

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. HASIL PENELITIAN

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

Penentuan kadar air mengacu pada metode AOAC (1995), diperoleh 5 data dari hasil pengukuran selama 3 hari untuk mendapatkan berat bobot sampel yang stabil. Hasil penetapan kadar air dapat dilihat pada tabel 9 dan cara perhitungan lampiran 6.

**Tabel 9.** Hasil Persentase Kadar Air

Replikasi	Bobot Sampel Pengeringan Suhu 105°C		Persentase Kadar Air (%)
	Sebelum dikeringkan	Sesudah dikeringkan	
1	3,0043 gram	0,2182 gram	92,74
2	3,0087 gram	0,2326 gram	92,27
3	3,0079 gram	0,2073 gram	93,11
4	3,0077 gram	0,2209 gram	92,66
5	3,0063 gram	0,2375 gram	92,10
	Rata-rata	0,2233 gram	92,57

##### 2. Ekstraksi

Pengambilan bahan aktif, khususnya CoQ<sub>10</sub> dari daging buah siwalan (*Borassus flabellife* Linn.) dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi dan diikuti remaserasi. Dalam penelitian ini digunakan dua cara maserasi yaitu, maserasi kering (Ekstraksi Kering) dan maserasi basah (Ekstraksi Basah). Ekstraksi kering dilakukan dengan cara sampel dikeringkan dan diserbuk kemudian dilarutkan dalam *n*-heksan. Dari beberapa sampel hasil pengeringan menggunakan oven suhu 70°C selama 24 jam diperoleh hasil

pada tabel 10, sedangkan ekstraksi basah sebelum dilakukan penyarian fase minyak menggunakan *n*-heksan ditambahkan pelarut etanol 70%.

**Tabel 10. Hasil Berat Simplisia Pengeringan 70°C selama 24 jam**

Replikasi	Bobot Sampel	
	Sebelum dikeringkan	Sesudah dikeringkan
1	250 gram	22,86 gram
2	250 gram	21,97 gram
3	250 gram	22,34 gram
	Rata-rata	22,39 gram

Ekstraksi dilakukan dengan membuat 3 data dari masing-masing proses ekstraksi kering dan ekstraksi basah. Ekstrak yang diperoleh dalam penelitian ini berbentuk ekstrak kental dengan nilai hasil rendemen dapat dilihat pada tabel 11 dan cara perhitungan pada lampiran 6.

**Tabel 11. Hasil Rendemen Ekstrak**

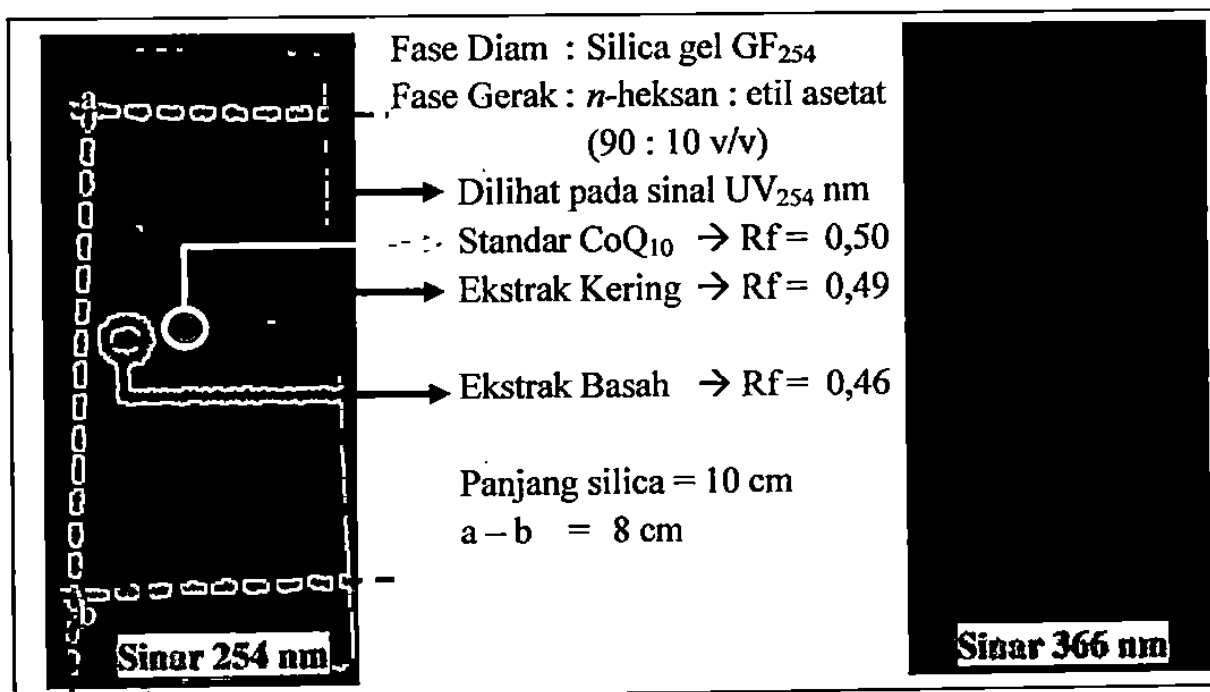
Replikasi	Rendemen Ekstrak (%)	
	Ekstrak Kering	Ekstrak Basah
1	0,363	0,113
2	0,567	0,158
3	0,355	0,185
	Rata-rata	0,428

### 3. Uji Kualitatif TLC

Analisis kualitatif kandungan CoQ<sub>10</sub> dalam ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode TLC. Eluen pengembang yang digunakan adalah *n*-heksan : etil asetat dengan perbandingan 90 : 10 v/v) dan lempeng TLC yang digunakan adalah silika gel GF<sub>254</sub>. Hasil uji TLC dapat dilihat pada tabel 12 dan gambar 6.

Tabel 12. Hasil Analisis dengan TLC

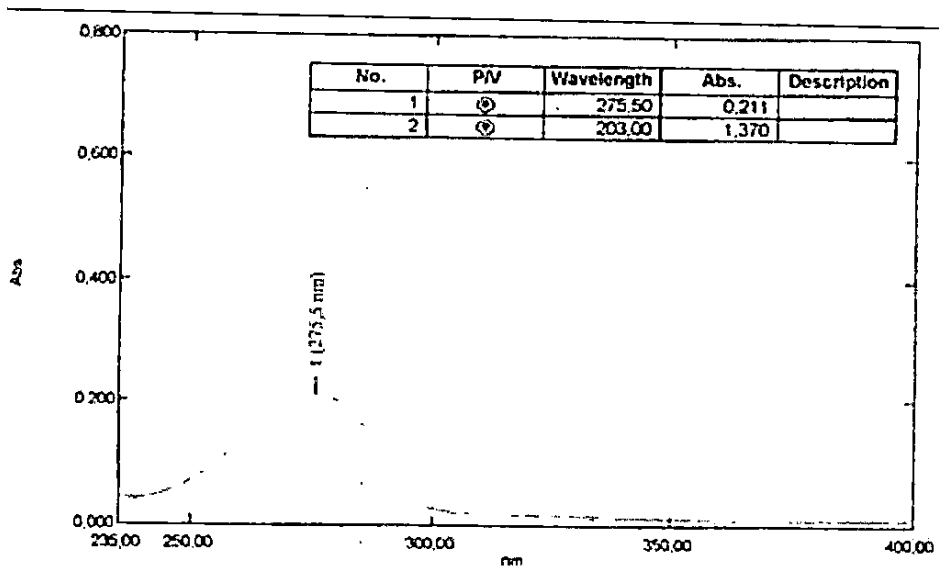
Sampel	Bercak	Jarak Tempuh	Rf	Warna Bercak
Ekstrak Kering	enam	3,9 cm	0,49	Gelap
Standar CoQ <sub>10</sub>	tunggal	4,0 cm	0,50	Gelap
Ekstrak Basah	enam	3,7 cm	0,46	Gelap

Gambar 6. Hasil Uji Kualitatif Senyawa *Coenzyme Q<sub>10</sub>* menggunakan TLC

#### 4. Analisis Kandungan *Coenzyme Q<sub>10</sub>* menggunakan HPLC

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

Penetapan panjang gelombang larutan induk standar CoQ<sub>10</sub> menggunakan spektrofotometer pada rentang 200-400 nm. Serapan maksimum diperoleh pada panjang gelombang 275,5 nm. Hasil panjang gelombang ini ditetapkan sebagai panjang gelombang yang digunakan pada pendeteksian hasil analisis dengan HPLC. Hasil



**Gambar 7.** Spektra Standar CoQ<sub>10</sub> (*Scanning*  $\lambda$  maksimum menggunakan Shimadzu UV-1800)

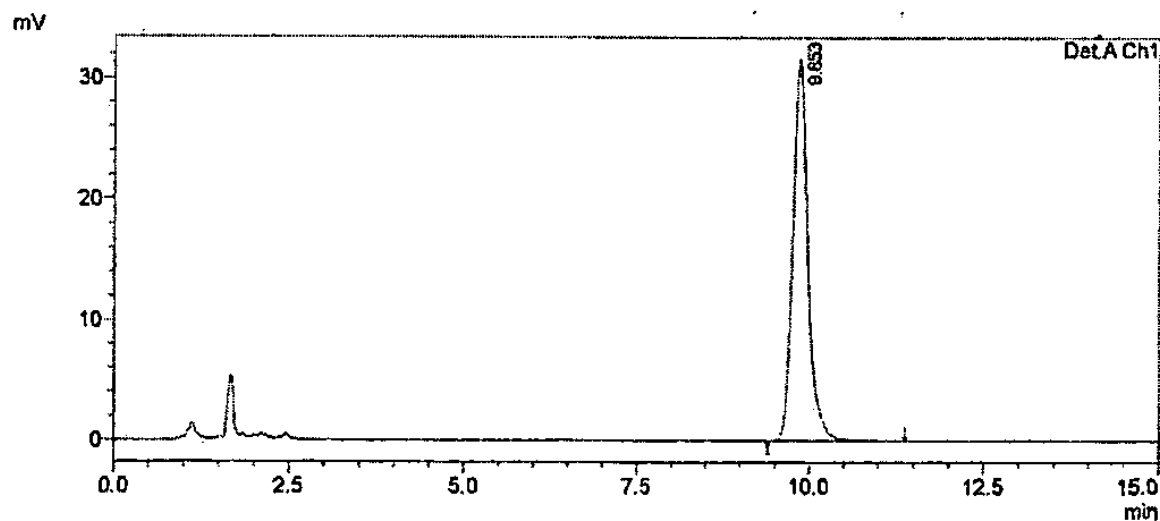
Pembuatan larutan induk standar CoQ<sub>10</sub> dalam metanol dibuat dengan menambahkan beberapa tetes etanol p.a dan disonikator selama 15 menit dalam keadaan vakum, kemudian disaring dengan *membrane filter* 0,22  $\mu$ m. Hasil pembuatan larutan induk standar CoQ<sub>10</sub> mendapatkan hasil yang larut dan siap digunakan untuk analisis dengan HPLC.

#### c. Optimasi Sistem HPLC

Sistem HPLC yang akan digunakan untuk analisis kandungan CoQ<sub>10</sub> adalah sebagai berikut:

- Fase diam : ODS (*octadecyl silane*) C<sub>18</sub>, panjang 250 mm, dan ukuran partikel 4,6  $\mu$ m
- Fase gerak : Metanol 100%
- Elusi : Isokratik
- Kecepatan alir : 2 mL/menit
- Suhu : 30°C
- Standar Eksternal : *Coenzyme Q<sub>10</sub>*

Hasil dari optimasi sistem untuk menganalisis senyawa CoQ<sub>10</sub> diperoleh *time retention* 9,853 menit dengan data kromatogram dapat dilihat pada gambar 8.



**Gambar 8.** Trial Peak Kromatogram HPLC Kromatogram standar CoQ<sub>10</sub> konsentrasi 1 mg/mL, *time retention* 9,853 menit; Fase gerak: metanol 100%; (merck®); Fase diam: Shimadzu® Shim-pack VP-ODS 250L x 4,6; Elusi isokratik, Detektor Shimadzu® SPD-20A Uv-Vis  $\lambda$  275 nm; volume injeksi 20  $\mu$ L; laju alir 2 mL/menit.

#### d. Validasi Metode Analisis

##### 1) Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan 6 kali replikasi pada kondisi yang telah ditentukan, sampai diperoleh nilai dengan persyaratan tertentu pada parameter masing-masing.

Hasil validasi metode uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada

**Tabel 13.** Hasil Uji Kesesuaian Sistem dari HPLC konsentrasi  
600 ng/mL.

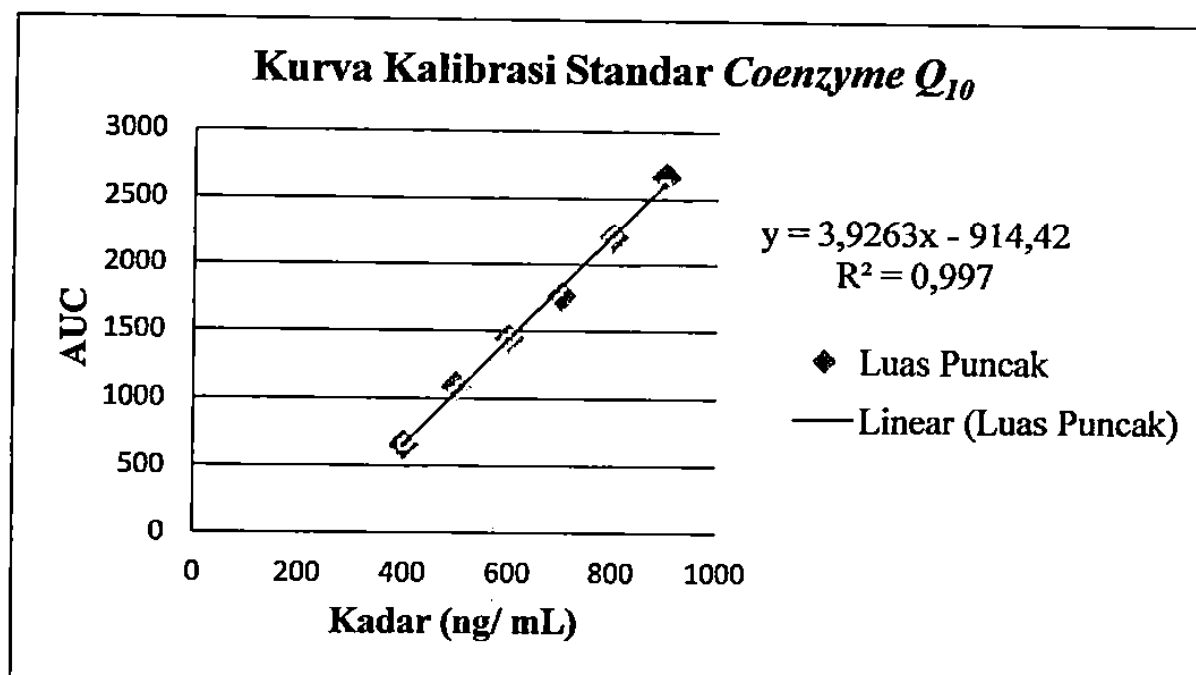
No. Injeksi	<i>Time Retention</i>	Luas Puncak
1	10,238	1434
2	10,166	1439
3	10,199	1429
4	9,909	1441
5	9,852	1433
Rata-rata	10,07	1435,20
SD	0,18	4,82
% CV	1,77%	0,34%

## 2) Linieritas dan Kurva Kalibrasi

Uji linearitas dilakukan pada seri larutan kurva baku standar CoQ<sub>10</sub> dengan konsentrasi CoQ<sub>10</sub> 400, 500, 600, 700, 800, 900 ng/mL. Hasil uji diperoleh persamaan garis  $y = 3,9263x - 914,42$  dan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,997. Tabel linieritas dan kurva kalibrasi standar CoQ<sub>10</sub> dapat dilihat pada tabel 14 dan gambar 9.

**Tabel 14.** Tabel Linieritas

Kadar (ng/mL)	Luas Area
400	653
500	1088
600	1444
700	1767
800	2211
900	2663
Slope (b)	3,9263
Aksis Intercept (a)	-914,42
Koefisien Korelasi (r)	0.997



**Gambar 9.** Kurva Kalibrasi Standar *Coenzyme Q<sub>10</sub>* (x= kadar CoQ<sub>10</sub>, y= area)

### 3) Batas Kuantifikasi (LOQ)

Batas kuantifikasi dilakukan untuk mengetahui konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat menghasilkan data dengan akurasi dan presisi yang baik. Hasil nilai % *diff* dan % CV berdasarkan hasil uji adalah rata-rata % *diff* 1,88% dan % CV 1,52%, dan batas kuantifikasi diperoleh sebesar 15 21 ng/ mL. Tabel uji batas kuantifikasi dapat dilihat

**Tabel 15.** Tabel Perhitungan Batas Kuantifikasi *Coenzyme Q<sub>10</sub>*  
Kosentrasi 400 ng/mL.

No. Injeksi	Luas Area	<i>Concentration Calculate</i>	% diff
1	616	389,788	2,55%
2	600	385,713	3,57%
3	646	397,429	0,64%
4	656	399,976	0,01%
5	638	395,391	1,15%
6	603	386,477	3,38%
Rata-rata		392,46	1,88%
SD		5,97	
% CV		1,52%	
Slope		3,9263	
Intercept		-914,42	
LOQ		15,21 ng/ mL	

#### 4) Akurasi

Uji akurasi dilakukan pada 3 konsentrasi, yaitu rendah 450 ng/mL, sedang 650 ng/mL, dan tinggi 850 ng/mL dilakukan sebanyak 6 kali pada masing-masing konsentrasi. Hasil tersebut dapat dilihat pada tabel 16.

**Tabel 16.** Hasil Uji Akurasi

Konsentrasi (ng/mL)	Rata-rata <i>Concentration Calculate</i>	SD	% CV	% diff
450	500,07	6,34	1,27%	11,13%
650	648,73	11,25	1,73%	1,50%
850	769,71	9,64	1,25%	9,45%
		Rata-rata	1,42%	7,36 %

#### 5) *Recovery*

*Recovery* atau perolehan kembali dilakukan pada 3 konsentrasi, yaitu konsentrasi rendah 450 ng/mL, sedang 650



ng/mL, dan tinggi 850 ng/mL, kemudian direplikasi sebanyak 6 kali pada masing-masing konsentrasi. Hasil tersebut dapat dilihat pada tabel 17 dan data hasil analisis akurasi selengkapnya tercantum dalam lampiran 16 dan 19.

**Tabel 17. Hasil Uji % Recovery**

Konsentrasi (ng/mL)	Rata-rata <i>Concentration Calculate</i>	SD	% CV (%)	<i>Recovery</i> (%)
450	495,87	5,33	1,07	110,19
650	680,35	13,85	2,04	104,67
850	774,08	8,51	1,10	91,07
Rata-rata				101,98

#### 6) Presisi

Presisi dilakukan pengukuran *intra-day* dan *inter-day* pada konsentrasi rendah (450 ng/mL), sedang (650 ng/mL), dan tinggi (850 ng/mL) yang dilakukan selama 2 hari berturut-turut. Hasil tersebut dapat dilihat pada tabel 18 dan data hasil analisis akurasi selengkapnya tercantum dalam lampiran 17,18, dan 19.

**Tabel 18. Hasil Rata-rata Uji Presisi *Intra-day* dan *Inter-day***

Konsentrasi (ng/mL)	<i>Intra-day</i>			<i>Inter-day</i>		
	C. Cal	SD	% CV	C. Cal	SD	% CV
450	14,20	1,30	9,17	14,27	1,11	7,77
650	36,26	1,20	3,32	35,25	0,36	1,03
850	58,70	0,41	0,69	56,46	1,61	2,86
			1,42			
Rata-rata total % CV = 1,41%						

\* C. Cal = *Concentration Calculate*

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

Hasil penetapan kadar daging buah siwalan menggunakan sistem HPLC dari hasil validasi dibuat tiga kali ulangan dan diihitung persamaan

regresi linier yang diperoleh dari kurva kalibrasi. Kadar CoQ<sub>10</sub> yang didapat dari masing-masing ekstrak kering dapat dilihat pada tabel 19 dan 20 dan untuk cara perhitungan pada lampiran 20 dan 22.

**Tabel 19.** Hasil Penetapan Kadar *Coenzyme Q<sub>10</sub>* Ekstrak Daging Buah Siwalan (*Borassus flabellifer* Linn.)

Sampel	Bobot (mg)	C. Cal	Kadar (% b/ b)
Ekstrak Kering	100	2175,99	21,76
	100	2167,71	21,68
	100	2158,80	21,59
Rata-rata			21,67
SD			0,09
% CV			0,40
Ekstrak Basah	100	699,750	7,00
	100	720,890	7,21
	100	720,380	7,20
Rata-rata			7,14
SD			0,12
% CV			1,69

\*FP = Faktor Pengenceran; C. Cal = *Concentration Calculate*.

**Tabel 20.** Hasil Konversi kandungan CoQ<sub>10</sub> dalam daging buah segar siwalan

Jenis Ekstraksi	Buah Segar	Ekstrak <i>n</i> -heksan	<i>Coenzyme Q<sub>10</sub></i>	CoQ <sub>10</sub> / daging buah (gram/kg)
Kering	250 gram	1070 mg	231,87 mg	0,93 g/ kg
Basah	250 gram	380 mg	15,732 mg	0,063 g/ kg

## B. PEMBAHASAN

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

Penentuan kadar air dilakukan sebelum proses ekstraksi. Kadar air yang didapat digunakan untuk memperkirakan jumlah sampel yang dibutuhkan saat ekstraksi sehingga didapat nilai koreksi rendemen dari ekstrak tersebut (Harjadi 1993). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar air daging buah siwalan adalah 92,57%, sehingga sampel daging buah siwalan yang tertimbang menjadi sedikit (lampiran 6). Hasil tersebut menunjukkan bahwa dalam 3 gram sampel daging buah siwalan terkandung rata-rata 2,78 gram air (massa yang menguap) yang terikat secara fisik dan dapat hilang oleh pemanasan. Besarnya kadar air yang terdapat pada sampel akan mempengaruhi proses penapisan senyawa aktif.

### 2. Ekstraksi

Pengambilan bahan aktif dari suatu tumbuhan, dapat dilakukan dengan metode ekstraksi. Proses ekstraksi didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen yang lain dalam campuran. Kelarutan suatu komponen tergantung pada derajat kepolarannya. Hukum "*like dissolved like*" menyatakan bahwa senyawa yang bersifat polar hanya dapat larut dalam pelarut polar dan semipolar, dan sebaliknya. Senyawa yang bersifat nonpolar hanya dapat larut dalam pelarut nonpolar dan semipolar. Pelarut yang digunakan adalah *n*-heksan yang memiliki kecenderungan bersifat nonpolar dengan tetapan dielektrikum 1,89. Penggunaan pelarut *n*-heksan

di gunakan untuk mengekstrak senyawa  $C_{60}$  yang bersifat nonpolar

dalam sampel. Pemilihan *n*-heksan sebagai pelarut juga didasarkan pada tingkat keamanan dan kemudahan penguapan (Khopkar, 2008).

Sampel daging buah siwalan diekstraksi menggunakan metode maserasi dan diikuti remaserasi. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut dengan beberapa kali penggojokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Perendaman sampel simplisia akan menyebabkan terjadinya pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel, sehingga senyawa yang ada dalam dalam sel akan terlarut dalam pelarut (Harbone, 1987).

Ekstraksi kering dilakukan dengan cara sampel dikeringkan dan diserbuk kemudian dilarutkan dalam *n*-heksan. Pengeringan sampel dilakukan dengan menggunakan pemanasan suhu 70°C. Pemilihan suhu pembuatan simplisia lebih tinggi dari standar Farmakope Herbal Indonesia, yaitu kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan tidak lebih dari 60°C (DepKes, 2009), dikarenakan sampel daging buah siwalan mempunyai kadar air yang sangat tinggi dan untuk mengetahui pengaruh pemanasan terhadap senyawa CoQ<sub>10</sub> yang diperoleh.

Dari beberapa pengeringan sampel (simplisia) menggunakan oven suhu 70°C selama 24 jam didapat berat rata-rata simplisia kering 22,39 gram. Simplisia yang diperoleh dilakukan penyerbukan untuk meningkatkan luas permukaan sampel sehingga daerah kontak sampel dengan pelarut ekstraksi lebih besar dan proses ekstraksi berlangsung lebih optimal (Harbone, 1987).

Ekstraksi basah sebelum dilakukan penyarian fase minyak menggunakan *n*-heksan ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan etanol 70% dengan *n*-heksan 3 : 7 v/v. Hal ini bertujuan untuk mempermudah pelarutan dalam penyarian fase minyak. Pelarut etanol bersifat semipolar sehingga akan melarutkan senyawa larut air dan senyawa larut minyak dalam sampel (Khopkar, 2008). Jika diekstraksi langsung menggunakan pelarut *n*-heksan akan terbentuk gumpalan-gumpalan dari jus daging buah siwalan (sampel) karena kadar air dari sampel sangat tinggi, hal ini akan mempengaruhi rendemen ekstrak yang diperoleh.

Ekstrak yang didapat dalam penelitian ini berbentuk ekstrak kental dengan nilai rata-rata rendemen dari ekstraksi kering sebesar 0,428% sedangkan ekstraksi basah memiliki rendemen rata-rata sebesar 0,152% (lampiran 6). Hasil rendemen ini menunjukkan bahwa kadar rendemen ekstraksi kering lebih tinggi daripada ekstraksi basah. Hal ini disebabkan perpindahan massa komponen minyak sampel ke dalam pelarut *n*-heksan terhalang dengan adanya air dan lama ekstraksi yang berbeda (Khopkar, 2008). Penambahan etanol 70% kurang mengoptimalkan proses difusi pelarut *n*-heksan ke pori-pori padatan sampel.

Rendemen ekstrak yang diperoleh dilakukan analisis statistik untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rendemen ekstrak dari ekstraksi kering dan ekstraksi basah. Analisis statistik menggunakan SPSS 15 dengan uji *independent sample t test* (lampiran 7). Hasil menunjukkan bahwa pada uji *levene's test* nilai *F* hitung adalah 7,010 dengan probabilitas 0,057 ( $n >$

0,05), maka kedua rendemen ekstrak memiliki variansi yang sama (homogen). Setelah mengetahui variansi data rendemen ekstrak homogen, ditentukan nilai  $t$  hitung menggunakan *equal variances assumed*. Hasil uji nilai  $t$  hitung rendemen ekstrak adalah 3,843 dengan probabilitas 0,018 ( $< 0,05$ ), maka ada perbedaan rata-rata perolehan rendemen ekstrak antara ekstraksi kering dan ekstraksi basah (tabel 21), sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstraksi kering memiliki rendemen ekstrak lebih banyak dari pada ekstraksi basah.

**Tabel 21.** Hasil analisis statistik rendemen ekstrak menggunakan *independent sample t test* SPSS 15

		Independent Samples Test								
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper	
Rendemen Ekstrak (%)	Equal variances assumed	7,010	,057	3,843	4	,018	,27833	,07243	,07724	,47942
	Equal variances not assumed			3,843	2,357	,047	,27833	,07243	,00786	,54880

Hasil uji diatas menunjukkan bahwa cara ekstraksi berpengaruh terhadap hasil rendemen ekstrak. Cara ekstraksi daging buah siwalan dapat menentukan banyaknya rendemen ekstrak didapat, tetapi tidak dapat menjamin stabilitas senyawa yang akan diteliti, khususnya CoQ<sub>10</sub> (Khopkar, 2008). Penentuan rendemen ekstrak bertujuan mengetahui senyawa larut minyak yang terbawa oleh pelarut tersebut, namun tidak dapat menentukan jenis senyawa yang terbawa. Untuk mengetahui apakah ada pengaruh proses ekstraksi terhadap stabilitas dan konsentrasi senyawa CoQ<sub>10</sub> dalam ekstrak daging buah siwalan dilakukan analisis

### 3. Uji Kualitatif TLC

Uji keberadaan senyawa *coenzyme Q<sub>10</sub>* secara kualitatif dilakukan menggunakan TLC dengan membandingkan nilai *retardation factor* ( $R_f$ ) sampel dengan standar. Nilai  $R_f$  baik atau dapat diterima jika menunjukkan pemisahan yang cukup baik adalah berkisar antara 0,2-0,8 (Roy, 1991).

Pemisahan senyawa pada ekstrak *n*-heksan daging buah siwala (*Borassus flabellifer* Linn.) dengan TLC menggunakan fase normal, dimana fase diam *silika gel F<sub>254</sub>* mempunyai sifat lebih polar dibandingkan dengan fase gerak perbandingan antara *n*-heksan : etil asetat (90 : 10 v/v). Pemilihan sistem ini didasarkan pada sifat solut (*CoQ<sub>10</sub>*) yang bersifat larut minyak/ non-polar, sehingga solut akan mudah terbawa oleh fase gerak dan terabsorpsi pada *silika gel*, kemudian akan terjadi pemisahan solut berdasarkan tingkat kelarutannya (Gandjar dan Rohman, 2007). Dari sistem tersebut, menunjukkan hasil pemisahan yang baik (tidak berekor) dan jumlah noda yang cukup banyak, yaitu 6 noda. Noda-noda ini terpisah berdasarkan kepolarannya. Noda yang mempunyai harga  $R_f$  lebih rendah cenderung memiliki kepolaran yang lebih tinggi karena lebih terdistribusi ke fase diam (*silika gel*) yang bersifat polar, dibandingkan noda yang mempunyai harga  $R_f$  lebih besar karena lebih terdistribusi ke dalam fase gerak.

Hasil menunjukkan bahwa sampel ekstrak kering dan basah terdapat senyawa *CoQ<sub>10</sub>*, hal ini terbukti pada sinar UV<sub>254</sub> dapat dilihat jarak migrasi ekstrak sejajar dengan standar *CoQ<sub>10</sub>* dapat dilihat pada Tabel 12 dan

gambar 6 (lampiran 8). Standar CoQ<sub>10</sub> muncul dengan bercak tunggal berwarna gelap dan tidak berekor. Hal ini menunjukkan bahwa standar yang digunakan memiliki kemurnian yang baik. Nilai  $R_f$  standar CoQ<sub>10</sub> 0,50 sedangkan ekstrak kering 0,49 dan ekstrak basah 0,46. Adanya perbedaan nilai  $R_f$  antar ekstrak diduga adanya senyawa tereduksi dari CoQ<sub>10</sub> yang mempunyai kemiripan struktur atau senyawa lain yang mirip dan kadarnya lebih tinggi sehingga memberikan warna gelap yang lebih jelas di banding dengan tepi kedua bercak ekstrak yang sejajar dengan bercak standar. Dr Karl Folkers (1958) menjelaskan *2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decaprenyl-1,4-benzoquinone* (CoQ<sub>10</sub>) mempunyai bentuk tereduksi *2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decaprenyl-1,4-benzohydroquinone* (Folkers *at al.*, 1958). Pada sinar UV<sub>366</sub> tidak terlihat bercak standar CoQ<sub>10</sub> pada *silika gel*, hal ini dipengaruhi sifat serapan CoQ<sub>10</sub> lebih mendekati pada panjang gelombang maksimum CoQ<sub>10</sub>, yaitu 275 nm (Stiff, 2010). Banyaknya bercak menunjukkan adanya senyawa selain CoQ<sub>10</sub> yang ikut terekstrak yang diduga akan mengganggu analisis pada HPLC.

#### 4. Analisis Kandungan *Coenzyme Q<sub>10</sub>* menggunakan HPLC

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

Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang dimana zat tersebut memiliki nilai absorbansi paling besar. Panjang gelombang maksimum dipilih karena pada panjang gelombang tersebut zat akan memberikan respon yang maksimum, terutama apabila konsentrasi analit yang akan dianalisis mempunyai konsentrasi



kecil. Nilai panjang gelombang maksimum ini dapat digunakan untuk identifikasi kualitatif suatu senyawa, karena bersifat spesifik untuk setiap senyawa yang mempunyai gugus kromofor tertentu dan jenis transisi elektronik tertentu (Gandjar dan Rohman, 2007).

Hasil *scanning* panjang maksimum menggunakan spektrofotometer ultraviolet diperoleh  $\lambda$  maksimum 275,5 nm (gambar 7), hal ini sesuai dengan beberapa jurnal terdahulu untuk identifikasi senyawa CoQ<sub>10</sub> yaitu pada panjang gelombang maksimum 275 nm (Suman, 2011 dan Stiff, 2010).

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

Pembuatan larutan induk standar CoQ<sub>10</sub> dengan melarutkan terlebih dahulu dengan 4 tetes etanol kemudian diencerkan secara kuantitatif dengan metanol. Larutan tersebut disonikasikan selama 15 menit kemudian disaring dengan *membrane filter* 0,22  $\mu$ m. Penambahan etanol dan sonikasi bertujuan untuk membantu pelarutan serbuk standar CoQ<sub>10</sub> dalam metanol. Etanol mempunyai sifat semipolar sehingga dapat memjembantani pelarutan antara metanol yang bersifat polar dengan serbuk CoQ<sub>10</sub> yang bersifat nonpolar (Khopkar, 2008). Sonikator selain difungsikan untuk menghilangkan gas-gas yang terlarut dalam larutan juga untuk menyebarkan nanopartikel yang masih dapat melewati *membrane filter* 0,22  $\mu$ m dalam larutan sampel (Khopkar, 2008). Hasil pembuatan kedua

larutan baku mendapatkan hasil yang larut dan sudah memenuhi syarat untuk digunakan analisis dengan HPLC.

c. Optimasi Sistem HPLC

Optimasi pemisahan menggunakan HPLC dilakukan sebelum uji validasi terhadap metode yang digunakan. Optimasi dilakukan untuk mencari sistem HPLC yang optimum dengan kondisi yang seefektif dan seefisien mungkin. Optimasi sistem HPLC dilakukan untuk melihat daya elusi dan waktu retensi yang diperoleh. Fase gerak yang digunakan dalam elusi menggunakan fase terbalik, yaitu metanol 100% dengan fase diam (kolom) ODS (*octadecyl silane*). Fase diam (ODS) yang digunakan bersifat non-polar dibandingkan dengan fase gerak (metanol), hal ini memungkinkan memisahkan senyawa CoQ<sub>10</sub> dengan senyawa yang lain yang terbawa dengan fase gerak melewati kolom dan keluar menuju detektor sesuai dengan kepolarannya. ODS merupakan fase diam yang mempunyai kemampuan untuk memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang maupun tinggi (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pemilihan sistem HPLC tersebut didasarkan pada kelarutan CoQ<sub>10</sub> yang bersifat larut minyak/ non-polar. Penggunaan fase gerak yang lebih non-polar dibandingkan dengan fase diam/ kolom (fase normal) dalam analisis CoQ<sub>10</sub> akan memberikan pemisahan yang tidak baik, hal ini dikarenakan sifat fase diam ODS, dimana semakin non-polar solut yang terlarut dalam fase gerak non-polar akan mempunyai

afinitas yang sedikit/ nol. Akan tetapi penggunaan sistem fase terbalik akan mengakibatkan solut tertahan lebih lama pada fase diam sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama, hal ini dikarenakan afinitas solut dengan ODS lebih tinggi. Permasalahan dalam fase terbalik dapat diatasi dengan memberikan energi yang lebih tinggi pada saat elusi, yaitu meningkatkan kecepatan alir fase gerak (Gandjar dan Rohman, 2007).

Sistem HPLC yang digunakan memberikan hasil puncak kromatogram yang baik (tidak mengekor/ *tailing peak*) dan memberikan waktu retensi yang cukup cepat, yaitu pada menit ke 9,853 (gambar 8).

d. Validasi Metode Analisis

1) Uji Kesesuaian Sistem

Uji validasi untuk kesesuaian sistem dilakukan untuk mengetahui apakah alat, metoda dan sistem HPLC yang digunakan dapat memberikan hasil yang baik. Untuk uji komponen utama kriteria standar yang diperlukan adalah %CV dari luas area puncak harus kurang dari 1 % untuk lima kali penginjeksian (Snyder, *at al.*, 1997). Menurut Farmakope Indonesia edisi empat (1995), digunakan data kromatogram dari lima kali injeksi hasil penyuntikan ulang, jika dinyatakan batas %CV < 2% dan digunakan data kromatogram penyuntikan enam

kali jika dinyatakan batas %CV > 2%. Keberhasilan pada nilai

waktu retensi untuk senyawa spesifik juga menunjukkan kinerja sistem (Snyder *at al.*, 1997).

Hasil uji kesesuaian menunjukkan *time retention* dan luas puncak  $\leq 2\%$  (lampiran 9 dan 10). Nilai tersebut telah memenuhi syarat simpangan baku relatif (%CV) menurut Farmakope Indonesia edisi IV yaitu  $< 2\%$ . Dapat disimpulkan bahwa sistem HPLC yang ditetapkan dapat digunakan untuk analisis penetapan kadar CoQ<sub>10</sub> pada daging buah siwalan (*Borassus flabellifer* Linn.).

## 2) Linieritas dan Kurva Kalibrasi

Linearitas ditentukan dengan membuat sebuah kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi standar CoQ<sub>10</sub> dan luas puncak. Hubungan linier yang ideal dicapai jika  $r = +1$  atau  $-1$  bergantung pada arah garis, sedangkan nilai slope menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumental yang digunakan (Harmita, 2004). Kurva kalibrasi yang diperoleh dari Tabel 14 memiliki persamaan garis  $y = 3,9263x - 914,42$  dan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,997 (gambar 9) untuk kisaran konsentrasi standar CoQ<sub>10</sub> 400, 500, 600, 700, 800, 900 ng/ mL (lampiran 11 dan 12).

Menurut ICH (2005), nilai  $r$  yang dihasilkan telah memenuhi persyaratan, yaitu harus lebih besar dari 0.990. Nilai

bahwa kurva memiliki kelinieran yang tinggi, artinya dengan meningkatnya konsentrasi CoQ<sub>10</sub> maka luas puncak juga akan mengalami kenaikan yang linear.

### 3) Batas Kuantifikasi (LOQ)

Batas kuantifikasi dilakukan untuk mengetahui konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat menghasilkan data dengan akurasi dan presisi yang baik. Hasil nilai %*diff* dan %CV berdasarkan hasil uji adalah rata-rata %*diff* sebesar 1,88% dan % CV sebesar 1,52%, nilai ini sudah memenuhi syarat FDA (2001) untuk dilakukan uji batas kuantifikasi yaitu nilai rata-rata %*diff* < 15% dan %CV < 15%. Batas kuantifikasi berdasarkan hasil uji adalah sebesar 15,21 ng/mL, sehingga konsentrasi analit yang terukur masih memberikan ketelitian dan ketepatan yang baik (lampiran 13 dan 14).

### 4) Akurasi

Uji akurasi atau ketepatan dilakukan untuk mengetahui kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Akurasi diperiksa dengan menghitung perbedaan nilai yang terukur dengan nilai sebenarnya (%*diff*). Persen *diff* hasil uji akurasi diperoleh nilai rata-rata sebesar 7,36%. Pada konsentrasi 450, 650 dan 850 ng/ mL didapat hasil %*diff* berturut-turut sebesar 11,13%, 1,50% dan 0,45% (lampiran 15

dan 18). Hasil uji akurasi ini telah memenuhi syarat uji pada bahan sediaan farmasi dengan nilai  $\%diff \leq 20\%$  (FDA, 2001).

#### 5) *Recovery*

*Recovery* atau perolehan kembali (persen *recovery*) dihitung dengan cara membandingkan konsentrasi standar CoQ<sub>10</sub> yang diperoleh dengan konsentrasi standar CoQ<sub>10</sub> yang sebenarnya dikalikan 100%. Perolehan kembali disyaratkan pada rentang 80-120% untuk bahan sediaan farmasi (FDA, 2001). Nilai uji perolehan kembali rata-rata sebesar 101,98%, yaitu pada konsentrasi 450, 650 dan 850 ng/ mL rata-rata berturut-turut sebesar 110,19%; 104,67%, dan 91,07% (lampiran 16 dan 19). Pengujian perolehan kembali ini dilakukan pada tiga konsentrasi dengan tujuan untuk memberikan batas bahwa konsentrasi analit yang terukur pada daerah tersebut masih terukur dengan baik oleh detektor. Hasil perolehan kembali ini telah memenuhi persyaratan uji pada bahan sediaan farmasi.

#### 6) *Presisi*

Presisi atau ketelitian adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individu dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel. Presisi diperoleh dengan mengamati waktu tambat, luas puncak dan tinggi puncak pada konsentrasi rendah (450 ng/ mL), sedang (650 ng/ mL) dan

tinggi (850 ng/ mL) menggunakan larutan standar CoQ<sub>10</sub> yang direplikasi masing-masing enam kali untuk pengukuran *intra-day* (keterulangan) dan *inter-day* (presisi antara).

Keterulangan (*repeatability*) menyatakan variabilitas analitik dibawah kondisi operasi yang sama dalam jangka waktu yang sangat singkat. Variabilitas jangka pendek ini meliputi kontribusi dari preparasi sampel, seperti penimbangan, pengenceran, ekstraksi, homogenisasi dan sebagainya. Presisi antara (*intermediate precision*) mencangkup pengaruh efek tambahan yang secara acak terjadi dalam laboratorium. Penggunaannya sesuai tujuan prosedur, misalnya berbeda hari, analisis dan peralatan (Ermer dan Miller, 2005).

Hasil uji keterulangan (pengukuran *intra-day*) pada konsentrasi 450, 650, dan 850 ng/ mL berturut-turut didiperoleh koefisien variasi 1,27%, 1,73% dan 1,25%, sedangkan untuk uji presisi antara (pengukuran *inter-day*) pada konsentrasi 450, 650, dan 850 ng/ mL berturut-turut didiperoleh koefisien variasi 1,07%, 2,04% dan 1,10%. Nilai %CV yang diterima menurut FDA (2001) adalah < 15%, maka metode HPLC yang digunakan sudah memenuhi syarat untuk presisi pada sediaan bahan farmasi. Uji dilakukan pada *intra-day* dan *inter-day* untuk memastikan bahwa setelah bahan sediaan disimpan masih stabil

Hasil dari parameter-parameter validasi metode analisis yang dilakukan telah memenuhi persyaratan yang ditetapkan untuk pengujian bahan sediaan farmasi. Hal ini menunjukkan bahwa analisis CoQ<sub>10</sub> dapat digunakan untuk penetapan kadar kandungan CoQ<sub>10</sub> pada ekstrak. Dokumentasi proses analisis menggunakan HPLC dapat dilihat pada lampiran 23.

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

Hasil penetapan kadar CoQ<sub>10</sub> dalam ekstraksi kering sebesar 21,67% dan ekstraksi basah 7,14%. Untuk mengetahui tingkat signifikansi perbedaan kadar CoQ<sub>10</sub> dalam ekstraksi kering dan ekstraksi basah dilakukan analisis statistik dengan uji *independent sample t test* (lampiran 22) menggunakan SPSS 15. Hasil menunjukkan bahwa pada uji *levene's test* nilai *F* hitung adalah 0,875 dengan probabilitas 0,402 ( $p > 0,05$ ), maka kedua kadar CoQ<sub>10</sub> ekstrak memiliki variansi yang sama (homogen). Setelah mengetahui variansi data kadar CoQ<sub>10</sub> ekstrak homogen, ditentukan nilai *t* hitung menggunakan *equal variances assumed*. Berikut hasil uji



**Tabel 22.** Hasil analisis statistik kadar *coenzyme Q<sub>10</sub>* menggunakan *independent sample t test* SPSS 15

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Kadar Ekstrak CoQ <sub>10</sub> (%)	Equal variances assumed	,875	,402	172,693	4	,000	14,54000	,08420	14,30624	14,77376
	Equal variances not assumed			172,693	3,629	,000	14,54000	,08420	14,29650	14,78350

Hasil uji nilai *t* hitung kadar CoQ<sub>10</sub> ekstrak adalah 172,689 dengan probabilitas 0,000 (< 0,05), maka ada perbedaan rata-rata perolehan kadar CoQ<sub>10</sub> ekstrak antara ekstraksi kering dan ekstraksi basah (tabel 20), sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstraksi kering memiliki kadar CoQ<sub>10</sub> lebih banyak dari pada ekstraksi basah.

Besarnya kadar CoQ<sub>10</sub> pada ekstraksi kering hanya menunjukkan bahwa proses ekstraksi menggunakan pemanasan 70°C memberikan perolehan kadar CoQ<sub>10</sub> lebih banyak dibandingkan dengan ekstraksi basah, tetapi tidak menunjukkan stabilitas senyawa CoQ<sub>10</sub> yang pasti, yaitu perbandingan antara kadar senyawa CoQ<sub>10</sub> dengan senyawa hasil degradasi CoQ<sub>10</sub> akibat pemanasan pada masing-masing ekstrak. Oleh karena itu dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai optimasi analisis perbandingan senyawa CoQ<sub>10</sub> dengan senyawa hasil degradasi CoQ<sub>10</sub> akibat pemanasan masing-masing ekstrak. Masih tinggi perolehan senyawa CoQ<sub>10</sub> pada daging buah siwalan pada proses ekstraksi kering diduga dikarenakan senyawa CoQ<sub>10</sub> pada simplisia masih dapat dilindungi oleh jaringan-jaringan *kotiledon* (jaringan tempat penyimpanan lemak pada tumbuhan bagian buah) (Sipayung, 2003) dan masih dapat distabilkan oleh senyawa-senyawa lain

yang terdapat didalam ekstrak. Hal ini juga dibuktikan oleh Cahyanine *at al.*, (2008) dalam ekstraksi tokoferol dari bekatul (*Oryza sativa*) dengan pemanasan 121°C masih menghasilkan kadar tokoferol sebesar 3,89 mg/gram. Tokoferol mempunyai kemiripan struktur dengan CoQ<sub>10</sub> dimana tokoferol mempunyai titik lebur 3°C (Anonim<sup>2</sup>, 2013). Selain itu, pada ekstraksi kering proses penyarian senyawa larut minyak dengan pelarut *n*-heksan lebih optimum karena sudah tidak adanya kadar air dalam sampel dan waktu ekstraksi yang lebih lama (7 hari). Pada ekstraksi basah, faktor daya tembus pelarut *n*-heksan lebih rendah karena terhalangi dengan adanya air dan waktu penyarian lebih cepat (24 jam), sehingga mendapatkan rendemen ekstrak dan senyawa CoQ<sub>10</sub> lebih sedikit.

Dalam tubuh manusia, CoQ<sub>10</sub> diperoleh dari oksidasi CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> dalam mitokondria oleh *flavoenzymes* seperti *mitochondrial succinate dehydrogenase* dan NADH. CoQ<sub>10</sub> merupakan senyawa minyak dengan struktur mengacu pada kelompok kimia kuinon yang mempunyai rantai poliisoprena mengandung unit isoprena 10 (masing-masing 5 karbon) atau total 50 karbon (Lenaz, 1999). CoQ<sub>10</sub> mempunyai bentuk tereduksi 2,3-dimethoxy -5-methy l-6-decaprenyl -1,4-benzohydroquinone (*Ubiquinol*) (Folkers *at al.*, 1958). Rantai poliisopren dalam CoQ<sub>10</sub> akan mengalami oksidasi dalam proses pemanasan yang tinggi seperti senyawa-senyawa minyak pada umumnya. Pemanasan dengan suhu sangat tinggi akan menyebabkan perubahan rantai rangkap poliisopren CoQ<sub>10</sub> menjadi rantai tunggal sehingga akan membentuk senyawa lain.

CoQ<sub>10</sub> pada daging buah siwalan siwalan (*Borassus flabellifer* Linn.) merupakan senyawa dengan kadar rendah, yaitu dalam 1 kg daging buah siwalan terdapat CoQ<sub>10</sub> 0,93 gram untuk ekstraksi kering 0,063 gram untuk ekstraksi basah. Metode ekstraksi yang optimum digunakan dalam memperoleh kandungan senyawa CoQ<sub>10</sub> dari daging buah siwalan (*Borassus flabellifer* Linn.) adalah dengan menggunakan metode ekstrak kering. Rendemen ekstrak ekstraksi kering diperoleh sebanyak 0,428% dan ekstraksi basah 0,152%. Kadar rata-rata CoQ<sub>10</sub> ekstrak n-heksan daging buah siwalan pada ekstraksi kering 21,67% dan ekstraksi basah 7,14%.