

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. JENIS DAN DESAIN PENELITIAN**

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental laboratorik. Dalam penelitian ini mempunyai beberapa tahapan yaitu: determinasi sampel, ekstraksi sampel dengan pelarut n-heksan, pemekatan sampel menggunakan *rotary evaporator*, uji kualitatif menggunakan TLC, dan analisis kuantitatif senyawa menggunakan HPLC.

#### **B. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN**

Penelitian dilaksanakan dari bulan Juni sampai Agustus 2013, di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Laboratorium Penelitian Terpadu Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan. Surat izin laboratorium penelitian terdapat pada lampiran 1.

#### **C. VARIABEL PENELITIAN**

1. Variabel bebas : Ekstrak Kering dan Ekstrak Basah daging buah siwalan
2. Variabel tergantung : Kadar Kandungan *Coenzyme Q<sub>10</sub>*
3. Variabel terkontrol : Sistem HPLC

#### D. VARIABEL OPERASIONAL

Variabel operasional yang digunakan untuk analisis penetapan kadar kandungan CoQ<sub>10</sub> pada daging buah siwalan (*Borassus flabellifer* Linn.) dengan metode HPLC adalah:

1. Variabel Bebas adalah ekstrak komponen minyak dari daging buah siwalan yang diekstraksi menggunakan dua cara, yaitu ekstraksi kering dan ekstraksi basah. Ekstraksi kering adalah proses ekstraksi dimana sampel terlebih dahulu dibuat simplisia (pengeringan dengan suhu 70°C) kemudian dimaserasi selama 5 dan remaserasi 2 hari dengan pelarut *n*-heksan sedangkan ekstraksi basah adalah proses ekstraksi dimana sampel segar buah siwalan diblender dengan penambahan etanol 70% dan dilakukan maserasi selama 24 jam dengan *n*-heksan. Buah siwalan yang digunakan diambil dari populasi pohon siwalan di desa Ngepon kecamatan Jatirogo kabupaten Tuban propinsi Jawa Timur. Buah siwalan yang digunakan adalah buah siwalan berumur muda ( $\pm 3$  bulan), yang di ambil secara acak di tiap janjang buah siwalan dari tengkulak (pedagang buah siwalan) dan ukuran buah dalam ukuran rata-rata
2. Variabel Tergantung adalah kadar kandungan CoQ<sub>10</sub> yang didapat dari perbandingan antara luas puncak kromatogram sampel dengan luas puncak kromatogram standar dikalikan dengan konsentrasi standar CoQ<sub>10</sub>
3. Variabel Terkendali adalah sistem HPLC yang dimodifikasi dari sistem HPLC analisis CoQ<sub>10</sub> yang pernah dilakukan oleh Michael Stiff, (2010).

D. Luas dan tahanan pada fase gerak dan konsentrasi elis yang digunakan. Fase

gerak dipilih metanol 100% dan peningkatan kecepatan alir menjadi 2 mL/menit difungsikan untuk meningkatkan efisiensi dan biaya penelitian.

Sistem HPLC yang digunakan adalah sebagai berikut:

**Tabel 7. Sistem HPLC**

Bagian HPLC	Keterangan
Fase Diam (kolom)	Shimadzu <sup>®</sup> Shim-pack VP-ODS 250L x 4,6 $\mu$ m
Fase Gerak	Metanol 100%
Kecepatan Alir	2 ml/menit
Elusi	Isokratik
Detektor	Shimadzu <sup>®</sup> SPD-20A Uv-Vis
Panjang Gelombang	275 nm
Suhu	30°C
Volume Injeksi	20 $\mu$ l

#### E. BAHAN DAN ALAT

Sampel yang digunakan adalah buah siwalan (*Borassus flabellifer* Linn.) yang sudah dideterminasikan di laboratorium Unit II Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada (lampiran 2) yang diambil dari desa Ngepon kecamatan Jatirogo kabupaten Tuban Jawa Timur. Bahan dan alat yang digunakan dalam analisis adalah sebagai berikut:

**Tabel 8. Rincian Penggunaan Bahan dan Alat**

BAHAN		
No	Nama Bahan	Sumber/ Merek dan Tipe
1	Standar CoQ <sub>10</sub>	PT. Konimex, diproduksi oleh <i>Yang Ling Hao Tian Bio-engineering Technology Co., Ltd.</i> (lampiran 4).
2	<i>n</i> -heksan (ekstraksi)	Bratachem <sup>®</sup> / <i>grade</i> teknis
3	<i>n</i> -heksan (TLC)	Merck <sup>®</sup> / <i>grade</i> p.a
4	Etanol 70% (ekstraksi)	Bratachem <sup>®</sup> / <i>grade</i> teknis
5	Etanol (kosolven)	Merck <sup>®</sup> / <i>grade</i> p.a
6	Etil Asetat (TLC)	Merck <sup>®</sup> / <i>grade</i> p.a
7	TLC silica gel GF <sub>254</sub>	Merck <sup>®</sup>
8	Metanol	Merck <sup>®</sup> / <i>grade</i> cairan khusus kromatografi

<b>ALAT</b>		
No	Nama Bahan	Sumber/ Merek dan Tipe
1	Timbangan Analitik	Mettler Toledo <sup>®</sup> AL 204
2	Timbangan Digital	AND <sup>®</sup> EK 2000i
3	Alat-alat gelas lab.	Pyrex <sup>®</sup>
4	Blander	Philips <sup>®</sup> HR2061
5	Oven	Memmert <sup>®</sup>
6	<i>Vacum rotary evaporator</i>	IKA <sup>®</sup> RV10
7	<i>Refrigerator</i>	Samsung <sup>®</sup> ART2ASR <sub>REVVL-1</sub>
8	<i>Freezer</i>	Sanyo <sup>®</sup> freezer HF-S6L
9	<i>Nylon membran filters 0,45 µm</i>	Whatman <sup>®</sup>
10	<i>Membran filters 0,22 µm</i>	Terumo <sup>®</sup>
11	Vortex	Labinco <sup>®</sup> L46
12	Sentrifuge	K-centrifuge <sup>®</sup> plc series PLC-05
13	Sonikator	Elma <sup>®</sup> S 30 H Elmasonic
14	Mikropipet	Acura <sup>®</sup> manual 825
15	Spectrofotometer	Simadzu <sup>®</sup> UV-1800
16	HPLC	Simadzu <sup>®</sup> AD30
17	Detektor Uv-Vis	Simadzu <sup>®</sup> SPD-20A Uv-Vis
18	Kolom (fase diam HPLC)	Simadzu <sup>®</sup> Shim-pack VP-ODS 250L x 4,6 µm

## F. CARA KERJA

### 1. Penentuan Kadar Air (*lost of drying*)

Metode penentuan kadar air mengacu pada metode AOAC (1995). Prinsip analisis kadar air adalah untuk mengetahui kandungan kadar air dalam suatu bahan. Cawan porselin dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit, lalu cawan didinginkan di dalam deksikator selama 30 menit dan ditimbang bobot kosongnya. Daging buah siwalan ditimbang 3 gram dan dimasukkan ke cawan porselen. Sampel beserta cawannya dipanaskan pada suhu 105°C selama beberapa jam, kemudian didinginkan

105°C selama 30 menit dan ditimbang. Pengovenan dilakukan

berulang-ulang sampai diperoleh bobot sampel yang stabil. Penentuan kadar air dilakukan sebanyak 5 kali replikasi.

## 2. Ekstraksi

Dalam penelitian ini digunakan 2 cara ekstraksi, yaitu: ekstraksi kering (simplisia) dan ekstraksi basah (segar). Berikut preparasi pembuatan ekstrak:

### a. Preparasi ekstraksi kering (simplisia)

Buah siwalan dikupas kulit luar dan kulit dalam, kemudian daging buah siwalan (sampel) dicuci dan dipotong tipis  $\pm 0,5$  cm. Sebanyak 750 gram sampel dibedakan menjadi tiga bagian, masing-masing sampel diambil segar sebanyak 250 gram dan dikeringkan menggunakan oven suhu  $70^{\circ}\text{C}$ . Didapat simplisia kering dan dilakukan perhitungan susut pengeringan.

Simplisia kering masing-masing bagian dihaluskan menggunakan blender dan diayak (disaring untuk menyeragamkan partikel simplisia). Masing-masing serbuk simplisia dilarutkan dalam 200 mL *n*-heksan dalam bejana kaca dan diaduk sampai homogen. Proses ini (maserasi) dilakukan selama 5 hari dan digojok setiap pagi, siang dan sore. Hari ke-5, dilakukan penyaringan dan remaserasi dengan menambahkan masing-masing 150 mL *n*-heksan selama 2 hari dengan perlakuan sama. Hari ke-2 remaserasi dilakukan penyaringan. Hasil penyaringan (filtrat) maserasi dan remaserasi dicampur dan diuapkan menggunakan *vacum rotary evaporator* dengan suhu  $40^{\circ}\text{C}$ .

Larutan pekat yang didapat diuapkan kembali menggunakan cawan porselen dengan kipas angin sampai tidak tercium bau pelarut. Didapat ekstrak siwalan dan dihitung rendemen ekstrak masing-masing bagian. Hasil ekstrak disimpan dalam *refrigerator* dan terhindar dari cahaya.

b. Preparasi ekstraksi basah

Daging buah siwalan segar (sampel) sebanyak 750 gram dibagi menjadi tiga bagian, masing-masing 250 gram. Masing-masing sampel dihaluskan menggunakan blender dengan penambahan etanol 70% sebanyak 150 mL. Masing-masing sampel yang sudah halus dimasukkan ke dalam bejana dan ditambahkan pelarut *n*-heksan sebanyak 350 mL, dimaserasi selama 24 jam dan sesering mungkin digojok. Dipisahkan larutan (filtrat) dengan ampas daging buah siwalan menggunakan penyaring. Filtrat yang didapat dari masing-masing bagian digojok kembali kemudian dipisahkan dalam corong pisah. Diambil bagian fase minyak dan diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 40°C. Larutan pekat yang didapat diuapkan kembali menggunakan cawan petri dengan kipas angin sampai tidak tercium bau pelarut. Didapat ekstrak siwalan dan dihitung rendemen ekstrak masing-masing bagian. Hasil ekstrak disimpan dalam *refrigerator* dan terhindar dari cahaya.

Ekstrak basah dan ekstrak kering yang didapat dihitung perolehan

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot akhir sampel (ekstrak)}}{\text{bobot sampel (simplisia)}} \times 100\%$$

### 3. Uji Kualitatif dengan TLC

Plat TLC dipanaskan dalam oven 70°C selama 1 jam. Ekstrak kering, ekstrak basah dan standar CoQ<sub>10</sub> ditotolkan pada lempeng silika gel GF<sub>254</sub> (merck®) sebagai fase diam. Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksan : etil asetat (90 : 10) v/v. Disiapkan lempeng silika gel F<sub>254</sub> dengan ukuran 12 cm x 4 cm kemudian dimasukkan ke dalam bejana pengembang yang berisi fase gerak yang telah dijenuhkan. Setelah selesai, lempeng tersebut dikering udarakan dan dilakukan pengamatan bercak dengan menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Dibandingkan *retardation factor* (R<sub>f</sub>) ekstrak kering dan ekstrak basah dengan standar CoQ<sub>10</sub>.

### 4. Analisis Kandungan CoQ<sub>10</sub> menggunakan HPLC

Metode kualitatif untuk menganalisis senyawa CoQ<sub>10</sub> pada daging buah siwalan (*Borassus flabellifer* Linn.) menggunakan perbandingan antara waktu retensi (*time retention, TR*) antara standar CoQ<sub>10</sub> dengan sampel. Metode kuantifikasi untuk analisis kuantitatif dalam penelitian ini menggunakan metode baku eksternal.

#### a. Pembuatan Fase Gerak

Fase gerak dipilih yang sesuai dengan kelarutan setiap bahan aktif yang akan digunakan pada campuran. Dalam hal ini fase gerak

kemudian disaring dengan saringan *nylon membrane filter* (Whatman®) porositas 0,45  $\mu\text{m}$  dan disonikasi selama 15 menit.

b. Pembuatan Larutan Induk Standar CoQ<sub>10</sub>

Standar CoQ<sub>10</sub> ditimbang seksama 10,0 mg, dimasukkan dalam labu takar 10 mL dan dilarutkan dalam etanol 4 tetes untuk membantu melarutkan, kemudian diencerkan secara kuantitatif dengan metanol sampai tanda tera. Larutan tersebut disonikasi selama 15 menit dan disaring dengan *membrane filter* 0,22  $\mu\text{m}$ . Diperoleh konsentrasi larutan baku standar CoQ<sub>10</sub> 1 mg/mL.

c. Pembuatan Larutan Kurva Baku Standar CoQ<sub>10</sub>

Konsentrasi larutan kurva baku standar CoQ<sub>10</sub> diambil dari konsentrasi 400, 500, 600, 700, 800, dan 900 ng/mL yang dikutip dari analisis jurnal terdahulu (Michael, 2010), dimana konsentrasi tersebut memberikan hasil analisis yang baik. Larutan induk standar CoQ<sub>10</sub> (1 mg/mL) diambil masing-masing sebanyak 20, 25, 30, 35, 40 dan 45  $\mu\text{L}$  menggunakan *micropipette* dimasukkan dalam labu takar 5 mL, kemudian diencerkan secara kuantitatif dengan fase gerak metanol sampai tanda tera, sehingga diperoleh konsentrasi 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, dan 9000 ng/mL. Masing-masing larutan disimpan dalam vial 10 mL yang telah tertutup rapat dengan alumunium foil dengan identitas yang telah ditempelkan sebelumnya. Vial disimpan dalam



d. Pembuatan Larutan Validasi Metode CoQ<sub>10</sub>

Konsentrasi larutan validasi diambil dari batas bawah, tengah dan tinggi larutan kurva baku mengacu pada ICH (2005) dengan tujuan untuk melihat kecenderungan adanya kesalahan sistemik dilevel rendah, tengah dan atas, yaitu pada konsentrasi 450, 650 dan 850 ng/ mL. Larutan induk standar CoQ<sub>10</sub> (1 mg/mL) diambil masing-masing sebanyak 22,5 µL, 32,5 µL, dan 42,5 µL menggunakan *micropipette* dimasukkan dalam labu takar 5 mL, kemudian diencerkan secara kuantitatif dengan fase gerak metanol sampai tanda tera, sehingga diperoleh konsentrasi 4500, 6500, dan 8500 ng/mL. Masing-masing larutan disimpan dalam vial 10 mL yang telah tertutup rapat dengan aluminium foil dengan identitas yang telah ditempelkan sebelumnya. Vial disimpan dalam *freezer* suhu 0°C agar tidak terjadi kerusakan zat aktif dari CoQ<sub>10</sub>.

e. Penentuan Panjang Gelombang Larutan Induk Standar CoQ<sub>10</sub>

Diambil 1 ml larutan Induk standar CoQ<sub>10</sub> dimasukkan kedalam kuvet dan dilakukan *scanning* dengan spektrofotometer ultraviolet (Simadzu® UV-1800) pada panjang gelombang 200-400 nm, sehingga diperoleh spektrum serapan dan panjang gelombang maksimum CoQ<sub>10</sub>.

f. Optimasi Sistem HPLC

Diatur sistem HPLC sesuai dengan sistem HPLC pada tabel 7. Dilakukan pembilasan sistem dengan fase gerak selama 10 menit

dengan kecepatan alir 2,5 mL/menit, kemudian dihubungkan kolom dengan detektor. Setelah kolom dan detektor terhubung, dilakukan penyetimbangan kolom dengan fase gerak pada kecepatan alir 2 mL/menit sampai diperoleh *baseline* yang stabil (garis kromatogram stabil). Dinjeksikan sampel (20  $\mu$ L) dan dilihat kromatogram hasil elusi dan waktu retensi yang diperoleh.

g. Validasi Metode Analisis

Validasi metode pada penelitian ini menggunakan validasi sebagian dan mengacu pada ICH (2005). Validasi metode meliputi parameter: 1) Uji Kesesuaian Sistem, 2) Linieritas, 3) Batas Kuantifikasi (LOQ), 4) Akurasi (ketepatan), 5) *Recovery* (perolehan kembali), dan 6) Presisi (ketelitian).

1) Uji Kesesuaian Sistem

Larutan kurva baku 6000 ng/mL dikeluarkan dari *freezer* hingga suhu kamar. Dipipet 900  $\mu$ L fase gerak kedalam *microtube* dengan menggunakan *micropipette*. Dipipet 100  $\mu$ L larutan kurva baku tersebut dan *spike* ke dalam *microtube* yang sudah berisi 900  $\mu$ L fase gerak sehingga diperoleh konsentrasi 600 ng/mL. Homogenisasi larutan tersebut menggunakan *vortex* selama 20 detik dengan kecepatan 40 rpm dan *sentrifuge microtube* dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan partikel asing yang tersuspensi dalam larutan.

HPLC terpilih dan direplikasi sebanyak 5 kali. Untuk uji komponen utama kriteria standar yang diperlukan menurut Farmakope Indonesia edisi empat (1995) adalah %CV dari luas area harus < 2% untuk lima kali penginjeksian.

## 2) Linieritas dan Kurva Kalibrasi

Larutan kurva baku dikeluarkan dari *freezer* hingga suhu kamar. Dipipet 900  $\mu\text{L}$  fase gerak kedalam *microtube* dengan menggunakan *micropipette* sesuai dengan jumlah titik kurva baku yang akan dibuat. Dipipet 100  $\mu\text{L}$  masing-masing larutan kurva baku dan *spike* ke dalam *microtube* yang sudah berisi 900  $\mu\text{L}$  fase gerak sehingga diperoleh konsentrasi 400, 500, 600, 700, 800, dan 900 ng/mL. Homogenisasi larutan tersebut menggunakan *vortex* selama 20 detik dengan kecepatan 40 rpm dan *sentrifuge microtube* dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan partikel asing yang tersuspensi dalam larutan. Sejumlah 20  $\mu\text{L}$  larutan tersebut disuntikkan ke dalam sistem HPLC terpilih dan direplikasi sebanyak 6 kali. *Area under curve* (AUC) yang diperoleh dibuat kurva hubungan antara konsentrasi CoQ<sub>10</sub> dengan AUC sehingga diperoleh persamaan regresi linier ( $y = bx + a$ ) dan nilai koefisien korelasi ( $r$ ). Nilai  $r$  menurut FDA (2001) disyaratkan  $\geq 0.990$  dan % error untuk nilai LOQ < 20% dan titik yang lain < 15%.

Persamaan yang diperoleh merupakan kurva kalibrasi yang dapat digunakan untuk perhitungan penetapan kadar.

### 3) Batas Kuantifikasi (LOQ)

Larutan LOQ (larutan titik pertama dari kurva baku) 4000 ng/mL dikeluarkan dari *freezer* hingga suhu kamar. Dipipet 900  $\mu$ L fase gerak kedalam *microtube* dengan menggunakan *micropipette*. Dipipet 100  $\mu$ L larutan kurva baku tersebut dan *spike* ke dalam *microtube* yang sudah berisi 900  $\mu$ L fase gerak sehingga diperoleh konsentrasi 400 ng/mL. Homogenisasi larutan tersebut menggunakan *vortex* selama 20 detik dengan kecepatan 40 rpm dan *sentrifuge microtube* dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan partikel asing yang tersuspensi dalam larutan. Sejumlah 20  $\mu$ L larutan tersebut disuntikkan ke dalam sistem HPLC terpilih dan direplikasi sebanyak 6 kali. *Area under curve* (AUC) yang diperoleh diolah dengan persamaan regresi linier untuk mendapatkan kadar sebenarnya (*concentration calculate*). Nilai akurasi dan presisi sebenarnya dibagi kadar teoritik dan dikali 100%, dimana akurasi yang memenuhi persyaratan yaitu rata-rata  $\%diff < 20\%$  serta nilai presisi dapat dilihat dari  $\%CV$  dari masing-masing replikasi. Metode dikatakan presisi jika memenuhi persyaratan  $\%CV < 20\%$  (FDA, 2001).

#### 4) Akurasi

Larutan validasi CoQ<sub>10</sub> konsentrasi 4500, 6500, dan 8500 ng/mL dikeluarkan dari *freezer* hingga suhu kamar. Dipipet 900  $\mu$ L fase gerak ke dalam *microtube* dengan menggunakan *micropipette* sesuai dengan jumlah titik larutan validasi CoQ<sub>10</sub> yang akan dibuat. Dipipet 100  $\mu$ L masing-masing larutan validasi CoQ<sub>10</sub> dan *spike* ke dalam *microtube* yang sudah berisi 900  $\mu$ L fase gerak sehingga diperoleh konsentrasi 450, 650, dan 850 ng/mL. Homogenisasi larutan tersebut menggunakan *vortex* selama 20 detik dengan kecepatan 40 rpm dan *sentrifuge microtube* dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan partikel asing yang tersuspensi dalam larutan. Sejumlah 20  $\mu$ L larutan tersebut disuntikkan ke dalam sistem HPLC terpilih dan direplikasi sebanyak 6 kali. *Area under curve* (AUC) yang diperoleh diolah dengan persamaan regresi linier untuk mendapatkan kadar sebenarnya (*concentration calculate*). Nilai akurasi dapat dilihat dari rata-rata *%diff* atau selisih kadar teoritik dengan kadar sebenarnya dibagi kadar teoritik dan dikali 100%. Akurasi yang memenuhi persyaratan yaitu rata-rata *%diff* < 15% (FDA, 2001).

#### 5) Recovery

Larutan validasi CoQ<sub>10</sub> konsentrasi 4500, 6500, dan 8500 ng/mL dikeluarkan dari *freezer* hingga suhu kamar. Dipipet 900

$\mu\text{L}$  fase gerak kedalam *microtube* dengan menggunakan *micropipette* sesuai dengan jumlah titik larutan validasi  $\text{CoQ}_{10}$  yang akan dibuat. Dipipet  $100 \mu\text{L}$  masing-masing larutan validasi  $\text{CoQ}_{10}$  dan *spike* ke dalam *microtube* yang sudah berisi  $900 \mu\text{L}$  fase gerak sehingga diperoleh konsentrasi  $450, 650,$  dan  $850 \text{ ng/mL}$ . Homogenisasi larutan tersebut menggunakan *vortex* selama  $20$  detik dengan kecepatan  $40 \text{ rpm}$  dan *sentrifuge microtube* dengan kecepatan  $13000 \text{ rpm}$  selama  $10$  menit untuk mengendapkan partikel asing yang tersuspensi dalam larutan. Sejumlah  $20 \mu\text{L}$  larutan tersebut disuntikkan ke dalam sistem HPLC terpilih dan direplikasi sebanyak  $6$  kali. *Area under curve* (AUC) yang diperoleh diolah dengan persamaan regresi linier untuk mendapatkan kadar sebenarnya (*concentration calculate*). Nilai *recovery* dapat dilihat dari rata-rata *%recovery* atau kadar sebenarnya dibagi kadar teoritik dan dikalikan  $100\%$ . *Recovery* yang memenuhi persyaratan yaitu rata-rata *%recovery*  $80-120\%$  (FDA, 2001).

#### 6) Presisi

Larutan validasi  $\text{CoQ}_{10}$  konsentrasi  $4500, 6500,$  dan  $8500 \text{ ng/mL}$  dikeluarkan dari *freezer* hingga suhu kamar. Dipipet  $900 \mu\text{L}$  fase gerak ke dalam *microtube* dengan menggunakan *micropipette* sesuai dengan jumlah titik larutan validasi  $\text{CoQ}_{10}$  yang akan dibuat. Dipipet  $100 \mu\text{L}$  masing-masing larutan

validasi CoQ<sub>10</sub> dan *spike* ke dalam *microtube* yang sudah berisi 900 µL fase gerak sehingga diperoleh konsentrasi 450, 650, dan 850 ng/mL. Homogenisasi larutan tersebut menggunakan *vortex* selama 20 detik dengan kecepatan 40 rpm dan *sentrifuge microtube* dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan partikel asing yang tersuspensi dalam larutan. Sejumlah 20 µl masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke sistem HPLC dan direplikasi sebanyak 6 kali. Dilakukan pengukuran *intra-day* sebagai uji keterulangan (*repeatability*) dan *inter-day* sebagai uji presisi antara (*intermediate precision*) pada selang waktu satu hari kemudian. *Area under curve* (AUC) yang diperoleh diolah dengan persamaan regresi linier untuk mendapatkan kadar sebenarnya (*concentration calculate*). Presisi diukur sebagai %CV dari masing-masing konsentrasi. Presisi untuk kualitatif dikatakan baik jika %CV ≤ 15 % (FDA, 2001).

#### **5. Penetapan Kadar CoQ<sub>10</sub> pada Ekstrak Kering dan Ekstrak Basah**

Sampel ekstrak ekstraksi kering dan ekstraksi basah dikeluarkan dari *freezer* hingga suhu kamar. Ditimbang seksama masing-masing 100,0 mg, dimasukkan dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan etanol 4 tetes, kemudian diencerkan secara kuantitatif dengan metanol sampai tanda tera. Larutan tersebut disonikasi selama 15 menit dan disaring dengan *membrane filter* 0,22 µm. Diperoleh konsentrasi masing-masing ekstrak sebesar

10 mg/mL. Dipipet 900  $\mu$ L fase gerak kedalam *microtube* dengan menggunakan *micropipette* sesuai dengan jumlah replikasi yang akan dibuat. Dipipet 100  $\mu$ L masing-masing larutan ekstrak dan *spike* ke dalam *microtube* yang sudah berisi 900  $\mu$ L fase. Homogenisasi larutan tersebut menggunakan *vortex* selama 20 detik dengan kecepatan 40 rpm dan *sentrifuge microtube* dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan partikel asing yang tersuspensi dalam larutan. Sejumlah 20  $\mu$ l masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke sistem HPLC dan direplikasi sebanyak 3 kali. *Area under curve* (AUC) yang diperoleh diolah dengan persamaan regresi linier untuk mendapatkan kadar sebenarnya (*concentration calculate*). Nilai presisi dari kadar sampel dapat dilihat dari %CV dari masing-masing replikasi ekstrak. Metode penetapan kadar dikatakan presisi jika memenuhi persyaratan yaitu %CV < 15%. Larutan

halv ini disimpan dalam refrigerator dan terhindar dari cahaya