial dalam industri makanan, pakan, dan farmasi. β -Karoten, *fucoxanthin*, *astaxanthin*, lutein, dan *zeaxanthin* merupakan contoh karotenoid yang berasal dari alga dan banyak tersedia di pasaran. Dalam alga, karoten melindungi klorofil dari efek paparan cahaya berlebihan dengan menangkap spesies oksigen reaktif seperti molekul oksigen singlet dan radikal bebas. Beta-karoten, bagian dari kelompok karotenoid, berperan dalam melindungi sel dari radikal bebas. Selain itu, alga *fucoxanthin* bertindak sebagai karotenoid penting yang mentransfer energi ke kompleks protein klorofil. Molekul *fucoxanthin* menunjukkan efisiensi transfer energi yang tinggi (sekitar 80%) karena struktur unik karotenoid ini. *Fucoxanthin* juga berperan dalam melindungi dari cahaya dan merupakan antioksidan kuat (Firdaus M., 2019).

Karotenoid pertama kali diisolasi oleh Wackenroder pada tahun 1831. Pigmen-pigmen ini tampak berwarna dengan secara selektif menyerap cahaya di wilayah spektrum ultraviolet dan tampak dan

mentransmisikan atau memantulkan cahaya yang tersisa. Selain berperan dalam fotosintesis, karotenoid juga diketahui memiliki fungsi penting lainnya, seperti melindungi alga dari kerusakan akibat cahaya berlebih di lautan. Karotenoid merupakan pigmen terpenoid dengan rantai poliena C40 linier. Rantai poliena dapat diganti dengan gugus siklik dan karotenoid yang mengandung oksigen yang disebut xantofil. Oleh karena itu, karotenoid dibagi menjadi dua kelompok yaitu karoten dan xantofil. Xantofil diklasifikasikan berdasarkan jenis oksigen yang ada, seperti lutein (oksigen dalam bentuk -OH) dan *astaxanthin* (kombinasi gugus -OH dan oksigen). Karoten larut dalam pelarut non polar, sedangkan xantofil larut dalam pelarut polar (Qin, 2018).

II.2 Senyawa Karotenoid

Spesies ini mengandung beberapa komponen kimia seperti kadar air 87,25%, kadar abu 2,34%, protein 1,05%, lemak 0,58%, karbohidrat 0,58% 8,79 dan vitamin E 162,75 µg/mL. Selain itu juga mengandung metabolit sekunder seperti flavonoid, fenol hidrokuinon, triterpenoid, tanin dan saponin. Selain itu dilaporkan mengandung senyawa karotenoid seperti *fucoxanthin* dan senyawa fenolik sehingga memberikan potensi aktivitas biologis sebagai antibakteri, antikoagulan, sitotoksik, antitumor, kanker, antikanker dan antioksidan (Maharany dkk., 2017; Mawaddah dkk., 2017; Husni dan Budhiyanti, 2021).

II.2.1 Karoten

Karoten adalah hidrokarbon tak jenuh ganda dengan 40 atom karbon dan banyak atom hidrogen per molekul. Beta-karoten larut dalam lemak, menghasilkan pigmen kuning-*orange*, dan berfungsi sebagai prekursor vitamin A. Beta-karoten dan alga karoten merupakan sumber utama vitamin A dan digunakan dalam suplemen makanan karena sifat antioksidannya. Lutein dan *zeaxanthin* melindungi pigmen dari stres oksidatif dan berperan penting dalam mencegah kanker. Lutein merupakan turunan dihidroksi dari α -karoten, sedangkan *zeaxanthin* merupakan turunan dihidroksi dari β -karoten (Rao dan Ravishankar, 2022).

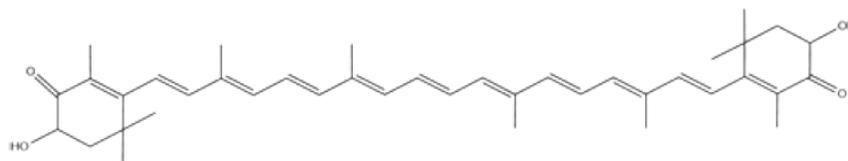
II.2.2 Xanthophyll

Xantofil memiliki struktur cincin di ujung rantai ikatan rangkap yang terkonjugasi dengan gugus fungsi polar seperti gugus hidroksil atau keto. Molekul dalam kelompok ini termasuk lutein, *zeaxanthin*, *capsanthin*, *canthaxanthin*, *β -cryptoxanthin* dan *astaxanthin*. Senyawa ini juga diketahui berperan penting dalam kesehatan manusia (Acton, 2013).

II.2.2.1 Astaxanthin

Astaxanthin adalah pigmen merah yang larut dalam lemak tanpa aktivitas provitamin A pada manusia, meskipun beberapa penelitian melaporkan bahwa *astaxanthin* lebih aktif secara biologis dibandingkan karotenoid lainnya. Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat (USFDA) telah menyetujui penggunaan *astaxanthin* sebagai pewarna makanan pada makanan hewani dan ikan (Pashkow dkk., 2008).

Mengonsumsi *astaxanthin* dapat mencegah atau mengurangi risiko terjadinya berbagai penyakit pada manusia dan hewan (Kidd, P., 2011). Seperti karotenoid lainnya, rantai ikatan rangkap karbon-karbon panjang *astaxanthin* bertanggung jawab atas sifat antioksidannya. Selain gugus alkena, *astaxanthin* juga memiliki gugus okso-ilheksenil. *Astaxanthin* aman dan memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan karotenoid lain dan vitamin E. Berbeda dengan karotenoid lainnya, *astaxanthin* tidak diubah menjadi vitamin A. *Astaxanthin* memiliki aktivitas antioksidan 10 kali lebih banyak dibandingkan karotenoid lainnya (seperti beta-karoten, *canthaxanthin*, dan lutein) dan melindungi terhadap kanker, peradangan dan sinar UV. Sifat menguntungkan dari *astaxanthin* dan kemampuan pewarnaannya yang kuat menjadikannya bahan penting dalam industri nutrisi, kosmetik, makanan dan hewan (Osbourn dan Lanzotti, 2009; Rahman dkk., 2018).

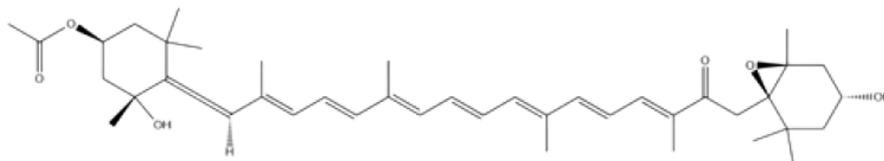


Gambar 2. Struktur *astaxanthin* (BM: 596.9) (Pereira dkk., 2021)

II.2.2.2 *Fucoxanthin*

Fucoxanthin adalah molekul *xanthophyll* yang ditemukan pada alga cokelat dan beberapa jenis mikroalga. Senyawa ini memiliki struktur molekul unik yang ditandai dengan ikatan arena dan gugus karbonil terkonjugasi. Ikatan arena ini terutama terdapat pada karotenoid dan

bertanggung jawab atas kapasitas antioksidannya yang kuat. Karotenoid bifungsional unik ini terutama diketahui terdapat pada alga cokelat seperti *Hijichia fuciforme*, rumput laut, dan wakame (Qin, 2018). Aktivitas biologis dan terapeutik yang terkait dengan karotenoid ini telah dilaporkan mencakup efek antioksidan, antikanker, antihipertensi, antiinflamasi, antidiabetes, antiobesitas, antiangiogenik, dan bahkan efek perlindungan cahaya. Hal ini telah dikonfirmasi berkali-kali dalam literatur ilmiah (Chuyen & Eun, 2017; Komba dkk., 2015). Namun aktivitas biologis yang paling banyak dipelajari hingga saat ini adalah antioksidan, yang dianggap memiliki efek positif bagi kesehatan dan berpotensi memungkinkan penerapan baru di sektor makanan dan industri farmasi (Muradian dkk., 2015). Meskipun penerapan pewarna *fucoxanthin* ini menjanjikan, penerapannya masih terbatas karena komersialisasi *fucoxanthin* hampir tidak ada.



Gambar 3. Struktur *fucoxanthin* (BM: 658.91) (Pereira dkk., 2021)

II.3 Ekstraksi

II.3.1 Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu senyawa dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Pelarut yang digunakan harus mampu mengekstraksi senyawa yang diinginkan tanpa melarutkan senyawa lain yang terdapat pada sampel. Proses ekstraksi

berhenti ketika tercapai keseimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dan konsentrasi dalam sel tumbuhan (Zhang dkk., 2018).

II.3.2 Prinsip ekstraksi

Selama proses ekstraksi, bahan yang akan diekstraksi akan bersentuhan langsung dengan pelarut. Proses ini secara umum dimulai dengan pelarut menembus dinding sel dan jaringan kemudian masuk ke dalam sel, penetrasi filtrat ke dalam sel (osmosis) akan lebih mudah. Cairan filtrat yang masuk akan menyebabkan zat terlarut di dalam sel larut ke dalam pelarut, sehingga terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan zat terlarut di dalam sel dengan cairan filtrat di luar sel, sehingga pada tempat inilah terjadi difusi. Difusi akan berlanjut sampai konsentrasi zat terlarut di luar dan di dalam sel seimbang. Karakteristik pelarut ekstraksi, ukuran partikel bahan baku, rasio pelarut/bahan baku, suhu ekstraksi dan waktu ekstraksi akan mempengaruhi efisiensi ekstraksi (Zhang dkk., 2018).

II.3.3 Metode-metode ekstraksi

Secara umum tergantung pada metode atau proses yang digunakan, ekstraksi dibagi menjadi dua jenis: ekstraksi panas dan ekstraksi dingin. Ekstraksi panas meliputi refluks, perfusi, *ultrasound*, *microwave*, distilasi uap, dan perebusan. Untuk ekstraksi dingin meliputi maserasi, permeasi dan sokletasi.

II.3.3.1 Maserasi

Maserasi berasal dari kata latin "macerace" yang berarti maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana dan paling

banyak digunakan, baik pada skala kecil maupun industri. Maserasi adalah salah satu jenis ekstraksi padat-cair yang dilakukan dengan cara merendam komponen yang akan diekstraksi (sampel) pada suhu kamar selama 3 sampai 5 hari dan diaduk dengan pelarut yang sesuai dengan sampel, yaitu pelarut yang dapat melarutkan zat-zat terlarut (Leba, 2017). Metode ekstraksi maserasi mempunyai keunggulan peralatan yang sederhana, biaya operasional yang relatif rendah, cara penggunaan mudah dan sangat sederhana, serta dapat dilakukan tanpa pemanasan. Metode maserasi juga memiliki beberapa kelemahan seperti jumlah pelarut yang digunakan banyak dan prosesnya yang cukup lama (Nasyanka, 2020).

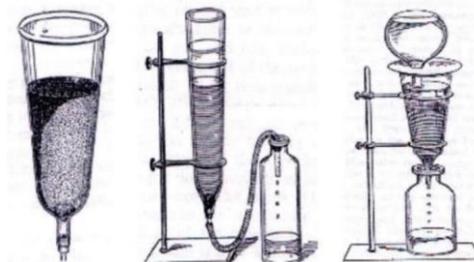


Gambar 4. Proses maserasi (Dokumentasi pribadi)

II.3.3.2 Perkolasi

Perkolasi adalah proses ekstraksi padat-cair yang dilakukan dengan cara meneteskan pelarut secara perlahan ke atas sampel basah (sampel yang telah dibasahi). Pelarut ditambahkan terus menerus sehingga ekstraksi selalu dilakukan dengan pelarut segar. Pola penambahan pelarut yang digunakan melibatkan penggunaan sampel tetes pelarut dari wadah terpisah, disesuaikan dengan jumlah pelarut yang keluar, atau dilakukan

dengan menambahkan pelarut dalam jumlah besar secara berkala. Proses ini berlanjut hingga pelarut tidak berwarna, menandakan tidak ada bahan aktif yang terlarut dalam pelarut. Proses osmosis dilakukan dengan menggunakan alat yang disebut mesin osmosis (Leba, 2017). Ekstraksi secara perkolasi memiliki beberapa keunggulan, seperti tidak diperlukan perlakuan tambahan untuk memisahkan padatan dari ekstrak, sampel selalu diisi dengan pelarut segar, dan tidak memerlukan pemanasan. Selain itu metode perkolasi juga mempunyai kelemahan seperti memerlukan jumlah pelarut yang banyak, kontak antara pelarut dengan sampel tidak seragam dan memerlukan waktu yang lama (Nasyanka, 2020).

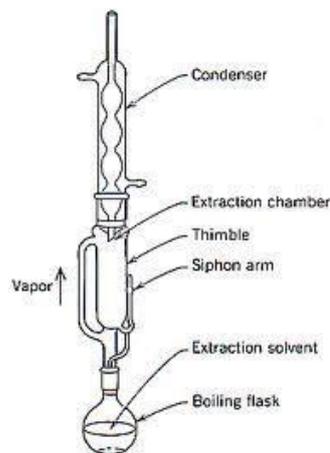


Gambar 5. Perkolator (Saputra, 2020)

II.3.3.3 Sokletasi

Sokletasi adalah salah satu jenis metode ekstraksi dengan menggunakan alat *soxhlet*. Selama ekstraksi ini pelarut dan sampel ditempatkan secara terpisah. Pada prinsipnya proses ekstraksi berlangsung secara berkelanjutan dengan jumlah pelarut yang relatif sedikit. Setelah proses ekstraksi selesai, pelarut dapat diuapkan untuk memperoleh ekstrak. Pelarut yang digunakan pada metode ini merupakan pelarut yang mudah menguap atau memiliki titik didih yang rendah (Leba,

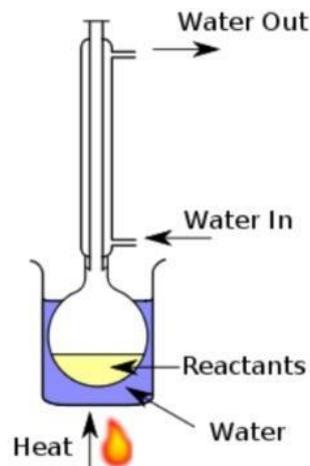
2017). Metode sokletasi mempunyai keunggulan pada proses ekstraksi berkelanjutan dengan sampel yang diekstraksi dengan pelarut murni secara kondensasi, sehingga tidak diperlukan pelarut yang banyak. Kelemahannya adalah jumlah ekstrak yang diperoleh lebih sedikit dibandingkan dengan metode maserasi (Mukhriani, 2014).



Gambar 6. Alat sokletasi (Julianto, 2019)

II.3.3.4 Refluks

Refluks merupakan suatu metode ekstraksi yang dilakukan pada titik didih pelarut dalam waktu tertentu dan dengan jumlah pelarut tertentu yang relatif stabil dan didinginkan secara counter. Umumnya proses ini diulangi sebanyak 3-5 kali pada residu pertama hingga memasuki proses ekstraksi sempurna (Wewekang dan Rotinsulu, 2021). Kelebihan metode refluks adalah memungkinkan ekstraksi sampel yang mempunyai tekstur kasar dan tahan terhadap panas langsung. Kelemahan metode ini adalah tidak dapat digunakan pada sampel yang tidak tahan panas dan membutuhkan banyak pelarut (Saputra, 2020).



Gambar 7. Alat refluks (Saputra, 2020)

II.3.3.5 Infusa

Infusa adalah metode ekstraksi sederhana dengan air sebagai pelarut pada suhu terukur 90°C selama 15 menit. Metode infus memiliki beberapa keunggulan antara lain mudah, murah, mudah diterapkan di masyarakat dan lebih dekat dengan metode produksi obat tradisional yang digunakan masyarakat. Sedangkan kelemahan metode infus adalah perebusan pada suhu tinggi, khususnya di atas 90°C , sehingga merusak senyawa aktif yang terkandung di dalamnya (Wewekang dan Rotinsulu, 2021).

II.3.3.6 Dekokta

Dekokta adalah suatu metode ekstraksi bahan tumbuhan dengan menggunakan pelarut berair (pelarut berair/polar) pada suhu 90°C selama 30 menit, dimulai setelah dasar panci mulai mendidih. Selama perebusan, bagian tumbuhan berupa batang, kulit kayu, cabang, rimpang atau akar direbus dalam air mendidih dalam volume tertentu dan waktu tertentu.

Perbandingan massa bagian tumbuhan dengan volume air biasanya 1:4 atau 1:6 (Endarini, 2016).

II.3.3.7 UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*)

UAE atau sonikasi merupakan metode ekstraksi non-termal yang menggunakan gelombang ultrasonik (frekuensi 20-2000 kHz). Gelombang ultrasonik ini mempunyai kemampuan untuk mempengaruhi permeabilitas dan mengganggu dinding sel, sehingga meningkatkan laju perpindahan massa serta jumlah rongga mikro. Keunggulan metode ekstraksi UAE adalah waktu ekstraksi yang lebih cepat, penggunaan pelarut yang optimal dan mengurangi risiko kerusakan struktural pada senyawa yang akan dianalisis (Endarini, 2016).



Gambar 8. Alat Sonikator (Dokumentasi pribadi)

II.3.3.8 MAE (*Microwave Assisted Extraction*)

Microwave assisted extraction (MAE) merupakan metode ekstraksi unik yang digunakan untuk mengekstrak senyawa bioaktif dari berbagai

tanaman karena memiliki keunggulan seperti kecepatan laju pengeringan lebih tinggi, efisiensi energi lebih tinggi, penggunaan pelarut lebih sedikit dan waktu ekstraksi lebih cepat (Camel, 2000). Interaksi dipolar antara air dan molekul pelarut dalam gelombang mikro meningkatkan suhu dan tekanan pelarut sehingga menyebabkan difusi sampel menuju pelarut dengan laju ekstraksi yang tinggi (Spigno dan De Faveri, 2009). Kondisi ekstraksi bahan alami dapat bervariasi tergantung pada beberapa parameter seperti pelarut yang digunakan, agitasi, waktu ekstraksi, rasio zat terlarut/pelarut dan suhu (Luthria, 2008; Haminiuk dkk., 2012).



Gambar 9. Ekstraksi dengan metode MAE (Dokumentasi pribadi)

II.4 Pemisahan Senyawa dengan Kromatografi

II.4.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metode sederhana untuk memisahkan senyawa berdasarkan partisi dan adsorpsi. Perbedaan migrasi ini disebabkan oleh perbedaan afinitas antara fase diam dan fase gerak. Sifat fisikokimia fase diam, fase gerak dan komponen sampel

merupakan faktor yang menentukan laju migrasi komponen kimia. Retensi dan selektivitas kromatografi juga ditentukan oleh interaksi antara fase diam, fase gerak dan komponen sampel berupa ikatan hidrogen, pasangan donor elektron atau pasangan akseptor elektron (transfer muatan), ikatan ion-ion, ikatan ion-dipol dan ikatan ion-dipol serta obligasi Van der Waals. Senyawa ini kemudian dideteksi secara alami melalui warna yang dihasilkannya atau cara ia bersinar atau menyerap sinar UV. Perlakuan dengan penambahan reagen anti noda dengan penyemprotan atau pencelupan terkadang diperlukan untuk menghasilkan turunan senyawa berwarna atau berpendar. Secara umum senyawa aromatik terkonjugasi dan beberapa senyawa tak jenuh dapat menyerap sinar UV. Senyawa ini dapat dianalisis dengan KLT dengan fase diam yang diresapi dengan indikator fluoresen dan deteksi dapat dilakukan hanya dengan pemeriksaan di bawah sinar UV 254 nm. Penentuan awal pada proses dapat dilakukan dengan memeriksa nilai *Retardation factor* (Rf), kemudian membandingkannya dengan nilai Rf standar (Wulandari, 2011).

II.4.2 KLT-Densitometri (HPTLC)

Kromatografi lapis tipis densitometri atau KLT kinerja tinggi adalah teknik instrumental canggih yang memanfaatkan semua kemampuan kromatografi lapis tipis. Keuntungannya seperti otomatisasi, digitalisasi, optimasi penuh, prinsip deteksi selektif, persiapan sampel minimal, tanda hubung dan masih banyak lagi. Menjadi alat analisis yang ampuh untuk informasi kromatografi campuran kompleks molekul anorganik, organik,

dan biologis. Densitometri KLT mengukur kepadatan optik atau fluoresensi setiap pita di sepanjang kromatogram. Pada *plotter* grafik, kepadatan optik diplot pada sumbu vertikal dengan sumbu horizontal spektrum mewakili jarak dari titik asal. Integrasi puncak kepadatan optik mengungkapkan massa sampel dan memberikan ukuran kuantitatif konsentrasi pewarna dalam strip TLC. Saat ini ada dua jenis densitometer yang umum dikenal: klasik (spektrofotometer) dan video. Densitometer klasik dapat disesuaikan dengan panjang gelombang deteksi dan wilayah emisi cahaya tertentu. Instrumen ini mengukur cahaya yang dipancarkan atau dipantulkan menggunakan detektor fotolistrik. Sebaliknya, densitometer video membuat gambar elektronik pelat dan mengubah intensitas piksel pada gambar menjadi pengukuran kepadatan optik. Densitometer mengukur kepadatan optik pita dibandingkan dengan penyerap kosong pelat KLT. Tergantung pada desain spesifik perangkat, densitometer dapat beroperasi dalam mode transmisi, reflektif atau keduanya secara bersamaan. Dalam transmisi, pengukuran serapan mematuhi hukum *Lambert-Beer* (pengukuran linier).

$$A = \epsilon bC$$

(1)

Keterangan:

A = absorbansi, b = Panjang jalur ϵ = absorptivitas molar dan C = konsentrasi (Brunelle, 2003; Srivastava, 2010).

Mode pemindaian berkas tunggal dan panjang gelombang tunggal yang paling sering digunakan memberikan hasil luar biasa pada area padat dan terpisah dengan baik. Lampu tungsten-halogen digunakan sebagai sumber untuk memindai daerah berwarna dalam kisaran 400-800 nm (penyerapan tampak) dan lampu deuterium kontinu untuk memindai serapan sinar UV di daerah berlapis dengan atau tanpa indikator fluoresensi antara 190 dan 400nm. Monokromator sumber panjang gelombang kontinu ini dapat berupa prisma kuarsa atau lebih sering, kisi. Detektornya adalah fotomultiplier atau fotodiode. Untuk pemindaian fluoresensi, uap merkuri atau lampu xenon intensitas tinggi digunakan sebagai sumber, panjang gelombang eksitasi optimal dipilih oleh monokromator, dan filter *cut-off* ditempatkan antara pelat dan detektor untuk memblokir radiasi UV yang ditransmisikan dan stimulasi emisi yang terlihat (Grinberg dan Rodriguez, 2019).

II.5 Validasi metode analisis

Verifikasi metode analitik adalah tindakan memvalidasi metode tetapi hanya berdasarkan sifat pengujian tertentu. Spesifikasi analitis dapat digunakan sebagai acuan desain proses verifikasi. Desain yang baik menghasilkan informasi yang diperlukan dan meminimalkan energi, waktu dan biaya (Gholib, 2018).

Pilihan parameter validasi atau verifikasi bergantung pada sejumlah faktor seperti penerapan, sampel uji, tujuan metode dan peraturan lokal atau internasional. Verifikasi dilakukan berdasarkan metode standar

sebelum digunakan. Memverifikasi suatu metode berarti menunjukkan bahwa alat yang digunakan dapat menganalisis metode tersebut dengan hasil yang valid (Gholib, 2018).

Dalam verifikasi metode, kinerja yang akan diuji adalah selektivitas, seperti akurasi dan presisi pengujian. Kedua hal ini adalah hal minimum yang perlu dilakukan untuk memverifikasi suatu metode. Metode yang presisi (cermat) belum tentu menjamin bahwa metode yang ditemukan tepat (akurat). Demikian pula metode yang tepat (akurat) belum tentu merupakan metode yang presisi (Gholib, 2018).

II.5.1 Akurasi

Akurasi adalah parameter yang digunakan untuk menunjukkan seberapa dekat hasil analisis dengan kadar analit aktual yang dinyatakan dalam persentase perolehan kembali. Keakuratan metode analisis yang digunakan sangat bergantung pada ketepatan kalibrasi peralatan yang digunakan, kondisi baik pelarut dan reagen yang digunakan, pengendalian suhu dan langkah-langkah penerapan yang cermat.

Menurut Harmita (2004), ada dua cara untuk menentukan keakuratan suatu metode analisis, yaitu:

II.5.1.1 Metode simulasi (Spiked-placebo recovery)

Untuk menentukan keakuratan dengan metode simulasi, beberapa komponen murni (senyawa pembanding) ditambahkan ke dalam bahan pembawa (plasebo), kemudian campuran dianalisis dan hasil yang

diperoleh dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar sebenarnya).

II.5.1.2 Metode penambahan baku (Standard addition method)

Pada metode penambahan standar, sampel dianalisis terlebih dahulu kemudian beberapa senyawa yang akan diuji ditambahkan ke dalam sampel dan dianalisis kembali. Selisih kedua hasil tersebut dibandingkan dengan taraf sebenarnya (*expected result*). Dari kedua metode tersebut, recovery rate dinyatakan dengan perbandingan antara hasil yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Tingkat pemulihan dapat ditentukan dengan mengambil sampel plasebo, kemudian menambahkan analit pada konsentrasi tertentu (biasanya 80-120% dari perkiraan konsentrasi analit), kemudian dianalisis menggunakan metode yang sesuai (Harmita, 2004).

Nilai rentang kesalahan yang diijinkan untuk setiap konsentrasi analit dalam matriks sampel dapat dilihat pada tabel di bawah ini (Harmita, 2004):

Tabel 1. Rentang kesalahan yang diizinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks

Analit pada Matriks Sampel (%)	Rata-rata yang Diperoleh (%)
100	98 – 102
>10	98 – 102
>1	97 – 103
>0,1	95 – 105
0,01	90 – 107
0,001	90 – 107
0,0001 (1 µg/mL)	80 – 110
0,00001 (100 ppb)	80 – 110
0,000001 (10 ppb)	60 – 115
0,0000001 (1 ppb)	40 – 120

Sumber: Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Perhitungannya*

II.5.2 Presisi

Presisi adalah parameter yang menunjukkan hasil seberapa dekat pengukuran pengujian antara satu dengan lainnya. Sampel individu yang

homogen dinyatakan sebagai keterulangan atau reproduktifitas. Presisi dilakukan berkali-kali oleh analis yang sama, dalam kondisi yang sama dan dalam jangka waktu yang singkat (Harmita, 2004). ICH membagi pengujian presisi menjadi tiga, yaitu:

II.5.2.1 Keterulangan (*Repeatability*)

Pengulangan dilakukan minimal 9 kali penentuan konsentrasi dengan 3 kali ulangan pada setiap konsentrasi atau minimal 6 kali penentuan konsentrasi dengan konsentrasi pengujian 100% (ICH, 1994).

II.5.2.2 Presisi antara

Presisi antara ditentukan berdasarkan prosedur penggunaan proses. Analis harus berhati-hati antara beberapa variasi penelitian seperti perbedaan waktu, analis, atau peralatan (ICH, 1994).

II.5.2.3 Ketertiruan (*Reproducibility*)

Ketertiruan dilakukan melalui percobaan antar laboratorium. Biasanya analisis dilakukan di laboratorium yang berbeda dengan menggunakan peralatan, reagen, pelarut dan alat analisa yang berbeda (Harmita, 2004; ICH, 1994).

Dokumentasi presisi harus mencakup: standar deviasi, deviasi standar relatif atau koefisien variasi dan rentang kepercayaan. Presisi dapat dihitung sebagai berikut (Harmita, 2004):

$$RSD < 2(1-0,5 \log c) \quad (2)$$

Keterangan:

c = Konsentrasi analit sebagai fraksi desimal (misalnya untuk larutan konsentrasi 0,1% maka nilai $c = 0,001$)

II.5.3 Linearitas

Linearitas digunakan untuk menunjukkan kemampuan suatu metode analisis dalam memperoleh hasil pengujian yang sesuai berdasarkan konsentrasi analit yang ada dalam sampel dalam rentang konsentrasi tertentu. Rentang linier dapat ditentukan dengan menghasilkan kurva kalibrasi dari beberapa set larutan standar referensi dengan konsentrasi yang diketahui (Ermer dan Miller, 2005).

Pengukuran linearitas dapat dilakukan dengan pengukuran tunggal pada berbagai konsentrasi. Data yang dihasilkan diplot sebagai persamaan garis lurus sehingga dapat diperoleh nilai kemiringan, intersep dan koefisien korelasi (Gholib, 2018).

II.5.4 LOD (*Limit of Detection*) dan LOQ (*Limited of Quantification*)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil suatu senyawa yang ada dalam suatu sampel yang dapat diukur dengan metode analitik yang memberikan respon signifikan dibandingkan dengan sampel kosong. Batas kuantifikasi adalah konsentrasi terkecil suatu senyawa dalam suatu sampel yang dapat diukur secara kuantitatif dalam kondisi ketelitian dan presisi yang sesuai (Harmita, 2004).

Batas deteksi dan batas kuantitas dapat ditentukan melalui regresi linier kurva standar. Nilai terukur akan sama dengan nilai b pada persamaan

linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko akan sama dengan simpangan baku sisa (Sy/x) (Harmita, 2004). Penentuan batas deteksi dan batas kuantitas dapat dengan persamaan dibawah ini:

$$Q = \frac{k \times Sb}{SL} \quad (3)$$

Keterangan:

Q = batas deteksi dan batas kuantitas

k = 3 untuk batas deteksi dan 10 untuk batas kuantitas

Sb = Simpangan baku respon analitik

SL = Arah garis linear dari kurva antara respon terhadap konsentrasi slope (b pada persamaan garis $y=a+bx$)