

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. LANDASAN TEORI

1. *Coenzyme Q₁₀*

a. Definisi *Coenzyme Q₁₀*

Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) mempunyai nama ilmiah: *Ubiquinone*, *Ubidecarenone*, *Mitoquinone* dan mempunyai nama umum: *Co-enzim Q₁₀*, *Coenzyme Q₁₀*, *Co-enzim Q-10*, *Co Enzim Q₁₀*, *coq*, *CoQ₁₀*, *Co Q₁₀*, *Co-Q-10*, *coq-10*, *CO Q₁₀*, *Q₁₀*, Vitamin Q₁₀ (Anonim, 2013)

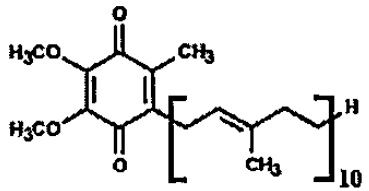
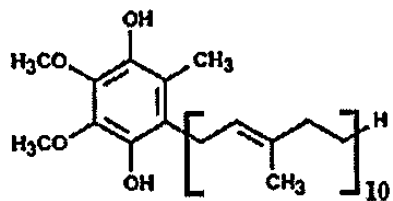
Coenzyme Q (CoQ) atau *ubiquinone*, merupakan salah satu koenzim yang paling esensial bagi tubuh (Crane, 2001). Nama *ubiquinone* berasal dari keberadaannya yang ada di mana-mana di alam (*ubiquitous*). CoQ memiliki seri senyawa homolog yang umumnya mempunyai struktur cincin benzoquinon dan poliisopren. Seri senyawa CoQ hanya berbeda dalam panjang rantai samping isoprenoid (Hemmi, *et al.*, 2006). CoQ pertama kali diisolasi dari hati sapi mitokondria oleh Frederick Derek of Wisconsin, Amerika Serikat, pada tahun 1957 (Edlund, 1988).

CoQ₁₀ dimana Q mengacu pada kelompok kimia kuinon yang mempunyai rantai poliisoprena mengandung unit isoprena 10 (masing-masing 5 karbon) atau total 50 karbon (Lenaz, 1999). Struktur kimia CoQ₁₀, dijelaskan oleh Dr Karl Folkers (1958) adalah

dan mempunyai bentuk tereduksi 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decaprenyl-1,4-benzohydroquinone (*Ubiquinol*) (Folkers *at al.*, 1958).

Karakteristik fisikokimia CoQ₁₀ (*ubiquinone*) dan *ubiquinol* ditunjukkan pada tabel berikut :

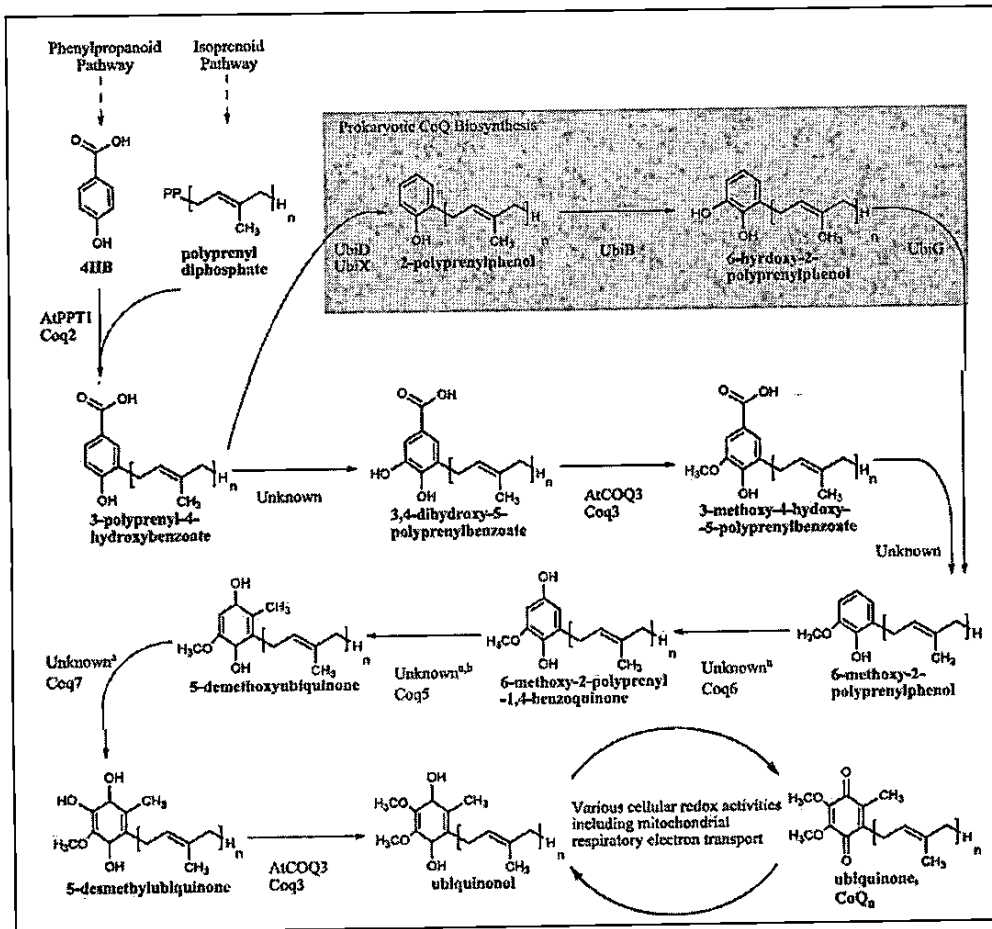
Tabel 2. Karakteristik *Ubiquinone* dan *Ubiquinol*

<i>Ubiquinone</i> (CoQ₁₀)	
Nomor Registrasi CAS: 303-98-0	
Tampilan	Kristal berwarna orange (pada suhu kamar)
Rumus Empiris	C ₅₉ H ₉₀ O ₄
Berat Molekul	863.358
Titik Lebur	49°C
Kelarutan	Tidak larut dalam air Kelarutan terbatas dalam minyak dan lemak Larut dalam pelarut non-polar
Struktur	
<i>Ubiquinol</i>	
Nomor Registrasi CAS: 992-78-9	
Tampilan	Kristal berwarna orange (pada suhu kamar)
Rumus Empiris	C ₅₉ H ₉₂ O ₄
Berat Molekul	865.37
Titik Lebur	49,5°C
Kelarutan	Praktis tidak larut dalam air Kelarutan terbatas dalam minyak dan lemak Larut dalam pelarut non-polar
Struktur	

CoQ₁₀ adalah bubuk kristal yang tidak larut dalam air. CoQ₁₀ adalah zat yang larut dalam lemak. Senyawa ini larut vitamin seperti substansi minyak yang terdapat di beberapa bagian sel eukariotik, terutama di mitokondria. Senyawa ini juga merupakan komponen dari rantai transpor elektron dan berpartisipasi dalam respirasi sel aerobik, menghasilkan energi dimana 95% energi dari tubuh manusia dihasilkan dengan cara ini. Oleh karena itu, organ-organ dengan kebutuhan energi tertinggi seperti hati, jantung dan ginjal memiliki konsentrasi CoQ₁₀ tertinggi (Crane, 2001).

b. Biosintesis *Coenzyme Q₁₀*

Senyawa koenzim (CoQ) hanya disintesis oleh tanaman dan organism oksigenik lain yang dapat berfotosintesis, serta merupakan komponen diet utama pada binatang dan juga manusia. Isolasi CoQ dari tanaman pertama kali dilaporkan oleh Crane dan Lester (1958) terkait bersama dengan molekul plastokuinon. Mekanisme biosintesis CoQ sudah terelucidasi dengan sangat jelas, CoQ produksi dari dua jalur biosintesis yang berbeda, yaitu pembentukan rantai panjang sisi lipofilik dari jalur isoprenoid dan kerangka struktur cincin dari jalur fenilpropanoid kemudian dikonversikan menjadi produk akhir ubiquinone. Sumber bahan pembentukan CoQ pada beberapa tanaman baik prokariotik dan eukariotik terdapat perbedaan pada prekursor awal, kompartemetalisasi dan orde reaksinya (Stiff, 2010).



Gambar 1. Skema biosintesis CoQ atau *Ubiquinone* pada Tanaman (Stiff, 2010)

c. Fungsi *Coenzyme Q₁₀* dalam Tubuh Manusia

CoQ₁₀ merupakan komponen yang terdapat pada membran dalam (*inner membrane*) mitokondria. Sebagai satu-satunya organel yang berperan dalam memproduksi energi berupa adenosin trifosfat (ATP), mitokondria menentukan kelangsungan fungsi setiap sel di dalam tubuh. Di dalam mitokondria, *CoQ₁₀* berperan pada jalur fosforilasi oksidatif, yaitu menerima elektron dari kompleks I dan II yang merupakan aktivitas yang penting pada produksi ATP (Lenaz, 1999).

Selain itu, CoQ₁₀ juga mempunyai aktivitas antioksidan di mitokondria dan membran sel, yang melindungi dari peroksidasi membran lipid. CoQ₁₀ juga menghambat oksidasi LDL-kolesterol, dimana LDL kolesterol adalah faktor yang merupakan pencetus atherosclerosis (Bentinger, 2010). CoQ₁₀ merupakan senyawa lipofilik sehingga penyerapan dalam tubuh mengikuti proses yang sama seperti lipid dalam saluran pencernaan. Mekanisme penyerapan untuk CoQ₁₀ mirip dengan vitamin E, nutrisi lain yang larut dalam lipid. (Miles, *et al.*, 2003). Distribusi CoQ₁₀ dalam berbagai jaringan manusia ditunjukkan pada berikut:

Tabel 3. Distribusi CoQ₁₀ dalam jaringan manusia

Jaringan	CoQ ₁₀ (nmol/g)
Jantung	132.0
Ginjal	77.0
Hati	63.6
Otot	46.0
Otak	15.5
Intestinal	13.3
Paru-paru	9.2

Sumber: Hemmi, *et al.*, 2006

d. Penggunaan *Coenzyme Q₁₀* dalam Klinis

CoQ₁₀ meningkatkan energi, meningkatkan sistem kekebalan tubuh, dan bertindak sebagai antioksidan (Bentinger, 2010). Penelitian klinis menunjukkan bahwa menggunakan suplemen CoQ₁₀ sendiri atau dalam kombinasi dengan terapi obat dan suplemen nutrisi lainnya dapat membantu mencegah atau mengobati beberapa kondisi pada tabel 4.

Tabel 4. Penggunaan *Coenzyme Q₁₀* dalam Klinik.

Indikasi	Efikasi
Gangguan mitokondria, hereditier atau gangguan gangguan yang membatasi produksi energi dalam sel tubuh	Menurut studi klinis, pemberian CoQ ₁₀ selama enam bulan, dapat mengurangi gejala yang berhubungan dengan <i>encephalomyopathies</i> mitokondria. Namun, onset lambat dan membutuhkan waktu enam bulan untuk melihat efek maksimum. FDA (<i>food and drug administration</i>) telah menyetujui UbiQGel (sediaan spesifik CoQ ₁₀) untuk <i>encephalomyo-pathies</i> mitokondria, termasuk Sindrom MELAS (<i>myoclonic epilepsy with lactic acidosis and stroke-like episodes</i>), sindrom <i>Kearns-Sayre</i> , dan MERRF (<i>myoclonus epilepsy with ragged red fibers</i>) (Paulsen, 2003).
<i>Congestive heart failure</i> (CHF), dalam kombinasi dengan obat lain.	Menurut studi klinis (pasien dengan penyakit NYHA class III and IV), ada data yang bertentangan bahwa CoQ ₁₀ efektif pada fraksi ejeksi, toleransi latihan (olahraga), <i>cardiac output</i> , dan volume stroke. Tidak ada bukti bahwa CoQ ₁₀ dapat membantu gagal jantung ketika diberikan dalam sediaan tunggal. Namun, penelitian telah menunjukkan CoQ ₁₀ (dosis 100-200mg/day) memiliki efek menguntungkan ketika diberi dengan obat-obat gagal jantung. (Bruno, 2009)
Nyeri dada (angina)	Dalam review jurnal, pemberian CoQ ₁₀ pada pasien menunjukkan insidensi lebih sedikit yang mengalami angina pektoris dibandingkan dengan plasebo. Semua pasien dalam penelitian ini memiliki riwayat infark miokard positif. Hasil menunjukkan bahwa pemberian CoQ ₁₀ dosis 120 mg/ hari dapat memberikan efek perlindungan yang cepat pada pasien dengan AMI (<i>Angina Miocard Infarc</i>) jika diberikan dalam waktu 3 hari dari timbulnya gejala (Bruno, 2003).
Tekanan darah tinggi (hipertensi)	55% pasien yang mengkonsumsi CoQ ₁₀ (dosis 75-360 mg/ hari) telah terbukti memiliki penurunan 25,9 mmHg tekanan darah sistolik diterapi dalam 12 minggu. Studi juga menunjukkan ketika CoQ ₁₀ ditambahkan ke antihipertensi lain tampaknya memberikan efek sinergis dalam menurunkan tekanan darah dan memungkinkan untuk mengurangi dosis atau penghentian beberapa obat antihipertensi (Paulsen, 2003).

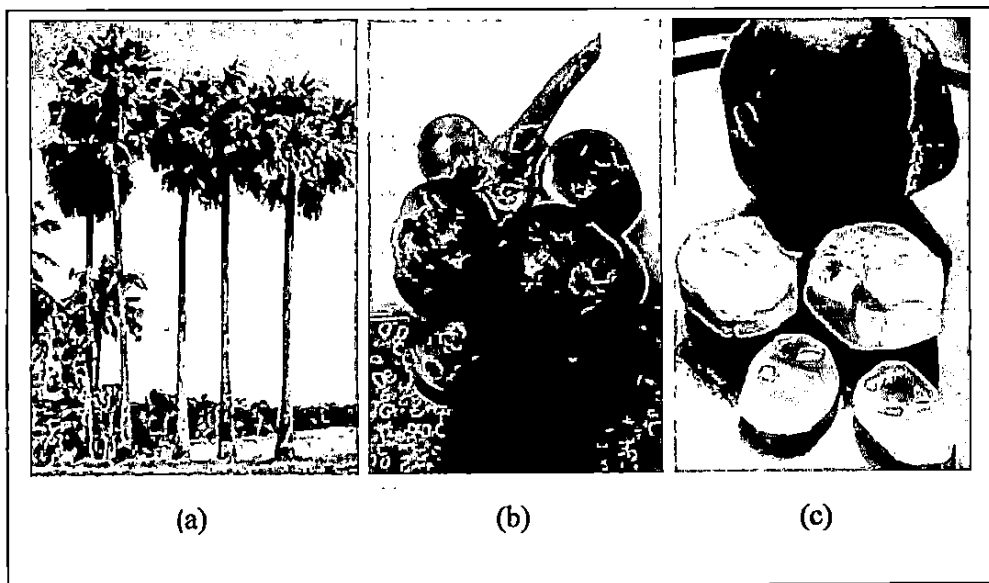
Penyakit Parkinson	CoQ ₁₀ pada dosis tinggi (1200 mg/ hari) dapat memperlambat kerusakan progresif fungsi pada awal penyakit parkinson bila dibandingkan dengan placebo (Anonim, 2002; Shults, <i>et al.</i> , 2002)
Meningkatkan sistem kekebalan tubuh pada Pasien HIV / AIDS	Pasien dengan HIV/AIDS telah terbukti memiliki penurunan CoQ ₁₀ . Penggunaan suplemen CoQ ₁₀ (dosis 200 mg/ hari) telah terbukti dapat meningkatkan kadar CoQ ₁₀ plasma sehingga meningkatkan sistem kekebalan tubuh, CoQ ₁₀ mungkin memiliki aktivitas imunostimulan. (Paulsen, 2003).
Penyakit Huntington's	Penelitian telah menunjukkan CoQ ₁₀ tidak memperlambat perkembangan penyakit Huntington. Beberapa peneliti telah menyarankan mungkin diperlukan dosis yang lebih tinggi untuk menunjukkan efek klinis yang signifikan (Kiebertz, <i>et al.</i> , 2001)
Kanker Payudara	Ada bukti utama bahwa CoQ ₁₀ mungkin bisa membantu dalam kanker payudara bersama dengan operasi dan terapi konvensional lainnya seperti antioksidan dan omega-3 dan omega-6 lemak acids. (Anonim, 2012; Bruno, 2009)
Migrain	Suatu studi menunjukkan CoQ ₁₀ mengurangi jumlah hari mengalami migrain dan mengurangi frekuensi migrain bila dibandingkan dengan <i>baseline</i> (Rozen, <i>et al.</i> , 2002)
Diabetes	Dalam sebuah penelitian terhadap 120 pasien diabetes, 8,3% adalah kekurangan CoQ ₁₀ dibandingkan dengan 1,9% pada kelompok kontrol sehat. Terjadi penurunan 20% pada mereka yang memakai obat hipoglikemik oral. Diketahui obat oral hipoglikemi mengganggu metabolisme CoQ ₁₀ . Ketika diberi 120 mg per hari, badan keton pasien turun setidaknya 30% dari 59% dan kadar gula darah puasa pasien turun 36% (Erdmann, 2010)

2. Siwalan (*Borassus flabellifer* Linn.)

Berdasarkan klasifikasi dan tata nama, pohon lontar termasuk dalam:

Kingdom : *Plantae*
 Divisio : *Magnoliophyta*
 Kelas : *Liliopsida*
 Ordo : *Arecales*
 Famili : *Arecaceae*
 Genus : *Borassus*
 Spesies : *Borassus flabellifer* Linn.

Di Indonesia *Borassus flabellifer* Linn. dikenal dengan nama *Lontar*, *Pohon Siwalan* (Banj.), *P. Tuwak* (Tim.), *Lonta* (Minangkabau.), *Ental*, *Etal*, *Lontar*, *Tal* (Jawa), *Taal* (Madura), *Dun Tal* (Sas.), *Jun Tal* (Sumbawa), *Tala* (Sulsel), *Lontara* (Toraja), *Lontoir* (Ambon), *Manggita*, *Manggitu* (Sumba) (Heyne, 1987). Saat ini menjadi flora identitas Provinsi Sulawesi Selatan.



Gambar 2. (a). Pohon Siwalan, (b) Satu Janjang Buah Siwalan, (c) Daging Buah Siwalan

Pohon lontar terdiri atas 2 macam yaitu lontar jantan dan lontar betina. Nira dapat dihasilkan dari lontar jantan dan lontar betina sedangkan buah lontar hanya dapat dihasilkan lontar betina. Pohon lontar berbunga dan berbuah setelah berumur 12-20 tahun. Pemanenan nira berlangsung pada musim kemarau. Umur pohon lontar mencapai 150 tahun, yang memiliki nilai ekonomi hanya sampai 80 tahun (Nuroniah, 2010).

Pohon siwalan mempunyai banyak manfaat, mulai dari bunga, daun buah dan batangnya dapat dimanfaatkan. Bunga lontar dimanfaatkan dengan diambil niranya, Nira lontar digunakan untuk pembuatan gula lontar, gula lempeng, gula semut, laru, sopi, dan kecap cuka (Amalo, 2008). Menurut Rosdiati Napitupulu dari LIPI, nira lontar masih dapat dikembangkan untuk menghasilkan produk bernilai ekonomi tinggi seperti etanol. Penduduk setempat seperti di Nusa Tenggara Timur (NTT) dan Minahasa mengolah nira menjadi minuman beralkohol. Pengetahuan tradisional tersebut dapat dimanfaatkan sebagai dasar untuk melangkah menuju proses pembuatan bioetanol (Amalo, 2008). Sedangkan daun lontar dapat dianyam untuk menghasilkan berbagai kerajinan tangan berupa nyiru, keranjang, tempat air, tikar, kipas, aneka tas, tenunan untuk pakaian dan topi (*tilangga*). Tanpa penganyaman daun lontar dimanfaatkan untuk membuat alat musik *sasando* (alat musik tradisional di Timor), bahan atap rumah, cetakan untuk gula lontar dan pembungkus rokok (Munawaroh, 1999).

Buah siwalan oleh masyarakat yang dimakan adalah biji buah siwalan

cairan dalam bijinya seperti rasa air kelapa (Nurtama dan Naomi, 1996). Buah siwalan berumur muda lebih banyak digunakan dibandingkan dengan buah berusia muda, antara lain dibuat olahan seperti manisan, buah kaleng, kue dan selai (Amalo, 2008).

3. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu pemisahan kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan ataupun hewan dengan menggunakan penyari tertentu. Berdasarkan fase yang terlibat terdapat dua jenis ekstraksi, yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair. Perpindahan komponen dari padatan ke pelarut pada ekstraksi padat cair melalui tiga tahapan, yaitu: difusi pelarut ke pori-pori padatan atau dinding sel, didalam dinding sel terjadi pelarutan padatan oleh pelarut, dan tahapan terakhir adalah pemindahan larutan dari pori-pori menjadi larutan ekstrak. Ekstraksi padat-cair dipengaruhi oleh waktu ekstraksi, suhu yang digunakan, pengangkutan, pengadukan dan banyaknya pelarut yang digunakan (Harbone, 1987). Tingkat ekstraksi bahan ditentukan oleh ukuran partikel bahan tersebut. Bahan yang diekstrak sebaiknya berukuran seragam untuk mempermudah kontak antara bahan dan pelarut sehingga ekstraksi berlangsung dengan baik (Khopkar, 2008).

Metode ekstraksi dibagi dalam 2 katagori, yaitu ekstraksi cara panas dan ekstraksi cara dingin. Ekstraksi cara panas melibatkan panas untuk mempercepat proses penyarian. Contoh ekstraksi dengan cara dingin seperti: refluks, digesti, infus, dekok, dan sokletasi. Ekstraksi cara dingin tidak ada proses pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung, tujuannya untuk

menghindari rusaknya senyawa yang dimaksud rusak karena pemanasan. Contoh ekstraksi cara dingin seperti: maserasi dan perkolasi (DepKes RI, 2000).

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali penggojokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Untuk mendapatkan hasil ekstrak yang lebih optimal dilakukan remaserasi. *Remaserasi* adalah proses pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya. Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan prinsip kelarutan. Prinsip kelarutan adalah *like dissolve like*, yaitu (1). Pelarut polar akan melarutkan senyawa polar, demikian juga sebaliknya pelarut non-polar akan melarutkan senyawa non-polar, (2) pelarut organik akan melarutkan senyawa organik (Harbone, 1987). Ekstraksi senyawa aktif dari suatu jaringan tanaman dengan berbagai jenis pelarut pada tingkat kepolaran yang berbeda bertujuan untuk memperoleh hasil yang optimum, baik jumlah ekstrak maupun senyawa aktif yang terkandung dalam contoh uji (Khopkar, 2008).

4. Metode Analisis Senyawa CoQ₁₀

a. *Thin Layer Chromatography* (TLC)

Thin Layer Chromatography (TLC) atau Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1983. TLC merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya berupa lapisan yang seragam (*uniform*) pada permukaan

bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik (Gandjar dan Rohman, 2007).

Prinsip kerjanya memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Teknik ini biasanya menggunakan fase diam dan fase geraknya disesuaikan dengan jenis sampel yang ingin dipisahkan. Larutan atau campuran larutan yang digunakan dinamakan eluen (Skoog, 1996). Semakin dekat kepolaran antara sampel dengan eluen maka sampel akan semakin terbawa oleh fase gerak tersebut (Clark, 2007).

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya. Pelarut yang dipilih untuk pengembang disesuaikan dengan sifat kelarutan senyawa yang dianalisis. Sistem yang paling sederhana ialah campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal (Gandjar, 2007).

Data yang diperoleh dari TLC adalah nilai *retardation factor* (R_f atau faktor retardasi) yang berguna untuk identifikasi senyawa. Nilai R_f untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan nilai R_f dari senyawa standar. Nilai R_f dapat didefinisikan sebagai jarak yang

ditempuh oleh pelarut (fase gerak) dari titik asal (Roy, 1991).

Perhitungan nilai R_f didasarkan atas rumus :

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh solut}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Nilai R_f dinyatakan hingga angka 1,0 beberapa pustaka menyatakan nilai R_f yang baik yang menunjukkan pemisahan yang cukup baik adalah berkisar antara 0,2-0,8 (Roy, 1991).

b. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Kromatografi merupakan salah satu metode pemisahan komponen-komponen campuran yang berdasarkan distribusi diferensial dari komponen-komponen sampel diantara dua fase, yaitu fase gerak dan fase diam. Salah satu teknik kromatografi yang dimana fase gerak dan fase diamnya menggunakan zat cair adalah HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) atau sering diterjemahkan menjadi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Sejumlah prosedur analisis HPLC telah dikembangkan untuk aplikasi di bidang farmasi, kimia, pangan, kosmetik dan juga kimia lingkungan. Popularitas analisis HPLC adalah terletak pada kemampuannya dalam memisahkan sekaligus mengkuantifikasi suatu sampel (Skoog, 2004).

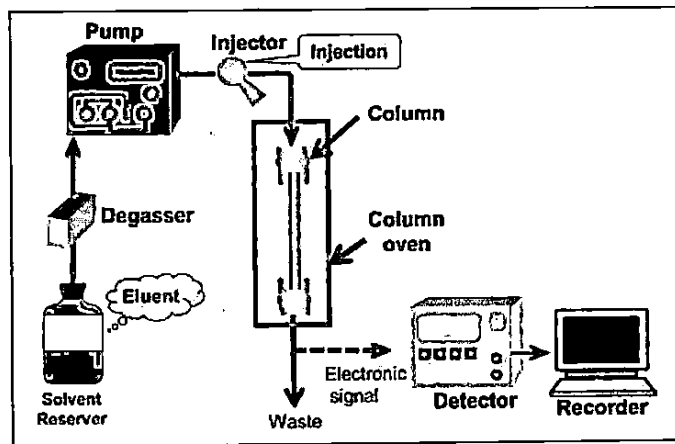
HPLC dapat digunakan untuk: 1) pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis; 2) analisis ketidakmurnian (*impurities*); 3) analisis senyawa-senyawa tidak

menguap (non-volatil); 4) penentuan molekul-molekul netral, ionik, maupun *zwitter ion*; 5) isolasi dan pemurnian senyawa; 6) pemisahan senyawa-senyawa yang strukturnya hampir sama; pemisahan senyawa-senyawa dalam jumlah seklumit (*trace element*), dalam jumlah banyak, dan dalam skala proses industri. HPLC merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif (Gandjar dan Rohman, 2007).

Beberapa tahun terakhir dilaporkan bahwa: analisis CoQ₁₀ dapat dilakukan menggunakan metode antara lain: *UV spectrophotometry*, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR), *Mass Spectrometry* (MS), *Supercritical Fluid Chromatography* (SFC) dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Metode HPLC adalah metode yang banyak digunakan untuk menetapkan CoQ₁₀ dalam sediaan suplemen makanan, maupun nutrisi lainnya. Semua bentuk CoQ₁₀ dapat dipisahkan dan ditetapkan kadarnya dengan metode HPLC baik dengan menggunakan detector UV atau fluoresen (Mosca, *et al.*, 2002; Tang, *et al.*, 2001).

HPLC merupakan pengembangan dari kromatografi cair, dan banyak digunakan untuk teknik pemisahan analitik. Komponen utama dalam HPLC ini adalah sistem pompa, tempat penyuntikan sampel, kolom kromatografi, detektor, penguat sinyal, dan perekam (Gambar 3). Kinerja HPLC membutuhkan instrument dengan karakteristik yang tidak terdapat pada kebanyakan sistem *Liquid Chromatography* (LC).

Aliran pelarut harus stabil dan terkalibrasi secara akurat dengan kecepatan alir pada rentang 1 mL/menit – 100 mL/menit. Bentuk HPLC yang paling banyak digunakan adalah penukar ion, partisi, dan adsorpsi (USP, 2003).



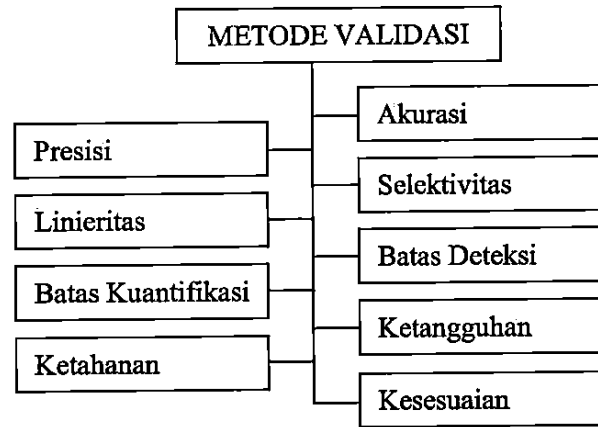
Gambar 3. Skema komponen instrument HPLC

Prinsip pemisahan HPLC yakni, komponen dalam bentuk campuran dipisahkan oleh kolom yang tersusun atas partikel berbasis silica (sebagai fase diam), dengan memompakan solven (sebagai fase gerak) melalui kolom (fase diam). Tergantung pada afinitas spesifik masing-masing komponen (analit) diantara fase gerak dan fase diam, masing-masing komponen analit bergerak melintasi kolom dengan kecepatan yang berbeda-beda serta keluar dari kolom dengan waktu yang berbeda pula (Skoog, 2004). Analit dengan afinitas yang tinggi pada fase gerak akan bergerak lebih cepat melintasi membran, sedangkan yang mempunyai afinitas tinggi pada fase diam akan lebih lambat. Waktu bergerak analit ini yang disebut sebagai *retention time*

(Rt), bersifat spesifik pada masing-masing analit dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis dan kadar komponen analit tersebut (Skoog, 2004).

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk yang membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Validasi dipergunakan untuk metode analisa yang baru dibuat dan dikembangkan. Selain itu, validasi metode dilakukan jika terjadi perubahan kondisi antara kondisi analisis dan kondisi pada saat validasi metode terdahulu, atau terjadi perubahan metode dari metode standar. Beberapa manfaat validasi metode analisis yaitu untuk mengevaluasi kerja suatu metode analisis, menjamin prosedur analisis, menjamin keakuratan, kedapat ulangan hasil prosedur analisis, dan mengurangi resiko penyimpangan yang mungkin timbul (Harmita, 2004).

Parameter untuk validasi metode meliputi: akurasi (*accuracy*), ketelitian (*precision*), selektivitas (*specificity*), linieritas, batas deteksi atau *limit of detection* (LOD), batas kuantifikasi atau *limit of quantitation* (LOQ), ketangguhan (*ruggedness*), uji kekuatan (*robustness*) dan kesesuaian sistem (Gambar 4) (Gandjar dan Rohman, 2007).



Gambar 4. Validasi Metode

Selama program pengembangan obat terus dilakukan, metode bioanalisis pasti mengalami banyak modifikasi. Perubahan dilakukan untuk mendukung studi tertentu dan berbagai tingkat validasi juga dilakukan untuk keabsahan suatu metode. Berbagai jenis dan tingkat validasi didefinisikan sebagai berikut: 1) Validasi penuh penting dilakukan ketika mengembangkan dan menerapkan metode bioanalisis untuk pertama kalinya, juga penting bagi pengujian sediaan obat baru. 2) Validasi sebagian dilakukan ketika melakukan modifikasi bioanalisis yang sudah divalidasi. Validasi sebagian dapat berkisar mulai dari satu akurasi *intra-day* dan penentuan presisi untuk mendekati validasi penuh. 3) Validasi silang adalah perbandingan parameter validasi ketika dua atau lebih metode bioanalisis digunakan untuk data dalam studi yang sama atau studi yang berbeda. Validasi silang akan menjadi situasi dimana metode bioanalisis asli divalidasi dan berfungsi sebagai referensi sedangkan metode bioanalisis yang

mengalami perbaikan dibandingkan dengan metode tersebut (FDA, 2001).

1) Akurasi atau Ketepatan

Akurasi adalah ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan *spiking* pada suatu sampel. Akurasi dapat ditentukan melalui dua cara, yaitu metode penambahan baku (*standard addition method*) atau metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) (Gandjar dan Rohman, 2007).

Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen peroleh kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Metode simulasi dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit bahan murni ke dalam *plasebo* (semua campuran *reagent* yang digunakan minus analit), lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya

yang sebenarnya). Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel *plasebo*, maka dapat dipakai metode adisi. Dalam metode adisi, sampel dianalisis untuk diketahui komposisi awal analitnya, kemudian sampel ditambahkan sejumlah tertentu standar dan dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang ditambahkan) (Harmita, 2004).

Kriteria kecermatan sangat tergantung kepada konsentrasi analit dalam matriks sampel dan pada keseksamaan metode *relative standard deviation* (RSD). Vanderwielen, *et al.*, (2003) menyatakan bahwa selisih kadar pada berbagai penentuan (X_d) harus 5% atau kurang pada setiap konsentrasi analit pada mana prosedur dilakukan. Harga rata-rata selisih secara statistik harus 1,5% atau kurang. Kriteria tersebut dinyatakan secara matematik sebagai berikut:

$$\left\{ \frac{X_d}{X_0} \cdot 100 \right\} < 5\%$$

$$\left\{ \frac{X_d}{X_0} \cdot 100 \right\} - \frac{(S(0,95 \ n - 1))}{n} < 5\%$$

$$X_d = X_i - X_0$$

Keterangan:

X_d = selisih kadar pada berbagai penentuan

X_0 = hasil yang sebenarnya

X_i = hasil analisis

I = nilai t pada tabel *t' student* pada atas 95%

S = simpangan baku relatif dari semua pengujian

Kadar analit dalam metode penambahan baku dapat dihitung sebagai berikut:

$$\frac{C}{C + S} = \frac{R_1}{R_2}$$

$$C = S \left(\frac{R_1}{R_2 - R_1} \right)$$

Keterangan:

- C = kadar analit dalam sampel
- S = kadar analit yang ditambahkan pada sampel
- R₁ = respon yang diberikan sampel
- R₂ = respon yang diberikan campuran sampel dengan tambahan analit

Perhitungan perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{C_F - C_A}{C^*_A} \times 100$$

Keterangan:

- C_F = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran
- C_A = konsentrasi sampel sebenarnya
- C*_A = konsentrasi analit yang ditambahkan

Pada percobaan penetapan kecermatan, sedikitnya lima sampel yang mengandung analit dan plasebo yang harus disiapkan dengan kadar antara 50% sampai 150% dari kandungan yang diharapkan. Persen perolehan kembali seharusnya tidak melebihi nilai presisi RSD (Harmita, 2004). Rentang kesalahan yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 5. Keterimaan Persen *Recovery*.

Analit pada Matrik Sampel (%)	Rata-Rata <i>Recovery</i> (%)
100	98 – 102
> 10	98 – 102
> 1	97 – 103
> 0,1	95 – 105
0,01	90 – 107
0,001	90 – 107
0,000.1 (1 ppm)	80 – 110
0,000.01 (100 ppb)	80 – 110
0,000.001 (10 ppb)	60 – 115
0,000.000.1 (1 ppb)	40 – 120

Sumber: AOAC (1993).

2) Presisi atau Ketelitian

Uji ketelitian (presisi) digunakan untuk mengevaluasi tingkat kedekatan antara hasil tes individu sampel tertentu sehingga diketahui kesalahan acak analisis (Harmita, 2004). Sesuai ICH, presisi harus dilakukan pada 3 tingkatan yang berbeda yaitu: keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*) dan ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orang, peralatan, tempat maupun waktu. Presisi antara yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orang, peralatan, tempat maupun waktu. Ketertiruan merujuk pada hasil-hasil dari laboratorium yang lain. Dokumentasi presisi seharusnya mencakup: simpangan baku, simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV), dan kisaran kepercayaan (Gandjar dan Rohman, 2007).

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Karena metode presisi adalah fungsi penetapan kadar pada rentang yang dapat diterima menurut Debesis *et. al.*, (1982) pada analisa menggunakan metode HPLC akan digunakan ketentuan presisi berikut:

Tabel 6. Rentang Maksimum yang Diperbolehkan (Perhitungan dibuat Berdasarkan atas Kepercayaan 99%)

Rentang yang dapat diterima (% klaim)	Penetapan Tunggal		Penetapan Duplo	
	Metode RSD (%)	Sistem (RSD) (%)	Metode RSD (%)	Sistem (RSD) (%)
98,5 – 101,5	0,58	0,41	0,82	0,58
97 - 103	1,2	0,82	1,6	1,2
95 - 105	1,9	1,4	2,7	1,9
90 – 110	3,9	2,8	5,5	3,9
90 - 115	4,8	3,4	6,9	4,8
90 – 125	6,8	4,8	9,6	6,8
85 – 115	5,8	4,1	8,2	5,8
75 - 125	9,7	6,9		
50 – 150	19,4	13,7		

Sumber: Debesis, *et. al.*, 1982

Presisi dapat dihitung dengan cara sebagai berikut:

Hasil analisis adalah $x_1, x_2, x_3, x_4, \dots, x_n$ maka simpangan bakunya adalah:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Keterangan:

- x = nilai dari masing-masing pengukuran
- \bar{x} = rata-rata (*mean*) dari pengukuran

N = frekuensi penetapan

$N - 1$ = derajat kebebasan

Simpangan baku relatif atau koefisien variasi (Coefficient of Variation=CV) atau *relati* atau RSD adalah:

$$RSD = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen. Sebaiknya keseksamaan ditentukan terhadap sampel sebenarnya yaitu berupa campuran dengan bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) untuk melihat pengaruh matriks pembawa terhadap keseksamaan ini. Demikian juga harus disiapkan sampel untuk menganalisis pengaruh pengotor dan hasil degradasi terhadap keseksamaan ini (Harmita, 2004).

3) Selektivitas

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu secara akurat dan presisi walaupun terdapat komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel (Gandjar dan Rohman, 2007). Selektivitas dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*dree of bias*) metode terhadap sampel yang mengandung cemaran seperti hasil urai atau senyawa sejenis atau senyawa asing lainnya, kemudian dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak

mengandung cemaran. Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya (Harmita, 2004).

Jika cemaran dan hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diperoleh, maka selektivitas dapat ditunjukkan dengan cara menganalisis sampel yang mengandung cemaran atau hasil uji urai dengan metode yang hendak diuji lalu dibandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase, dan *differential scanning calorimetry*. Derajat kesesuaian kedua hasil analisis tersebut merupakan ukuran selektivitas. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s) (Harmita, 2004).

4) Linieritas

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 (Harmita, 2004).

Dalam praktek, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50–150% kadar analit dalam sampel. Di dalam pustaka, sering ditemukan rentang konsentrasi yang

digunakan antara 0–200%. Jumlah sampel yang dianalisis sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko (Harmita, 2004).

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = bx + a$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (Sy). Dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer, semua perhitungan matematik tersebut dapat diukur (Harmita, 2004).

$$Sy = \sqrt{\frac{\sum(y_1 - \hat{y}_1)^2}{N - 2}}$$

Dimana $\hat{y}_1 = a + bx$

$$Sx_0 = \frac{Sy}{b}$$

Sx_0 = standar deviasi dari fungsi:

$$Vx_0 = \frac{Sx_0}{x}$$

Vx_0 = koefisien variasi dari fungsi.

5) Batas Deteksi (*Limit of Detection*, LOD)

Uji *Limit of Detection* (LOD) merupakan konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan

tetapi konsentrasi tersebut belum tentu dimiliki oleh sampel yang diujikan. LOD dapat dihitung berdasarkan pada standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (*slope*, *S*) kurva baku pada level yang mendekati LOD sesuai dengan rumus:

$$LOD = 3,3 \left(\frac{SD}{S} \right)$$

Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan pada standar deviasi blanko, pada standar deviasi residual dari regresi, atau standar deviasi intersep pada garis regresi (Gandjar dan Rohman, 2007).

6) Batas Kuantifikasi (*Limit of Quantification*, LOQ)

Uji *Limit of Quantitation* (LOQ) menurut Harmita (2004) adalah kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria akurat dan presisi. ICH mengenalkan 2 metode pilihan untuk menentukan LOQ yaitu: metode non instrumental visual dan metode perhitungan. Metode perhitungan didasarkan pada standar deviasi respon (SD) dan *slope* (*S*) kurva baku sesuai dengan rumus:

$$LOQ = 10 \left(\frac{SD}{S} \right)$$

Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi blanko pada standar deviasi residual garis regresi linier atau dengan standar deviasi intersep $-y$ pada garis regresi (Gandjar dan Rohman, 2007).

7) Ketangguhan atau Kekasaran (*Ruggedness*)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, dan hari yang berbeda. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara laboratorium dan antar analis (Harmita, 2004; Gandjar dan Rohman, 2007)

8) Ketahanan atau Kekuatan (*Robustness*)

Uji kekuatan dilakukan untuk mengetahui pengaruh dari perubahan metodologi yang kecil yang terjadi terus menerus. Uji kekuatan juga berfungsi untuk mengevaluasi respon analitik dan efek presisi dan akurasi. Identifikasi sekurang-kurangnya 3 faktor analisis yang dapat mempengaruhi hasil bila diganti atau diubah (Harmita, 2004).

9) Kesesuaian Sistem

Kesesuaian sistem dapat didefinisikan sebagai serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Persyaratan-persyaratan kesesuaian sistem biasanya dilakukan setelah dilakukan

America (USP) menentukan parameter-parameter yang dapat digunakan untuk menetapkan kesesuaian sistem sebelum analisis (Gandjar dan Rohman, 2007).

Parameter-parameter yang digunakan meliputi: bilangan lempeng teori (N), faktor *tailing*, kapasitas (k' atau α) dan standar deviasi relatif (RSD) tinggi puncak dan luar puncak dari serangkaian injeksi. Nilai RSD tinggi puncak dan luas puncak dari 5 injeksi larutan baku pada dasarnya dapat diterima sebagai salah satu kriteria baku untuk pengujian komponen yang jumlahnya banyak (komponen mayor) jika $RSD \leq 1\%$ untuk 5 kali injeksi senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit, nilai RSD dapat diterima jika 5-15% (Gandjar dan Rohman, 2007).

B. KERANGKA KONSEP

Coenzyme Q₁₀ merupakan komponen yang terdapat pada membran dalam (*inner membrane*) mitokondria. Sebagai satu-satunya organel yang berperan dalam memproduksi energi berupa adenosin trifosfat (ATP). *CoQ₁₀* mempunyai aktivitas antioksidan di mitokondria dan membran sel, yang melindungi dari peroksidasi membran lipid. Selain itu, *CoQ₁₀* juga menghambat oksidasi LDL-kolesterol, dimana LDL kolesterol adalah faktor yang merupakan pencetus atherosclerosis (Bentinger, 2010). Senyawa *coenzyme Q* (*CoQ*) juga disintesis oleh tanaman dan organisme oksigenik yang dapat melakukan proses fotosintesis (Anonim, 2013).

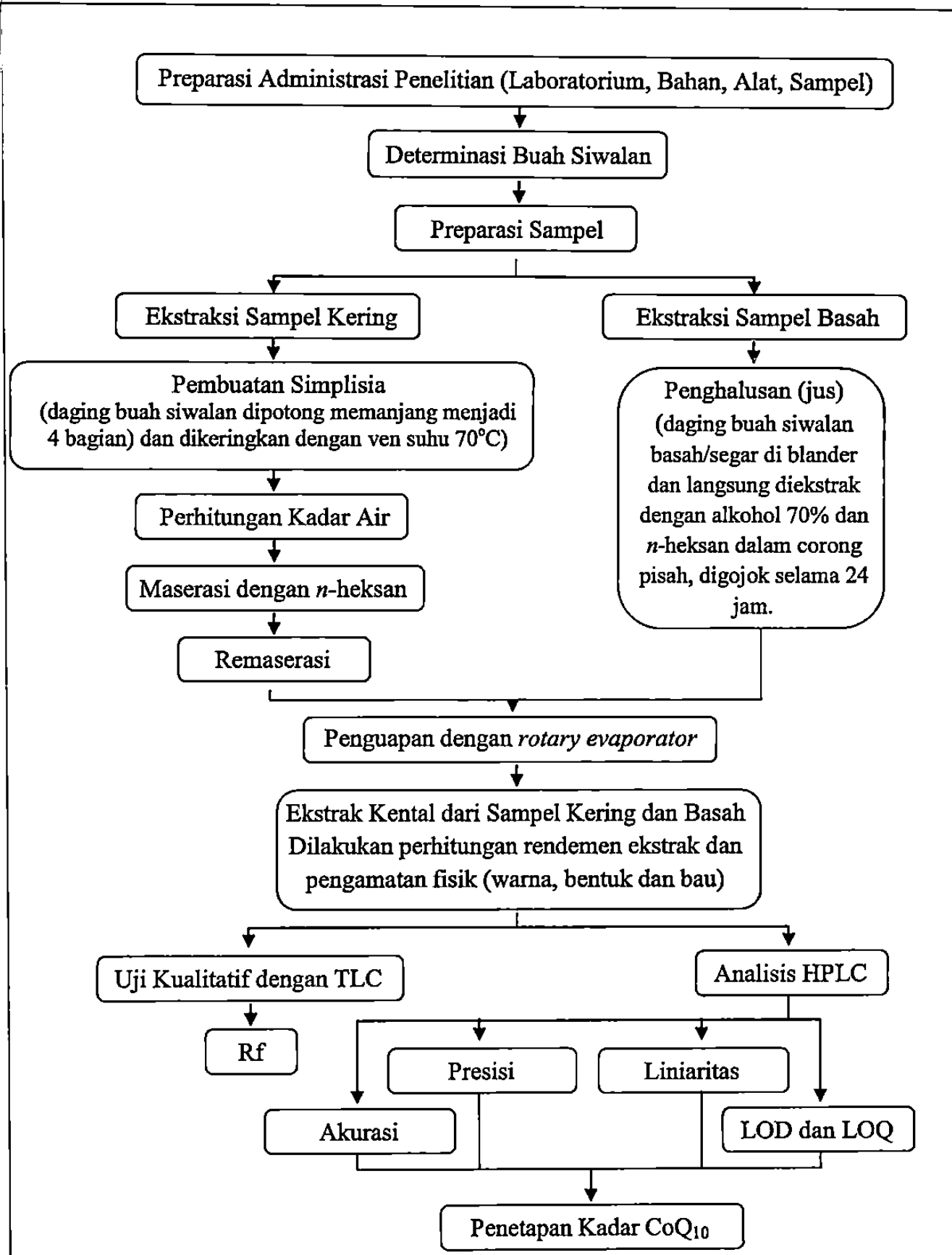
Siwalan atau lontar (*Borassus flabellifer* Linn.) adalah salah satu tanaman jenis palem-paleman yang dapat tumbuh baik di ekosistem pantai. Daging buah siwalan sejauh ini belum banyak digunakan, antara lain sebagai minuman penyegar, manisan, kue, selai dan minuman beralkohol yang dimasyarakat disebut dengan “toak” (Amalo, 2008).

Sebagai tanaman jenis palem-paleman maka buah siwalan (*Borassus flabellifer* Linn.) diduga kaya akan kandungan minyak. CoQ₁₀ merupakan senyawa lipofilik yang mirip dengan vitamin E (Miles, *et al.*, 2003). Salah satu jenis tanaman palem-paleman yang sudah terbukti mengandung CoQ₁₀ adalah kelapa sawit (Han, *et al.*, 2006; May, *et al.*, 2004). Pohon siwalan termasuk dalam keluarga palem-paleman sehingga dimungkinkan pada daging buah siwalan juga mengandung CoQ₁₀, oleh karena itu perlu dilakukan usaha analisis kandungan senyawa larut minyak yang terdapat pada daging buah siwalan.

Beberapa tahun terakhir, analisis pemisahan dan penetapan kadar CoQ₁₀ menggunakan HPLC sudah banyak dilakukan. Sistem HPLC yang sering digunakan dalam analisis CoQ₁₀ antara lain: fase gerak metanol : etanol (35 : 65 v/v), kolom C18 5 μ m, 250 x 4,6 mm, kecepatan alir 1 ml/ menit dengan ilusi fase gerak isokratik (tetap), suhu 70°C dan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 275 nm (Mosca, *et al.*, 2002; Tang, *et al.*, 2001).

Proses preparasi sampel (daging buah siwalan) sebelum dilakukan analisis menggunakan HPLC seminimal mungkin terhindar dari cahaya dan disimpan dalam *refrigerator*. Preparasi sampel terdiri dari dari: 1) Pengambilan sampel daging buah usia muda; 2) Pengeringan sampel (*simplisia*) menggunakan oven

dengan suhu 70°C; 3) Penetapan persen susut pengeringan; 4) Ekstraksi sampel dengan dua cara, yaitu ekstraksi basah (penyarian langsung dari daging buah segar dengan pelarut) dan ekstraksi kering (daging buah dibuat simplisia dan disari dengan pelarut), hasil ekstraksi dihitung persentase rendemen ekstrak; 5) Uji kualitatif menggunakan TLC dengan fase dia silika gel F₂₅₄ dan fase gerak perbandingan *n*-heksan : etil asetat (90 : 10 v/v); 6) Analisis menggunakan HPLC meliputi validasi metode dan penetapan kadar CoQ₁₀. Skema kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada gambar 5.



C. HIPOTESIS

Metode HPLC dengan detektor UV-Vis dapat digunakan dalam menganalisis dan menetapkan kadar kandungan senyawa *coenzyme* Q₁₀ (CoQ₁₀) pada daging buah sylvan (*Dioscorea Delitoides* Linn.)