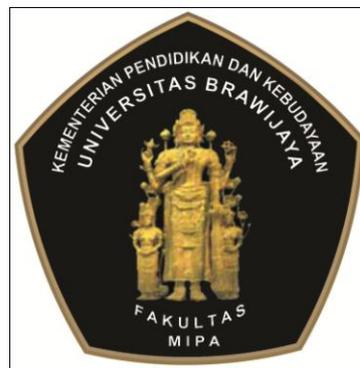


**EKSTRAKSI METFORMIN
DARI UNDUR-UNDUR (*Myrmeleon sp.*) DAN ANALISIS MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Magister



Oleh:

AFIDATUL MUADIFAH

146090200111013

PROGRAM STUDI KIMIA

BIDANG MINAT KIMIA ANALITIK

PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS MIPA

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

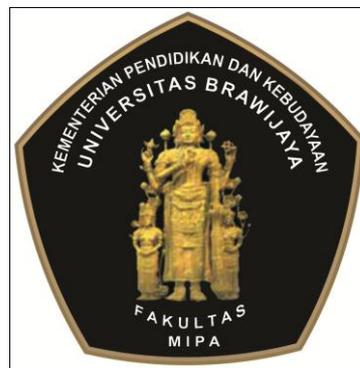
MALANG

2017

**EKSTRAKSI METFORMIN
DARI UNDUR-UNDUR (*Myrmeleon sp.*) DAN ANALISIS
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Magister



Oleh:

AFIDATUL MUADIFAH

146090200111013

PROGRAM STUDI KIMIA

BIDANG MINAT KIMIA ANALITIK

PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS MIPA

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2017

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

**EKSTRAKSI METFORMIN
DARI UNDUR-UNDUR (*Myrmeleon sp.*) DAN ANALISIS
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

Oleh:

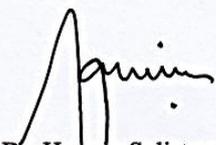
AFIDATUL MUADIFAH

146090200111013

**Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 25 Januari 2017
dan dinyatakan lulus**

KOMISI PEMBIMBING

Ketua


Dr. Hermin Sulistyarti
NIP. 196405291988022001

Anggota


Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 196304041987011001

Mengetahui,

Ketua Program Studi S2 Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya


Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 196304041987011001

**EKSTRAKSI METFORMIN
DARI UNDUR-UNDUR (*Myrmeleon sp.*) DAN ANALISIS
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

Nama Mahasiswa : Afidatul Muadifah

NIM : 146090200111013

Program Studi : Kimia

Bidang Minat : Kimia Analitik

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Dr. Hermin Sulistyarti

Anggota : Dr. Sasangka Prasetyawan, MS

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES

Dosen Penguji 2 : Akhmad Sabarudin, S. Si., M. Sc., Dr. Sc

Tanggal Ujian : 25 Januari 2017

SK Penguji :

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Afidatul Muadifah

NIM : 146090200111013

Jurusan : Kimia

Penulis Tesis yang berjudul : Ekstraksi Metformin dari Undur-undur

(*myrmeleon sp.*) dan Analisis Menggunakan

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.
2. Apabila ternyata di dalam naskah tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan (plagiat) tesis, saya bersedia tesis (MAGISTER) ini dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,

Yang menyatakan,



Afidatul Muadifah
NIM. 146090200111013

RIWAYAT HIDUP

Afidatul Muadifah dilahirkan di Blitar, pada tanggal 8 Maret 1991 sebagai anak pertama dari dua bersaudara, pasangan Bapak Sukirno dan Ibu Naftikah. Menikah dengan Muhammad Nasirul Aziz dan dikaruniai putri Syifa Auliya Zahra. Pendidikan dimulai di SDN Srengat 03 Blitar hingga tahun 2003. Pendidikan menengah pertama ditempuh di MTsN Kunir Blitar dan lulus tahun 2006. Pendidikan menengah atas ditempuh di MAN Tlogo Blitar dan lulus tahun 2009. Pendidikan sarjana ditempuh di Jurusan Kimia, Fakultas SAINTEK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang dimulai pada tahun 2009 dan lulus pada tahun 2013.

Malang, Januari 2017

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala rasa syukur penulis panjatkan atas kehadiran Illahi Robbi karena atas segala limpahan rahmat, taufik serta inayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “**Ekstraksi Metformin dari Undur-undur (*myrmeleon sp.*) dan Analisis Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**”.

Selama penulisan tesis ini penulis mendapat bimbingan, arahan dan motivasi dari beberapa pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan banyak terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Ibu Dr. Hermin Sulistyarti dan Bapak Dr. Sasangka Prasetyawan, MS selaku Dosen Pembimbing yang senantiasa memberikan pengarahan, bimbingan, bantuan, motivasi, serta kesediaannya untuk berdiskusi sehingga memberikan masukan yang berarti sampai akhir pembuatan tesis ini.
2. Ibu Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES dan Bapak Akhmad Sabarudin, S.Si., M. Sc., Dr. Sc selaku Dosen Penguji yang memberi saran dan masukan kepada penulis untuk perbaikan naskah tesis ini.
3. Seluruh Dosen Pengajar dan staf di Jurusan Kimia yang telah memberikan ilmu, bimbingan dan bantuan selama perkuliahan.
4. Seluruh keluargaku (Orang tuaku: Bapak Sukirno dan Ibu Naftikah, Bapak Abd.Qohar dan Ibu Kasiati, Suamiku: Muhammad Nasirul Aziz, Adikku: Ummi Ulfatur Rohmah dan Ibrahim Kholilurrohman serta putri kecilku Syifa Auliya Zahra) yang dengan penuh kasih sayang dan keikhlasan telah memberikan segala kebutuhan kepada penulis, memberi dorongan dan motivasi baik secara materiil maupun spirituil.

5. Teman-teman angkatan 2014 yang telah berbagi kebersamaannya selama ini dalam senang maupun susah sehingga tetap terjaga persaudaraan kita.

Semoga Allah SWT memberikan pahala yang berlipat ganda kepada semua pihak yang telah membantu penulis. Semoga ilmu yang penulis peroleh dapat bermanfaat bagi penulis, masyarakat, dan ilmu pengetahuan. Aamiin.

Malang, Januari 2017

Penulis

RINGKASAN

Afidatul Muadifah. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Januari 2017. Ektstraksi Metformin Undur-undur (*myrmeleon sp.*) dan Analisis Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Komisi Pembimbing. Ketua: Dr. Hermin Sulistyarti. Anggota: Dr. Sasangka Prasetyawan, MS.

Undur-undur (*myrmeleon sp.*) adalah kelompok serangga dari famili *Myrmeleontidae*, yang memilih tempat hidup di tanah yang kering dan terlindungi dari sinar matahari secara langsung. Di Indonesia, undur-undur (*myrmeleon sp.*) digunakan untuk perawatan diabetes karena dipercaya mengandung senyawa penurun kadar gula darah. Akan tetapi belum ada laporan yang menunjukkan kandungan kimia dari undur-undur (*myrmeleon sp.*). Sehingga, peneliti akan melakukan analisis dan pemisahan kandungan kimia yang berpotensi sebagai penurun kadar gula darah dari ekstrak metanol undur-undur (*myrmeleon sp.*) khususnya untuk senyawa metformin.

Metformin hidroklorida (*N, N dimethylimidodicarbonimidic*) adalah senyawa dari golongan biguanid yang banyak digunakan secara oral pada pengobatan diabetes melitus tipe-2. Tujuan penelitian ini adalah optimasi metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) untuk menentukan metformin dari ekstrak undur-undur (*myrmeleon sp.*). Optimasi metode dilakukan pada kondisi: laju alir (0,3; 0,5; dan 0,7 mL/min), panjang gelombang detektor UV (230-240 nm) dan komposisi fase gerak campuran metanol:air 70:30 untuk sistem elusi isokratik dan elusi gradien menggunakan metanol 50-90%.

Kondisi optimum ditentukan berdasarkan hasil pemisahan terbaik yang ditunjukkan dengan karakteristik parameter HPLC, antara lain intensitas optimum dari kromatogram kedua komponen (standar metformin dan glibenklamid) dan berdasarkan nilai resolusi (R_s), jumlah plat teori (N), faktor kapasitas (k'), dan selektivitas (α) dari kromatogram-kromatogram standar metformin dan glibenklamid maupun kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*).

Hasil optimasi metode diperoleh pada laju alir 0,5 mL/min dengan panjang gelombang UV 233 nm dengan sistem elusi gradien pada komposisi fase gerak metanol 50-40% dan air 50-60% dalam waktu 2,5 menit, diikuti dengan metanol 70-90% dan air 30-10% pada menit ke-2,51-15. Kemudian dengan kondisi optimum tersebut dilakukan analisis kualitatif dan kuantitatif.

Analisis kualitatif dikondisikan dengan membandingkan waktu retensi standar metformin dengan puncak analit dari undur-undur (*myrmeleon sp.*). metode *spiking* juga

digunakan untuk menentukan linieritas, batas deteksi (LOD), batas kuantitasi (LOQ) dan tingkat akurasi.

Berdasarkan kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) dan sampel yang *dispike* dengan standar metformin, menunjukkan bahwa terjadi kenaikan puncak area pada waktu retensi 4,092 menit. Kenaikan puncak area mengkonfirmasi bahwa metformin terkandung dalam ekstrak undur-undur (*myrmeleon sp.*) Kemudian dari validasi metode, diperoleh tingkat linieritas (R^2) mendekati 1 (yaitu 0,990 dari 3-12 ppm) dengan nilai LOD dan LOQ secara berurutan sebesar 0,07 ppm dan 0,23 ppm dan nilai persen (%) perolehan kembali 92,6 %. Sehingga dapat disimpulkan bahwa metode yang dikembangkan memenuhi persyaratan validasi.

Analisis kuantitatif metformin dalam ekstrak metanol undur-undur (*myrmeleon sp.*) menggunakan metode *spiking* dan metode standar internal. Konsentrasi metformin yang diperoleh dari metode *spiking* adalah 0,577 mg/g dan dari metode standar internal 0,400 mg/g. Kedua metode analisis menunjukkan nilai RSD sebesar 6,93% (untuk metode *spiking*) dan 8,75% (untuk metode standar internal).

Akan tetapi, metode analisis kuantitatif yang dipilih untuk analisis metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) adalah metode *spiking* yang lebih akurat dengan menggunakan standar metformin. Sehingga, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi metformin dalam sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) adalah 0,577 mg/g.

SUMMARY

AFIDATUL MUADIFAH. Magister Program of Brawijaya University. January 2017. Extraction of Metformin in undur-undur (*myrmeleon sp.*) and Analysis by *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Supervisor: Dr. Hermin Sulistyarti, Co. Supervisor: Dr. Sasangka Prasetyawan, MS.

Undur-undur (*myrmeleon sp.*) is a group of insects from the family of *Myrmeleontidae*, which lives in dry land and protected from direct sunlight. In Indonesia, *myrmeleon sp.* has been used for treating diabetes as it is believed that it contains substance for lowering blood sugar. However, there is no report that shows the chemical content in undur-undur (*myrmeleon sp.*). Thus, this research is focused on the analysis and separation of chemical constituents potential for lowering blood sugar from undur-undur (*myrmeleon sp.*) methanol extract, especially for the metformin compound.

Metformin hydrochloride (*N, N dimethylimidodicarbonimidic*) is a substance from biguanide group that is widely used in the oral treatment of diabetes mellitus type-2. This study aims to optimize method the high performance liquid chromatography (HPLC) for metformin determination in undur-undur (*myrmeleon sp.*) extract. The method was optimized under the following conditions: flow rate (0,3; 0,5; and 0,7 mL/min), wavelength UV detector (230-240 nm), and composition of the mobile phase mixture of methanol: water (with ratio of 70:30 for isocratic elution system and gradient elution using methanol from 50-90%).

The optimum conditions are determined based on the best separation result shown by characteristic HPLC parameters, including the optimum intensity of the two components chromatogram (metformin and glibenclamide standard), the resolution (R_s), the number of theoretical plates (N), capacity factor (k'), and selectivity (α) from chromatograms standard metformin, and sample chromatogram of undur-undur (*myrmeleon sp.*).

The results showed that the optimum conditions for HPLC measurements were obtained at flow rate of 0,5 mL/min, wavelength UV detector of 233 nm with gradient elution using methanol/water mobile phase composition of 50-40% to 50-60% for 2.5 minutes, followed by methanol/water 70-90% to 30-10% for 2.51 to 15 minutes. These optimum conditions were used for qualitative and quantitative analysis.

Qualitative analysis was conducted by comparing the retention time of the spiked metformin standard with the analyte peak from extract *myrmeleon sp.* The spiking

method was also used to determine linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), and accuracy rate.

Based on the chromatograms of sample (*myrmeleon sp.* extract) and the sample spiked with metformin standard, showed that increasing peak area at retention time of 4,092 mins. The increasing peak area confirm that the presence of metformin in *myrmeleon sp.* extract. The HPLC gave result to linearity (R^2) close to 1 (ie 0,990 from 3-12 ppm) with LOD and LOQ values respectively of 0.07 ppm and 0.23 ppm, with percent (%) recovery of 92,6 %. It can be concluded that the developed method meet the requirements of validation.

Quantitative analysis of metformin in undur-undur (*myrmeleon sp.*) methanol extract have been conducted using spiking and internal standard methods. The obtained by spiking method is 0.577 mg/g, and by internal standard method is 0,400 mg /g. Both methods showed results RSD values of 6.93% (for spiking method) and 8.75% (for internal standard method).

However, quantitative analysis method chosen for the analysis of metformin in undur-undur (*myrmeleon sp.*) is spiking method using metformin standard method of the more precise. Therefore, it can be concluded that metformin concentration in *myrmeleon sp.* is 0,577 mg/g.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul “Ekstraksi Metformin dari Undur-undur (*myrmeleon sp.*) dan Analisis Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)”. Penyusunan naskah tesis ini merupakan salah satu persyaratan dalam memperoleh gelar Magister Sains di Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari atas kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki sehingga tulisan tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan dan penyempurnaan tesis ini. Semoga tesis ini dapat memberikan pendorong kreativitas mahasiswa, akademisi dan peneliti untuk mengembangkan potensi sumber daya hewani lain, dalam rangka pengembangan ilmu, teknologi dan kewirausahaan.

Malang, Januari 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
IDENTITAS TIM PENGUJI	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
RIWAYAT HIDUP	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR TABEL	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Metformin	6
2.2 Glibenklamid.....	9
2.3 Kinerja Kombinasi Metformin dan Glibenklamid Sebagai Antidiabetes.....	10
2.4 Diabetes.....	11
2.5 Undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>).....	12
2.6 Ekstraksi Maserasi	15
2.7 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	16
2.7.1 Kromatografi.....	16

2.7.2 KCKT.....	16
2.7.3 Kolom KCKT.....	17
2.7.4 Fase Diam.	18
2.7.5 Fase Gerak	20
2.7.6 Parameter Kromatografi.....	20
2.7.6.1 Resolusi (Rs)	20
2.7.6.2 Jumlah Plat Teori (N)	21
2.7.6.3 Faktor kapasitas (k')	22
2.7.6.4 Selektivitas (α).....	23
2.7.7 Elusi Isokratik	26
2.7.8 Elusi Gradien	27
2.8 Metode Analisis Kualitatif dan Kuantitatif KCKT	28
2.8.1 Analisis Kualitatif.	28
2.8.1.1 Identifikasi puncak berdasarkan waktu retensi standar	28
2.8.1.2 <i>Spiking</i> sampel.....	29
2.8.1.3 Menggunakan detektor selektif dan spektrometer.....	30
2.8.2 Analisis Kuantitatif.	30
2.8.2.1 Standar eksternal.....	30
2.8.2.2 Standar internal.....	31
2.8.2.3 <i>Spiking</i>	32
2.9 Teknik analisis metformin menggunakan KCKT	33
BAB III KERANGKA KONSEP PENELITIAN	35
3.1 Kerangka Konsep	35
3.2 Skema Konsep Penelitian.....	37
3.3 Hipotesis Penelitian.....	38
BAB IV METODE PENELITIAN	39
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	39
4.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	39
4.2.1 Bahan Penelitian	39
4.2.2 Alat Penelitian.....	39
4.3 Tahapan Penelitian	40

4.4	Prosedur Penelitian.....	40
4.4.1	Preparasi Sampel.....	40
4.4.2	Pembuatan Standar Metformin 6 ppm dan Glibenklamid 3 ppm.....	41
4.4.2.1	Larutan Induk Standar Metformin dan Glibenklamid 1000 ppm.....	41
4.4.2.2	Standar Metformin 6 ppm	41
4.4.2.3	Standar Glibenklamid 3 ppm.....	42
4.4.2.4	Glibenklamid 3 ppm dalam Metformin 6 ppm.....	42
4.4.3	Optimasi Metode KCKT.....	43
4.4.3.1	Penentuan Laju Alir yang Optimum.....	43
4.4.3.2	Penentuan Panjang Gelombang UV yang Optimum	43
4.4.3.3	Penentuan Komposisi Fase gerak Metanol:Air yang Optimum	44
4.4.4	Penentuan keberadaan metformin dari undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>)	44
4.4.5	Pengukuran kadar metformin dari undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>).....	46
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		48
5.1	Standar Metformin dan Glibenklamid	48
5.2	Laju Alir Optimum dalam Pemisahan Metformin	50
5.3	Panjang Gelombang Optimum dalam Pemisahan Metformin	51
5.4	Komposisi Fase Gerak Metanol:Air Optimum dalam Pemisahan Metformin	54
5.5	Analisis Kualitatif Metformin dalam Undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>)	62
5.6	Analisis Kuantitatif Metformin dalam Undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>).....	64
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....		68
6.1	Kesimpulan	68
6.2	Saran.....	68

DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN.....	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur kimia metformin hidroklorida	6
Gambar 2.2	Mekanisme metformin dalam rantai mitokondria pernafasan kompleks I	8
Gambar 2.3	Mekanisme molekuler potensial aksi metformin pada glukoneogenesis hati	9
Gambar 2.4	Struktur kimia glibenklamid	10
Gambar 2.5	Metamorfosis undur-undur	13
Gambar 2.6	Reaksi silika dengan organoklorosilan	19
Gambar 2.7	Contoh profil kromatogram dengan beberapa nilai Faktor Resolusi (R_s)	21
Gambar 2.8	Perhitungan Resolusi (R_s) Kromatografi	21
Gambar 2.9	Penentuan Jumlah Plat Teori (N)	22
Gambar 2.10	Contoh kromatogram dengan faktor kapasitas (k') rendah dan tinggi	23
Gambar 2.11	Penentuan Selektivitas (α)	23
Gambar 2.12	Pengaruh jenis pelarut organik terhadap selektivitas kromatogram metode KCKT fase terbalik	24
Gambar 2.13	Pengaruh perubahan pH fase gerak terhadap selektivitas kromatogram metode KCKT fase terbalik dengan analit bersifat asam dan kolom C8	25
Gambar 2.14	Kromatogram yang menunjukkan perubahan selektivitas pemisahan yang disebabkan karena perubahan sifat kimia fase diam pada metode KCKT fase terbalik	25
Gambar 2.15	Kromatogram yang menunjukkan perubahan selektivitas pemisahan yang disebabkan karena perbedaan suhu kolom yang digunakan pada metode KCKT fase terbalik	26
Gambar 2.16	Profil kromatogram yang menunjukkan potensi masalah yang dihadapi dengan metode elusi isokratik KCKT	27
Gambar 2.17	Kromatogram hasil pemisahan herbisida pada kolom C8	28
Gambar 2.18	Identifikasi puncak sampel berbasis kesamaan waktu retensi zat standar	29

Gambar 2.19 Kromatogram sampel dan kromatogram spiking sampel.....	30
Gambar 2.20 Kromatogram standar eksternal dan sampel	31
Gambar 2.21 Kromatogram sampel yang mengandung standar internal.....	32
Gambar 5.1 Kromatogram Standar Metformin 6 ppm.....	49
Gambar 5.2 Kromatogram Standar Glibenklamid 3 ppm	50
Gambar 5.3 Kromatogram Standar MET 6 ppm dan GLB 3 ppm dengan tiga variasi laju alir.....	51
Gambar 5.4 Puncak spektra scanning UV 200-800 nm	52
Gambar 5.5 Kromatogram Standar MET 6 ppm dan GLB 3 ppm dengan lima titik panjang gelombang.....	53
Gambar 5.6 Kromatogram Standar MET 6 ppm dan GLB 3 ppm dengan elusi isokratik	54
Gambar 5.7 Kromatogram Sampel Undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>) dengan elusi isokratik (ISO)	55
Gambar 5.8 Kromatogram Sampel Undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>) dengan elusi GRD 1	57
Gambar 5.9 Kromatogram Sampel Undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>) dengan elusi GRD 2.....	58
Gambar 5.10 Kromatogram Sampel Undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>) dengan elusi GRD 3.....	59
Gambar 5.11 Kromatogram Sampel Undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>) dengan elusi GRD 4.....	60
Gambar 5.12 Kromatogram Standar MET 6 ppm dan GLB 3 ppm dengan kondisi KCKT optimum	61
Gambar 5.13 Kromatogram standar metformin 6 ppm dan <i>Spiking</i> metformin 6 ppm dalam undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>) dengan kondisi KCKT optimum	62
Gambar 5.14 Kromatogram sampel undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>) dengan <i>spiking</i> standar metformin 6 ppm pada kondisi KCKT optimum.....	65

Gambar 5.15 Kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*)
dengan standar internal glibenklamid 3 ppm pada kondisi
KCKT optimum..... 66

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Metode dan hasil analisis metformin menggunakan fase gerak campuran metanol dan air.....	34
Tabel 5.1 Evaluasi pemisahan MET dan GLB pada berbagai laju alir.....	51
Tabel 5.2 Evaluasi pemisahan standar MET dan GLB dengan sistem ISO dan GRD 4	62
Tabel 5.3 Hasil perolehan kembali senyawa metformin dalam undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>)	64
Tabel 5.4 Nilai % RSD konsentrasi metformin dalam undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>)	67

DAFTAR LAMPIRAN

L.1 Preparasi sampel undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>)	72
L.2 Pembuatan larutan standar	72
L.2.1 Standar metformin 6 ppm	72
L.2.2 Standar glibenklamid 3 ppm	73
L.3 <i>Spiking</i> glibenklamid 3 ppm dalam metformin 6 ppm	73
L.4 Puncak spektra <i>scanning</i> UV 200-800 nm	74
L.5 Evaluasi pemisahan standar MET dan GLB (dihitung nilai R_s , N , k' dan α)	75
L.5.1 Optimasi laju alir	75
L.5.2 Optimasi panjang gelombang	78
L.5.3 Optimasi komposisi eluen	83
L.6 Analisis kualitatif metformin dalam undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>) (metode <i>spiking</i>).....	89
L.7 Validasi metode analisis kualitatif KCKT.....	91
L.7.1 Penentuan linieritas	91
L.7.2 Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ).....	94
L.7.3 Penentuan % recovery	94
L.8 Analisis kuantitatif metformin dalam ekstrak metanol undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>)	95
L.8.1 Metode <i>spiking</i>	95
L.8.2 Metode standar internal	99

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Prevalensi diabetes tipe 2 telah mencapai epidemi yang berlebih di seluruh dunia dan menjadi hal utama yang menyebabkan risiko penyakit kardiovaskular dan kematian dini. Pencegahan dan manajemen dari diabetes tipe 2 telah menjadi tantangan utama terhadap kesehatan masyarakat di seluruh dunia. Metformin hidroklorida (*N, N dimethylimidodicarbonimidic*, Gambar 2.1), yang merupakan turunan biguanid adalah obat yang paling banyak diresepkan dan dianjurkan untuk mengobati hiperglikemia pada individu dengan diabetes tipe 2 dalam hubungannya dengan modifikasi gaya hidup (diet, mengontrol berat badan dan aktivitas fisik). Metformin hidroklorida sebagai senyawa terapi oral baris pertama pada pedoman terbaru dari studi diabetes yang telah dilakukan oleh Asosiasi Diabetes Amerika Eropa (Adler, A.I. *et al.*, 2009 dan Nathan, D.M. *et al.*, 2009).

Rekomendasi tersebut didasarkan pada studi klinis dari UK Studi Diabetes Prospektif (UK *Prospective Diabetes Study*/UKPDS), yaitu sebuah pusat multi kontrol acak pada beberapa model terapi diabetes tipe 2 yang berbeda-beda. Studi tersebut melaporkan bahwa kontrol glukosa intensif dengan metformin dapat menurunkan risiko titik akhir terkait diabetes dan kematian pada pasien diabetes dengan kelebihan berat badan dan memberikan serangan hipoglikemia yang lebih sedikit apabila dibandingkan dengan terapi insulin dan sulfonilurea. Selain itu, pengurangan mortalitas akibat kardiovaskuler dengan metformin juga

lebih utama apabila dibandingkan dengan senyawa antidiabetes lainnya, hal tersebut telah dibuktikan dengan lebih dari 30 uji klinis (Selvin, E. *et al.*, 2008 dan Lamanna, C. *Et al.*, 2011).

Keutamaan dari metformin tersebut, menjadi pendorong bagi beberapa peneliti untuk melakukan analisis metformin dengan menggunakan instrumen kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) pada beberapa jenis sampel. Diantaranya yaitu, Sultana *et al.* (2013) telah melakukan pemisahan dan kuantifikasi empat senyawa antidiabetes yaitu metformin (MET), pioglitazone (PIO), glibenklamid (GLB) dan glimepirid (GLM) menggunakan KCKT Shimadzu. Kondisi pemisahan yang digunakan yaitu fase gerak metanol:air (70:30), laju alir 1 mL/min, kolom RP-18 (250Lx4,6mm) dan detektor UV 235 nm yang sudah teroptimasi. Dengan kondisi tersebut, empat senyawa antidiabetes dapat terelusi pada waktu retensi 2 menit (MET), 3 menit (PIO), 7 menit (GLB) dan 9 menit (GLM).

Kemudian Peraman, R. *et al.* pada tahun 2014, yang mana melakukan indikasi stabil metode KCKT untuk menentukan metformin hidroklorida dan pioglitazone hidroklorida dalam bentuk dosis. Kondisi analisis metode KCKT yang digunakan yaitu fase gerak metanol:air (45:55), laju alir 1 mL/min, kolom RP-18 (250Lx4,6mm) dan detektor UV 265 nm. Metformin hidroklorida dan pioglitazone hidroklorida terelusi secara berurutan pada waktu retensi 4,68 dan 14,22.

Beberapa penelitian tersebut menunjukkan bahwa metode KCKT dapat digunakan dalam analisis metformin pada beberapa obat sediaan dan belum ada penelitian yang menggunakan sampel hewan undur-undur (*myrmeleon sp.*).

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan oleh Kurniasih *et al.* pada tahun 2006, hewan undur-undur (*myrmeleon sp.*) bermanfaat sebagai penurun kadar gula darah (antidiabetes). Akan tetapi belum ada laporan yang menunjukkan kandungan kimia dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) yang dapat menurunkan kadar gula darah, sampai saat ini pemanfaatannya masih berdasarkan pengalaman empiris yang diwariskan secara turun temurun tanpa disertai data penunjang yang memenuhi persyaratan.

Sehingga, pada penelitian ini akan dilakukan ekstraksi metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*) dan analisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Kondisi pemisahan yang dipilih adalah fase gerak metanol:air dan kolom non polar berbasis C18, karena selain menunjukkan pemisahan yang bagus, puncak kromatogram yang terbentuk adalah simetris dengan waktu retensi MET yang terhitung cepat. Akan tetapi untuk mengetahui kondisi optimum dalam analisis MET menggunakan KCKT, maka dalam penelitian ini dilakukan beberapa proses optimasi, yaitu optimasi laju alir, optimasi panjang gelombang detektor UV dan optimasi komposisi fase gerak.

Laju alir yang akan digunakan yaitu 0,3 mL/min; 0,5 mL/min dan 0,7 mL/min. Selanjutnya, untuk panjang gelombang detektor UV yang dipilih yaitu pada rentang 230-240 nm, yang mana merupakan panjang gelombang yang menunjukkan absorbansi maksimum dari senyawa MET dan glibenklamid (GLB). Kemudian untuk komposisi fase gerak yang dipilih yaitu metanol:air (70:30) dengan sistem elusi isokratik dan metanol:air (dengan kenaikan metanol 50-90 %) dengan elusi gradien, karena selain diharapkan puncak kromatogram MET dapat terpisah dengan baik, diharapkan juga puncak senyawa-senyawa lain dalam

ekstrak metanol undur-undur (*myrmeleon sp.*) tidak ada yang saling tumpang tindih (*overlapping*).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah kondisi optimum metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang digunakan dalam analisis metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*)?
2. Berapakah kadar metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) yang diukur menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)?

1.3 Batasan Masalah

1. Kondisi optimum diukur dengan menghitung resolusi (R_s), jumlah plat teori (N), faktor kapasitas (k'), dan selektivitas (α) dari kromatogram standar metformin dan glibenklamid.
2. Sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) yang digunakan diperoleh dari Desa Krebet Kecamatan Srengat Kabupaten Blitar.
3. Ukuran dan berat sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) yang digunakan diambil sama.
4. Metode analisis yang digunakan adalah metode *spiking* dan metode standar internal.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui kondisi optimum metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang digunakan dalam analisis metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*).

2. Mengetahui kadar metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*) menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

1.5 Manfaat Penelitian

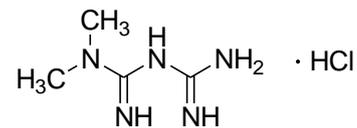
1. Memberikan wawasan dan informasi mengenai bahan kimia yang terkandung dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) sehingga konsumen lebih yakin ketika akan menggunakannya sebagai obat dalam membantu pemulihan penyakit diabetes.
2. Meningkatkan kesejahteraan dan kesehatan masyarakat dengan cara mengurangi konsumsi obat-obatan sintetik secara berlebihan karena selain mahal juga memiliki dampak buruk bagi kesehatan.
3. Menjadi pendorong kreativitas mahasiswa, akademisi dan peneliti untuk mengembangkan potensi sumber daya hewani lain, dalam rangka pengembangan ilmu, teknologi dan kewirausahaan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Metformin

Metformin hidroklorida (*N, N dimethylimidodicarbonimidic*) dengan struktur kimia seperti pada Gambar 2.1 adalah senyawa yang berbentuk kristal putih, dengan rumus molekul $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ dan berat molekul 165,63. Metformin hidroklorida dapat larut dalam air dan sukar larut dalam aseton, eter dan kloroform (David *et al.*, 2005).



Gambar. 2.1 Struktur kimia metformin hidroklorida

Metformin hidroklorida merupakan senyawa aktif yang berfungsi sebagai zat antidiabetes tipe-2 dari kelas biguanid. Sistem kerja utama dari metformin adalah menurunkan resistensi insulin (ketidakmampuan tubuh untuk memanfaatkan insulin) dengan memperbaiki kerja insulin (Klepser dan Kelly, 1997).

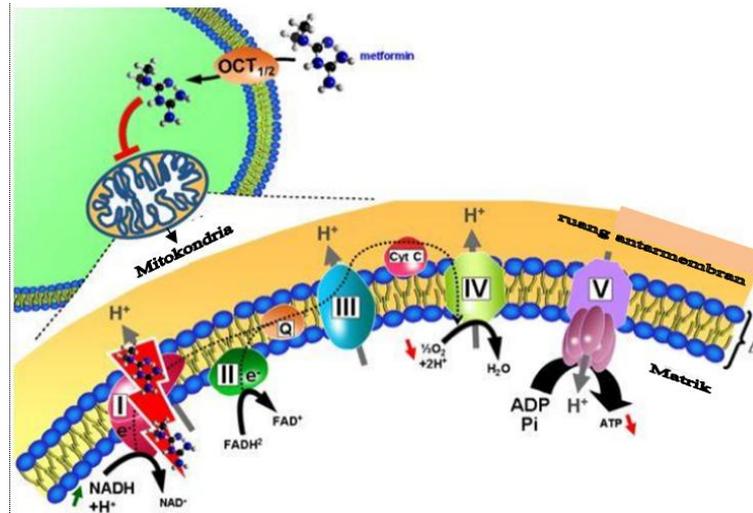
Metformin menjadi pilihan pertama dalam pengobatan diabetes karena kadar glukosa darah penderita diabetes tidak dapat dikendalikan hanya dengan mengatur pola hidup. Hal ini sangat berguna bagi penderita dengan kelebihan berat badan, karena beberapa obat diabetes lain memberikan resiko dalam menaikkan berat badan. Keuntungan lain dari metformin adalah tidak menyebabkan kadar glukosa darah rendah (hipoglikemia) yang mana merupakan masalah dengan beberapa obat penurun glukosa darah lainnya (Selvin, E. *et al.*,

2008 dan Lamanna, C. *Et al.*, 2011). Secara farmakodinamik, potensial lain dari metformin yaitu meningkatkan penyerapan glukosa, meningkatkan sinyal insulin, menurunkan asam lemak dan sintesis trigliserida, dan meningkatkan asam lemak beta-oksidase (Gong Li *et al.*, 2012).

Beberapa mekanisme molekuler dari metformin dalam meningkatkan penyerapan glukosa dan meningkatkan sinyal insulin adalah melalui rantai mitokondria. Rantai mitokondria pernafasan kompleks I adalah target utama metformin, karena rantai tersebut mempunyai konstanta disosiasi asam yang tinggi ($pK_a=12,4$) dengan metformin berada dalam bentuk muatan positif terprotonasi dibawah kondisi fisiologis, sebagai hasilnya hanya dapat sedikit melintasi membran plasma dengan difusi pasif. Dengan demikian, transportasi intraseluler yang dimediasi oleh isoform yang berbeda dari transporter kation organik (*organic cation transporters* (OCT)) tergantung dari jaringan yang dituju (seperti OCT1 dalam hati atau OCT2 dalam ginjal). Sekali di dalam kompartemen sitosol, maka mitokondria merupakan target utama dari metformin. Muatan positif dari metformin digunakan untuk memperhitungkan akumulasi dalam matriks energi mitokondria, dengan didorong oleh potensial membran ($\Delta\phi$), sedangkan rantai samping hidrokarbon nonpolar dari obat tersebut juga dapat mempromosikan ikatan struktur hidrofobik, terutama fosfolipid dari membran mitokondria (Schafer, H.J. *et al.*, 1983).

Meskipun mekanisme yang tepat dimana metformin bertindak pada tingkat molekuler masih belum diketahui, telah ditunjukkan bahwa obat tersebut dapat menghambat rantai mitokondria pernafasan khususnya pada tingkat kompleks I tanpa mempengaruhi langkah-langkah lain dari sistem kerja mitokondria. Sifat

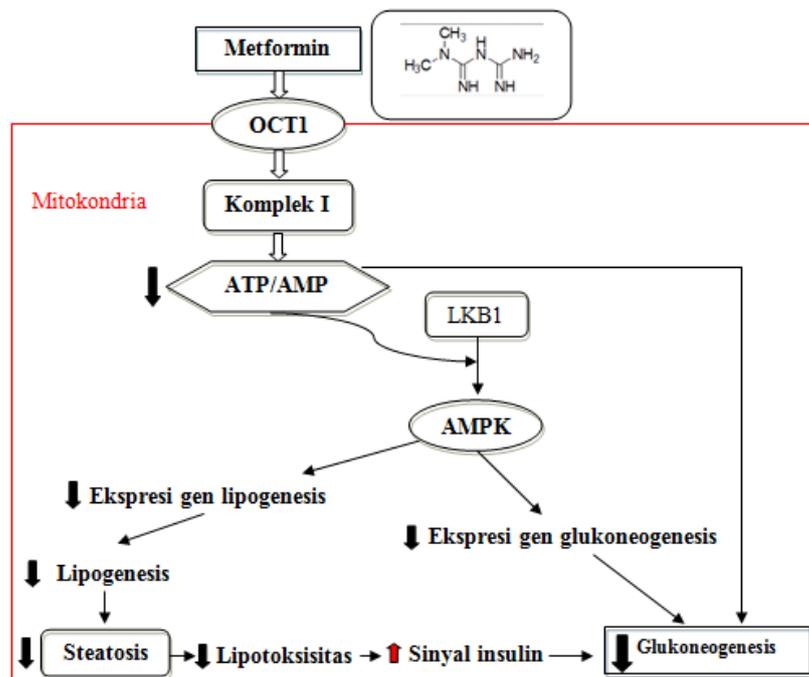
unik dari obat ini adalah menginduksi penurunan oksidasi NADH, memompa proton untuk melintasi membran mitokondria bagian dalam dan tingkat konsumsi oksigen, mengarahkan pada penurunan gradien proton ($\Delta\phi$) dan akhirnya mereduksi sintesis proton ATP dari ADP dan dari fosfat anorganik (Pi) (Gambar 2.2).



Gambar 2.2 Mekanisme metformin dalam rantai mitokondria pernafasan kompleks I

Mekanisme molekuler potensial aksi metformin pada glukoneogenesis hati terjadi melalui proses berikut, yaitu setelah terjadi penyerapan metformin dalam hati melalui OCT1, mitokondria menjadi target utama dari metformin yang diberikan spesifik dan menghambat Adenosin monofosfat-protein kinase teraktivasi (*Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase/AMPK*) rantai pernafasan kompleks I secara independen. Penurunan ringan yang dihasilkan dalam bentuk energi menjadi penyebab akut dan menghambat energi secara sementara sehingga memakan jalur glukoneogenik. Selain itu, melalui AMPK dependen dan independen, metformin dapat menyebabkan penghambatan produksi glukosa dengan mengganggu ekspresi gen glukoneogenesis. Secara paralel, aktivasi komponen molekul kinase hati B1 (*Liver Kinase B1/LKB1*)

tergantung dari AMPK dengan dipicu oleh menipisnya ATP yang dapat mengurangi lipogenesis hati dan mengerahkan efek tidak langsung pada sensitivitas insulin hati untuk mengontrol output glukosa hepatic (Gambar 2.3) (Zhou, G. *et al.*, 2001).

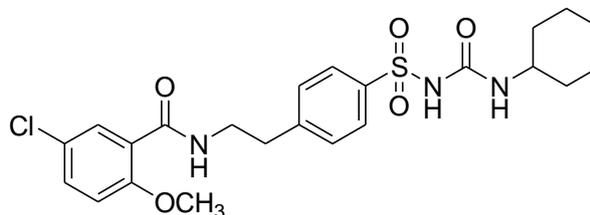


Gambar 2.3 Mekanisme molekuler potensial aksi metformin pada glukoneogenesis hati

2.2 Glibenklamid

Glibenklamid merupakan bahan kimia obat yang berpotensi sebagai zat antidiabetik tipe-2 dari senyawa golongan *sulfonylurea*. Mekanisme kerja dari glibenklamid adalah pertama, pelepasan insulin dari sel beta (sekresi insulin endogen meningkat), rangsangannya melalui pengikatan *sulfonylurea* dengan reseptor (yang berhubungan dengan saluran kalium pada membran sel beta), pengikatan ini menghambat keluarnya ion kalium melalui saluran kalium tersebut, dan menghasilkan depolarisasi membran yaitu membuka saluran kalium yang bermuatan listrik sehingga kalsium ekstra seluler masuk ke dalam sel dan

meningkatkan kalsium sitosolik (melepas insulin). Kedua, penurunan konsentrasi glukagon serum dan ketiga peningkatan kerja insulin pada jaringan target (Negru *et al.*, 2007).



Gambar 2.4. Struktur kimia glibenklamid

Glibenklamid (N-p-[2-(5-Chloro-2-methoxybenzamido)ethyl]benzenesulfonyl-N'-cyclohexylurea) secara fisik berbentuk padatan berwarna putih. Secara kimia glibenklamid mempunyai formula $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$ dan berat molekul 494,00 g/mol. Struktur kimia glibenklamid pada Gambar 2.4, menunjukkan bahwa glibenklamid termasuk dalam senyawa yang kurang polar apabila dibandingkan dengan metformin, karena glibenklamid mempunyai gugus non polar seperti benzena. Glibenklamid larut dalam dimetil sulfosida (DMSO), sedangkan DMSO merupakan pelarut yang dapat bercampur dengan air, sehingga meskipun glibenklamid bersifat kurang polar (dibandingkan dengan metformin), tetapi glibenklamid masih dapat larut dalam pelarut yang polar.

2.3 Kinerja Kombinasi Metformin dan Glibenklamid Sebagai Antidiabetes

Kombinasi senyawa metformin dan glibenklamid sangat cocok apabila digunakan dalam pengobatan pasien diabetes dengan hipoglikemia yang sulit terkontrol dengan monoterapi (metformin atau glibenklamid saja), olahraga maupun diet. Selain itu, kombinasi ini saling memperkuat sistem kerja dari masing-masing senyawa, sehingga penyesuaian kadar gula darah penderita

diabetes dapat terkontrol dengan lebih baik. Kemudian, dengan melakukan kombinasi ini efek samping yang timbul menjadi lebih sedikit apabila dibandingkan dengan monoterapi (metformin atau glibenklamid saja). Metformin dapat menekan potensi glibenklamid dalam menaikkan berat badan pada pasien diabetes melitus, sehingga cocok untuk pasien diabetes melitus yang mengalami kelebihan berat badan (Satoskar, 2001).

2.4 Diabetes

Diabetes mellitus adalah istilah kedokteran untuk penyakit di Indonesia yang dikenal dengan nama penyakit gula atau kencing manis. Diabetes mellitus merupakan sekumpulan gejala yang timbul pada seseorang, ditandai dengan kadar glukosa darah yang melebihi nilai normal (*hiperglikemia*) akibat tubuh kekurangan insulin baik absolut maupun relatif. Penyakit ini bersifat menahun (kronis). Penderitanya dari semua lapisan umur (Dalimartha, 2006).

Diabetes melitus terdiri dari beberapa macam yang masing-masing dapat diobati dengan cara tersendiri, yaitu (Poretsky, L., 2010):

A. Diabetes Melitus Tipe 1

Merupakan kondisi tidak terkontrolnya gula di dalam tubuh karena kerusakan sel beta pankreas sehingga mengakibatkan berkurangnya produksi insulin sepenuhnya. diabetes tipe 1 hanya dapat diobati dengan menggunakan insulin, dengan pengawasan yang teliti terhadap tingkat glukosa darah melalui alat monitor pengujian darah. Penekanan juga diberikan pada penyesuaian gaya hidup (diet dan olahraga) (Poretsky, L., 2010).

B. Diabetes Melitus Tipe 2

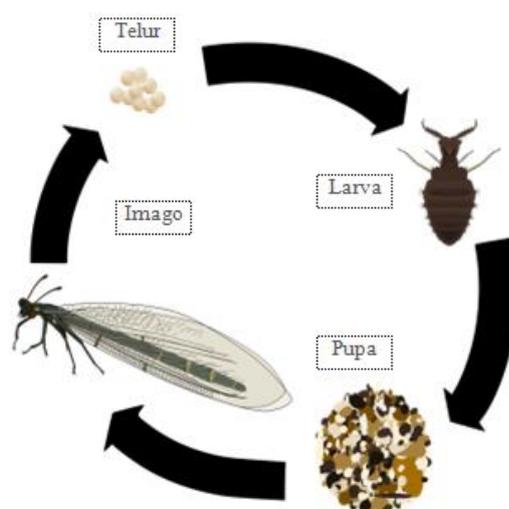
Diabetes melitus tipe 2 merupakan kondisi saat gula darah dalam tubuh tidak terkontrol akibat gangguan sensitivitas sel beta pankreas untuk menghasilkan hormon insulin yang berperan sebagai pengontrol kadar gula darah dalam tubuh. Diabetes melitus tipe 2 bukan disebabkan kurangnya sekresi insulin, tetapi ketidakmampuan sel target insulin untuk merespon hormon insulin secara normal sehingga gula darah tidak dapat masuk ke dalam sel. Pada penderita diabetes melitus tipe 2 terjadi sekresi insulin dan produksi glukosa darah yang berlebihan. Hal yang membedakan dengan diabetes melitus tipe 1 adalah tidak terjadi kerusakan sel beta langerhans secara autoimun (Poretsky, L., 2010).

2.5 Undur-undur (*myrmeleon sp.*)

Undur-undur (*myrmeleon sp.*) diklasifikasikan sebagai berikut (Subagja, 2013):

Kerajaan	: Animalia
Divisi	: Magnoliopytha
Kelas	: Insecta
Ordo	: Neuroptera
Famili	: Myrmeleontidae
Genus	: <i>Myrmeleon</i>
Spesies	: <i>Myrmeleon sp.</i>

Undur-undur (*myrmeleon sp.*) termasuk dalam golongan holometabola (serangga yang mengalami metamorfosis sempurna). Tahapan metamorfosisnya adalah telur, larva, pupa, dan menjadi imago seperti ditunjukkan pada Gambar 2.5 (Subagja, 2013).



Gambar 2.5. Metamorfosis undur-undur (Subagja, 2013)

Undur-undur (*myrmeleon sp.*) memiliki kondisi dan lingkungan hidup yang terpilih bukan sembarangan. Undur-undur (*myrmeleon sp.*) lebih memilih tempat hidup di tanah yang kering dan terlindungi dari sinar matahari secara langsung daripada tanah basah. Suhu optimal undur-undur (*myrmeleon sp.*) adalah 27 °C, dengan kelembaban udara di sekitar undur-undur (*myrmeleon sp.*) adalah 55-56%. Oleh sebab itu, tidak heran apabila hewan yang satu ini membutuhkan waktu yang cukup lama dalam menemukan tempat yang cocok dan menggali lubang untuk bersarang. Sebab, apabila tidak cocok undur-undur (*myrmeleon sp.*) akan sulit bertahan hidup (Subagja, 2013).

Menurut Djarubito (1998), kekuatan hidup undur-undur (*myrmeleon sp.*) di tempat terbuka (bukan di tanah gembur) dapat bertahan selama 2 hari. Apabila disediakan tanah gembur maka akan bertahan hidup cukup lama (1-3 tahun). Kemudian diberi bubuk roti sebagai makanannya.

Undur-undur (*myrmeleon sp.*) menjadi terkenal karena memang sangat baik digunakan sebagai obat kesehatan alternatif. Diantara penyakit yang dapat

disembuhkan oleh undur-undur adalah diabetes (dengan menurunkan kadar gula darah penderita) (Penny, 1997). Hal ini juga diperkuat dengan penelitian yang dilakukan Tyas Kurniasih dari UGM Yogyakarta (2006).

Penny (1997) mengungkapkan bahwa, undur-undur (*myrmeleon sp.*) sejak lama dikenal oleh masyarakat Tiongkok sebagai obat diabetes. Biasanya undur-undur mentah dimasukkan ke dalam kapsul atau dicampur bahan herbal lain, kemudian ditelan. Cara pengobatan alternatif ini sekarang mulai dicari oleh pasien diabetes karena lebih terjangkau harganya. Hewan ini tidak mudah mati meskipun dikirim ke luar kota. Dalam kondisi tertutup dalam plastik, undur-undur tetap hidup, dengan syarat ada pasir dan semut. Akan tetapi, apabila terkena air, khasiatnya akan hilang. Selain itu, undur-undur juga tidak boleh dimakan dalam keadaan mati. Untuk kemudahan mengkonsumsi undur-undur hidup, pasien dapat memasukkan ke dalam kapsul kosong, kemudian dimakan dengan dorongan air.

Efek samping jika memakan hewan ini secara berlebihan umumnya ringan dan frekuensinya rendah. Efek samping tersebut di antaranya adalah gejala saluran cerna, seperti mual, muntah, dan diare. Gangguan saluran cerna dapat berkurang dengan mengurangi dosis, menelan obat bersama makanan, atau membagi obat dalam beberapa dosis. Gejala *hematologic* termasuk *trombositopenia*, *leukopenia*, *agranulositosis*, dan anemia *aplastik* dapat terjadi, tetapi jarang sekali. Selain itu juga dapat menyebabkan hiplogikemia (kadar gula darah <60%) apabila dosis tidak tepat atau diet terlalu ketat (Siswandono dan Soekarjo, 1995).

Ada beberapa cara penggunaan undur-undur (*myrmeleon sp.*) sebagai obat diabetes. Diantaranya sebagai berikut (Subagja, 2013):

- a. Dibuat jus, dengan cara memblender campuran 3-5 ekor undur-undur (*myrmeleon sp.*) dan satu buah pisang dengan sedikit air, kemudian diminum 2x dalam satu minggu.
- b. Diminum langsung, dengan cara mencuci 3-5 ekor undur-undur (*myrmeleon sp.*) kemudian memasukkannya dalam gelas berisi air minum dan air tersebut dapat langsung diminum.
- c. Dimasukkan dalam kapsul, dengan cara memasukkan undur-undur (*myrmeleon sp.*) yang sudah bersih dalam kapsul kosong kemudian dapat langsung diminum.

2.6 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa campuran dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Pada prinsipnya metode maserasi adalah terdapat waktu kontak yang cukup antara pelarut dengan bahan yang diekstrak, akan tetapi jarang sekali mencapai pemisahan yang sempurna karena senyawa yang sama bisa terdapat dalam beberapa fraksi. Hasil maserasi maksimal biasanya dilakukan dengan maserasi menggunakan sederetan pelarut atau metode *Charauxs-Paris* yaitu metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang berbeda kepolaran, dimana ekstrak pekat pelarut polar diekstraksi kembali dengan pelarut semipolar dan pelarut non polar (Kusnaeni, 2008).

Maserasi merupakan cara ekstraksi yang sederhana, dilakukan dengan cara merendam bahan simplisia dalam cairan pengestrak. Cairan pengestrak akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan

konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat di desak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel (Octavia, 2009).

Pada ekstraksi dengan maserasi, perlu dilakukan pengadukan. Pengadukan diperlukan untuk meningkatkan kontak antara pelarut dengan sampel simplisia (Octavia, 2009).

2.7 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

2.7.1 Kromatografi

Kromatografi merupakan suatu metoda pemisahan dimana komponen-komponen yang akan dipisahkan terdistribusikan di antara dua fase. Pertama fase diam, karena amobil dalam kolom dan kedua fase gerak, karena harus mengalir keluar dari kolom. Fase yang digunakan dipilih sedemikian rupa sehingga komponen sampel memiliki kelarutan yang berbeda pada setiap fase. Perbedaan migrasi atau perpindahan dari senyawa menyebabkan senyawa tersebut dapat dipisahkan. Kromatografi menjadi salah satu metode analisis utama untuk identifikasi dan kuantifikasi senyawa-senyawa dalam bentuk gas maupun cair. Dari semua teknik analisis instrumen, prosedur hidrodinamik ini menjadi salah satu teknik dengan aplikasi yang luas. Kromatografi menempati posisi yang dominan, karena semua laboratorium dapat melakukan analisis molekular (Rouessac, F dan Rouessac, A., 2007).

2.7.2 KCKT

Semua teknik kromatografi menggunakan fase gerak berupa cairan, dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah yang paling dikenal. Dalam

bidangnya, KCKT ini hampir sama dengan *gas chromatography* (GC), hanya saja pada KCKT dapat ditambahkan untuk melakukan analisis beberapa senyawa yang termolabil atau sangat polar dan juga pada senyawa dengan berat molekul yang tinggi. Keberhasilan suatu analisis juga sangat dipengaruhi oleh ketepatan kromatografer dalam memilih dan menggunakan kolom dan komposisi fase gerak untuk mendapatkan nilai selektivitas yang besar sehingga interaksi antara analit, fase diam dan fase gerak dapat maksimal. Meskipun efisiensi kolom KCKT lebih rendah apabila dibandingkan dengan GC, akan tetapi dengan fase diam baru yang dapat digunakan pada beberapa mode seperti pasangan ion atau peningkatan interaksi hidrofobik, sangat memungkinkan untuk penggunaan lebih lanjut pada KCKT. Apalagi pada akhirnya telah ada teknik miniaturisasi (nanokromatografi) yang mana memfasilitasi hubungan kerja KCKT dengan *mass spectrometry* (MS) menjadi LC-MS (Rouessac, F dan Rouessac, A., 2007).

Pada KCKT, sampel cair atau sampel padat dilarutkan dengan pelarut yang sesuai kemudian dialirkan pada kolom kromatografi dengan fase gerak cair. Kromatografi cair-cair didasarkan pada konsep koefisien partisi, yaitu setiap analit terpartisi diantara dua pelarut '*immiscible*' (yang tidak saling melarutkan). Satu pelarut dibuat '*immobile*' (cairan yang disokong dengan padatan) dan yang satunya dibuat '*mobile*' (Rouessac, F dan Rouessac, A., 2007).

2.7.3 Kolom KCKT

KCKT biasanya terdiri dari dua kolom: kolom analitis (yang bertanggung jawab atas pemisahan) dan kolom *guard*. Kolom *guard* ditempatkan sebelum kolom analitis, yang berfungsi melindungi dari kontaminasi (Skoog, 2004).

Kolom analitis yang paling umum digunakan untuk KCKT terbuat dari *stainless steel* dengan diameter dalam antara 2,1 mm dan 4,6 mm dan panjang mulai dari sekitar 30 mm sampai 300 mm. Kolom yang mempunyai panjang 25 cm dengan 50.000 plat/m memiliki 12.500 plat teoritis (Skoog, 2004).

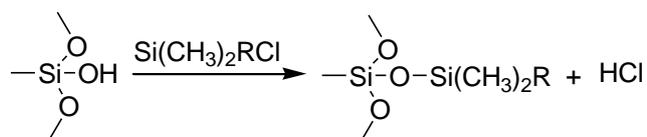
Mikrokolom menggunakan fase gerak yang lebih sedikit dan oleh karena itu sampel diencerkan pada tingkat konsentrasi yang rendah untuk dapat menghasilkan sinyal yang lebih besar pada detektor. Kolom ini terbuat dari kapiler silika *fused* dengan diameter dalam 44-200 μm dan panjang hingga beberapa meter. Mikrokolom dikemas dengan partikel 3-5 μm dan disusun dengan efisiensi kolom yang mencapai 250.000 pelat teoritis (Skoog, 2004)..

Dua masalah yang cenderung dapat mempersingkat masa kolom yaitu pertama, analit terikat kuat (irreversibel) dengan fase diam, sehingga dapat mengurangi kinerja kolom dengan mengurangi fase diam yang tersedia. Kedua, adanya materi partikulat yang diinjeksikan bersama dengan sampel dapat menyumbat kolom. Untuk meminimalkan masalah ini, kolom *guard* ditempatkan sebelum kolom analitis. Kolom *guard* biasanya berisi materi partikulat kemasan yang sama dan fase diam seperti pada kolom analitik, akan tetapi secara signifikan lebih pendek dan lebih murah (panjang 7,5 mm dan biaya 1/10 dari kolom analitis). Kolom *guard* harus diganti secara teratur, karena sangat dimungkinkan dalam sekali penggunaan kolom *guard* akan mengalami kerusakan (Skoog, 2004).

2.7.4 Fase Diam

Pada kromatografi cair-cair, fase diam adalah berupa cairan yang disokong dengan padatan, sehingga ketika di dalam kolom tidak ikut terelusi bersama fase gerak. Akan tetapi kemungkinan adanya fase diam yang ikut terelusi

bersama fase gerak tetap ada sehingga menyebabkan fase diam “bergerak mengalir” melalui kolom dari waktu ke waktu. Untuk mencegah hilangnya fase diam, maka dibuat ikatan kovalen pada partikel silika. Ikatan fase diam terbentuk dengan mereaksikan partikel silika dengan organoklorosilan (bentuk umum $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{RCl}$), dengan R adalah alkil atau gugus alkil tersubstitusi seperti pada Gambar 2.6 (Harvey, 2000).



Gambar 2.6. Reaksi silika dengan organoklorosilan

Teknik untuk mencegah interaksi yang tidak diinginkan antara analit dengan kelompok ---SiOH (stabil) adalah dengan membatasi jumlah dari partikel silika yaitu dengan cara mereaksikan partikel silika dengan $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$, seperti pada kolom-kolom yang diberi nama *end-capped* (Harvey, 2000).

Sifat dari fase diam ditentukan oleh sifat dari gugus alkil organosilan ini. Apabila R adalah gugus fungsi polar, maka fase diam akan bersifat polar. Contoh fase diam polar yaitu apabila R terdiri dari gugus fungsi siano ($-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$), diol ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$), atau amino ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$). Ketika fase diam bersifat polar, maka fase gerak bersifat non polar atau semi polar. Kombinasi dari fase diam polar dan fase gerak non polar disebut dengan kromatografi fase normal (*normal-phases chromatography*) (Harvey, 2000).

Pada kromatografi fase terbalik (*reverse-phases chromatography*) yang mana merupakan kromatografi yang lebih umum ditemui pada bentuk KCKT, fase diamnya bersifat non polar dan fase gerak bersifat polar. Fase diam non polar yang paling umum sering digunakan yaitu organoklorosilane dengan R terdiri dari

kelompok n-oktil (C_8) atau rantai hidrokarbon n-oktildesil (C_{18}). Beberapa pemisahan dengan fase terbalik menggunakan larutan penyangga sebagai fase gerak polar, karena substrat silika adalah subjek untuk hidrolisis dalam larutan dasar, pH fase gerak harus kurang dari 7,5 (Harvey, 2000).

2.7.5 Fase Gerak

Urutan elusi analit pada KCKT diatur oleh polaritas. Pada pemisahan fase normal analit paling non polar menghabiskan waktu interaksi paling sedikit dengan fase diam (polar) dan menjadi analit yang terelusi pertama dari kolom. Waktu retensi diatur dengan memilih fase gerak yang digunakan, dengan fase gerak yang non polar maka waktu retensi akan lebih lama. Jika misalnya, terjadi pemisahan yang lemah karena analit terelusi sangat cepat, beralih pada fase gerak yang kurang polar maka waktu retensi akan lebih lama dan lebih banyak kesempatan untuk terjadi pemisahan. Ketika hanya dua analit yang akan dipisahkan, maka beralih pada fase gerak yang lebih polar dapat memberikan waktu pemisahan yang lebih pendek/cepat (Harvey, 2000).

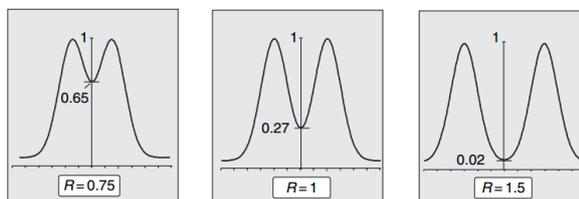
Pada pemisahan fase terbalik, proses elusi dibalik dengan analit yang paling polar menjadi yang pertama terelusi. Meningkatkan polaritas fase gerak menyebabkan waktu retensi lebih lama, sedangkan waktu retensi lebih pendek membutuhkan fase gerak dengan polaritas yang rendah (Harvey, 2000).

2.7.6 Parameter kromatografi

2.7.6.1 Resolusi (R_s)

Hal yang paling penting dalam KCKT adalah untuk mendapatkan resolusi yang optimal dalam waktu yang minimum. Nilai resolusi 1,5

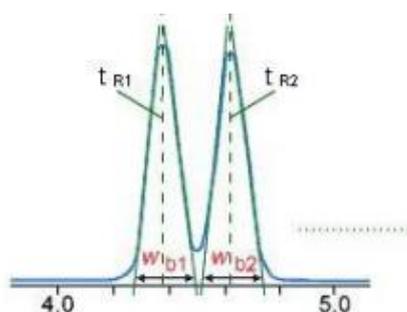
menunjukkan bahwa antara dua puncak komponen sampel dapat terpisah dengan baik, seperti pada Gambar 2.7 (Harvey, 2000).



Gambar 2.7. Contoh profil kromatogram dengan beberapa nilai faktor resolusi (R_s)

Penentuan nilai resolusi menggunakan Persamaan 2.1, yang mana t_{R1} merupakan waktu yang diperlukan oleh analit ketika mulai diinjeksikan sampai keluar pertama kali dari kolom (puncak pertama). Sedangkan t_{R2} menunjukkan waktu yang diperlukan oleh analit ketika mulai diinjeksikan sampai keluar dari kolom dengan urutan kedua (puncak kedua), seperti ditunjukkan pada Gambar 2.8 (Harvey, 2000).

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_{b1} + W_{b2})/2} = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b1} + W_{b2})} \quad \text{Persamaan 2.1}$$



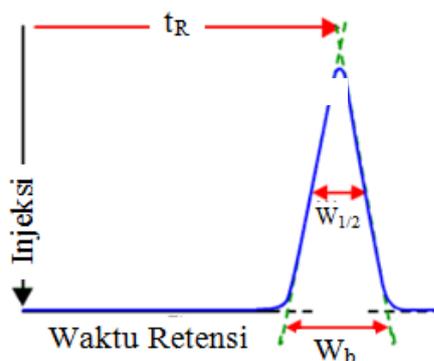
Gambar 2.8. Perhitungan Resolusi (R_s) Kromatografi

2.7.6.2 Jumlah Plat Teori (N)

Jumlah plat teori yang dapat dihitung menggunakan Persamaan 2.2 menunjukkan ukuran dispersi puncak pada kolom KCKT, yang mencerminkan kinerja dari kolom. Setiap lempeng/plat adalah jarak dimana komponen sampel

mencapai satu kesetimbangan antara fase diam dan fase gerak. Semakin banyak kesetimbangan yang terjadi, maka jumlah plat teoritis akan semakin besar, dan kualitas pemisahan akan menjadi lebih baik (Harvey, 2000).

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad \text{Persamaan 2.2}$$



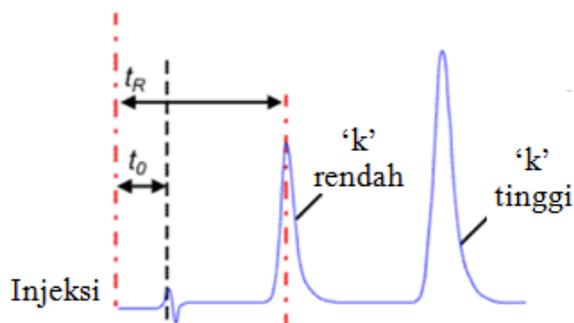
Gambar 2.9. Penentuan Jumlah Plat Teori (N)

2.7.6.3 Faktor Kapasitas (k')

Faktor kapasitas adalah sarana untuk mengukur waktu retensi analit pada kolom kromatografi sesuai dengan Persamaan 2.3 (Harvey, 2000).

$$k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad \text{Persamaan 2.3}$$

Nilai k' yang tinggi menunjukkan bahwa sampel sangat ditahan dan telah menghabiskan banyak waktu berinteraksi dengan fase diam, dengan ilustrasi seperti pada Gambar 2.10. Nilai k' optimum berada pada rentang 1-10, yang mana menunjukkan bahwa waktu berinteraksi sampel dengan kolom adalah maksimum. Cara untuk menentukan t_0 (*void volume*) yaitu waktu gangguan awal terlihat (puncak kaget), yang disebabkan karena perbedaan absorbansi atau indeks bias pelarut yang diinjeksikan ketika melalui detektor (Harvey, 2000).



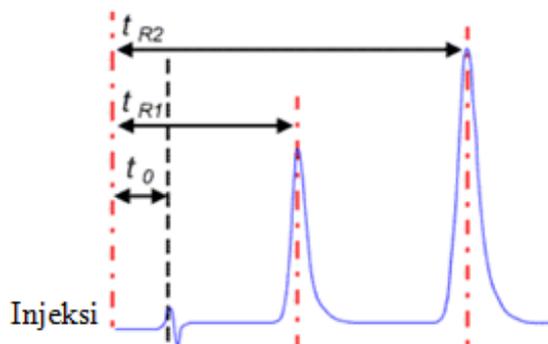
Gambar 2.10. Contoh kromatogram dengan faktor kapasitas (k') rendah dan tinggi

2.7.6.4 Selektivitas (α)

Faktor selektivitas atau faktor pemisahan adalah kemampuan dari sistem kromatografi untuk membedakan komponen-komponen kimia sampel. Faktor selektivitas biasanya diukur sebagai perbandingan antara faktor kapasitas (k') dari dua puncak yang bersangkutan sebagaimana ditunjukkan pada Persamaan 2.4 dan Gambar 2.11 (Harvey, 2000).

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad \text{Persamaan 2.4}$$

Apabila nilai α adalah satu maka berarti dua puncak dari komponen senyawa dalam sampel tidak dapat dipisahkan, kemudian nilai α lebih besar dari satu menunjukkan bahwa komponen senyawa pertama lebih cepat terelusi dari komponen senyawa kedua. Selanjutnya, dua komponen senyawa dapat dikatakan terpisah dengan baik apabila menunjukkan nilai α yang besar (Harvey, 2000).

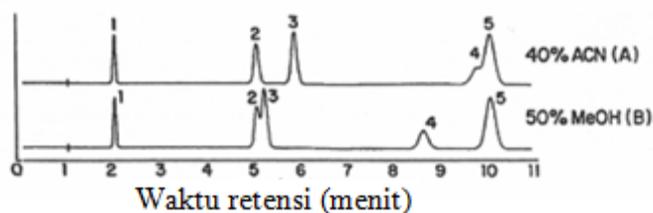


Gambar 2.11. Penentuan selektivitas (α)

Beberapa parameter yang dapat mempengaruhi selektivitas dalam metode KCKT fase terbalik yaitu (Skoog, 2004):

a) Jenis pelarut organik

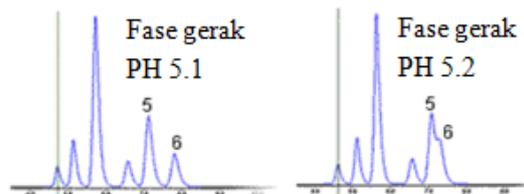
Berdasarkan Gambar 2.12 dapat dilihat bahwa meskipun waktu analisis keseluruhan adalah sama, selektivitas pemisahan antara puncak 2 dan 3 dan puncak 4 dan 5 berbeda ketika metanol diganti dengan asetonitril (Skoog, 2004).



Gambar 2.12. Pengaruh jenis pelarut organik terhadap selektivitas kromatogram metode KCKT fase terbalik

b) pH fase gerak

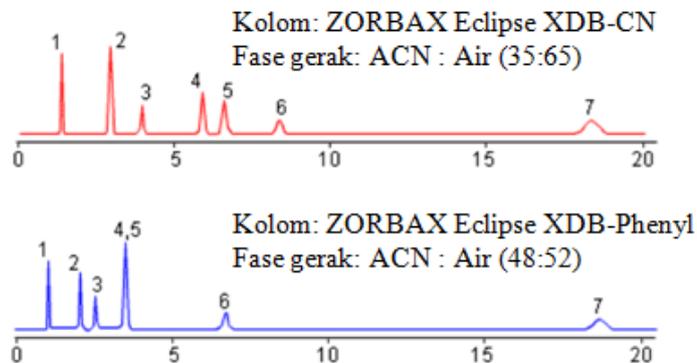
Pemisahan metode KCKT fase terbalik pada Gambar 2.13 menunjukkan bahwa, analit asam pada kolom C8 terlihat jelas bahwa pada perubahan pH 0,1 unit, dapat membawa perubahan besar dalam selektivitas antara puncak 5 dan 6. pH fase gerak biasanya menjadi parameter kunci untuk mengoptimalkan selektivitas, terutama ketika berkaitan dengan molekul analit yang memiliki kelompok terionisasi. Perubahan pH fase gerak harus dilakukan dengan hati-hati karena tidak semua kolom KCKT berbasis silika yang tahan terhadap perubahan pH secara ekstrim (Skoog, 2004).



Gambar 2.13. Pengaruh perubahan pH fase gerak terhadap selektivitas kromatogram metode KCKT fase terbalik dengan analit bersifat asam dan kolom C8

c) Jenis Fase diam

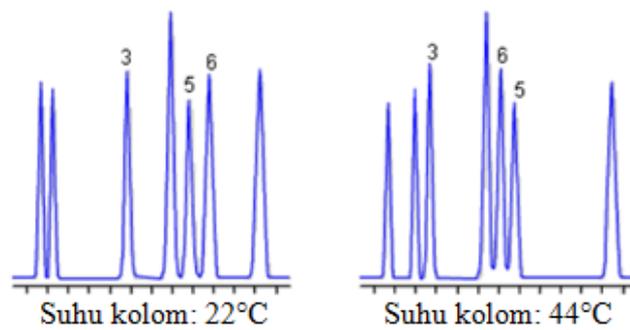
Mengubah kolom fase diam dapat mempengaruhi selektivitas dari pemisahan seperti ditunjukkan pada Gambar 2.14. Hidrofobisitas, polaritas, dan sifat dari silika, semuanya mempunyai peran penting dalam proses interaksi fisikokimia dengan analit. Memilih fase diam yang benar adalah di antara pilihan yang paling penting ketika akan melakukan pengembangan metode (Skoog, 2004).



Gambar 2.14. Kromatogram yang menunjukkan perubahan selektivitas pemisahan yang disebabkan karena perubahan sifat kimia fase diam pada metode KCKT fase terbalik

d) Suhu kolom

Suhu kolom yang digunakan dalam Gambar 2.15 dapat mengubah selektivitas pemisahan yang mana puncak 5 dan 6 telah bertukar karena penyesuaian suhu (Skoog, 2004).

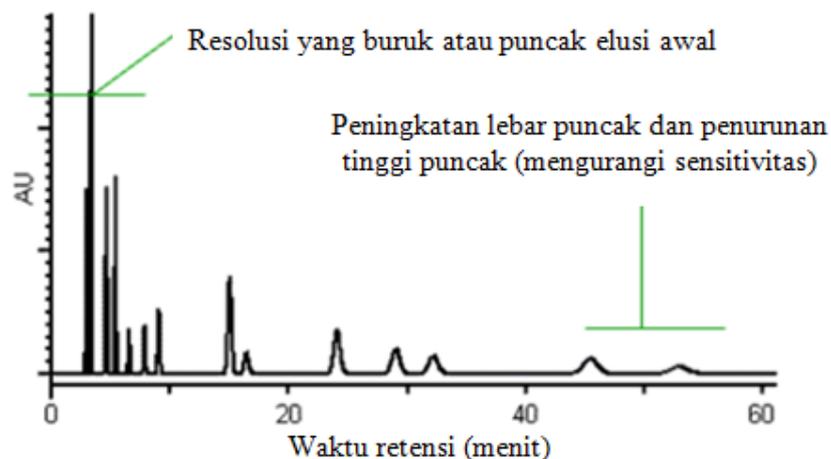


Gambar 2.15. Kromatogram yang menunjukkan perubahan selektivitas pemisahan yang disebabkan karena perbedaan suhu kolom yang digunakan pada metode KCKT fase terbalik

2.7.7 Elusi Isokratik

Metode isokratik adalah metode elusi ketika komponen fase gerak tidak berubah selama analisis (komposisi konstan). Beberapa potensi masalah yang berhubungan dengan analisis isokratik sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2.16, yaitu (Harvey, 2000):

- a. Ketika beberapa analit dengan polaritas yang luas, dimungkinkan sulit untuk dapat dipertahankan berinteraksi di dalam kolom dan resolusi antar puncak kromatogram sangat kecil ($< 1,5$) atau dekat dengan puncak kaget (t_0).
- b. Komponen analit lain yang mungkin lebih bersifat hidrofobik akan menunjukkan waktu retensi yang lama (yang mengakibatkan nilai k' tidak optimum: > 10)
- c. Beberapa proses *band-broadening*, mengakibatkan terjadinya pelebaran puncak atau penurunan tinggi puncak (mengurangi sensitivitas).
- d. Ada kemungkinan bahwa beberapa komponen akan irreversibel terabsorpsi pada kolom (komponen yang sangat dipertahankan) dan menyebabkan kontaminasi kolom.



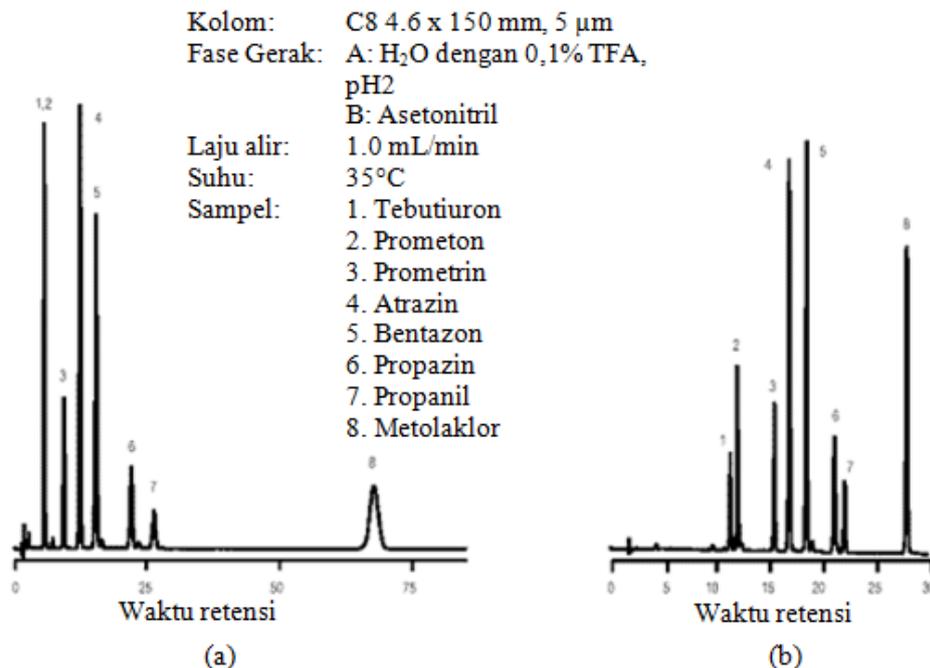
Gambar 2.16. Profil kromatogram yang menunjukkan potensi masalah yang dihadapi dengan metode elusi isokratik KCKT

2.7.8 Elusi Gradien

Metode gradien adalah metode elusi dengan komposisi fase gerak diubah selama proses analisis (biasanya dengan meningkatkan jumlah pelarut organik).

Adapun tahapan untuk elusi gradien adalah sebagai berikut (Harvey, 2000):

- 1) Komposisi awal dipilih dengan komposisi yang dapat mempertahankan analit dengan kuat di dalam kolom, sehingga dapat menghindari adanya puncak yang keluar pada daerah puncak kaget (t_0).
- 2) Kekuatan elusi kemudian ditingkatkan dengan cara yang telah ditentukan untuk mengelusi senyawa analit dengan resolusi yang optimum.
- 3) Komposisi fase gerak akhir, dipilih untuk memastikan semua senyawa dapat terelusi dari kolom dengan waktu retensi yang wajar (komposisi pelarut organik ditingkatkan), sehingga dapat sekaligus mencuci kolom dari komponen yang berpotensi sebagai pencemar.



Gambar 2.17. Kromatogram Hasil Pemisahan Herbisida pada kolom C8 (a) sistem elusi isokratik air:asetonitril (70:30), (b) sistem elusi gradien (20-60% asetonitril) untuk memisahkan sampel dengan tingkat polaritas yang bervariasi

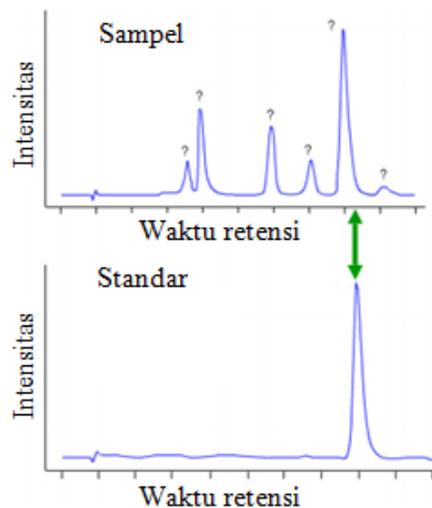
Gambar 2.17 menunjukkan hasil pemisahan herbisida dengan menggunakan sistem elusi gradien membutuhkan waktu retensi yang lebih cepat dan sensitivitas yang lebih bagus dibandingkan dengan menggunakan sistem elusi isokratik.

2.8 Metode Analisis Kualitatif dan Kuantitatif KCKT

2.8.1 Analisis Kualitatif

2.8.1.1 Identifikasi puncak berdasarkan waktu retensi standar

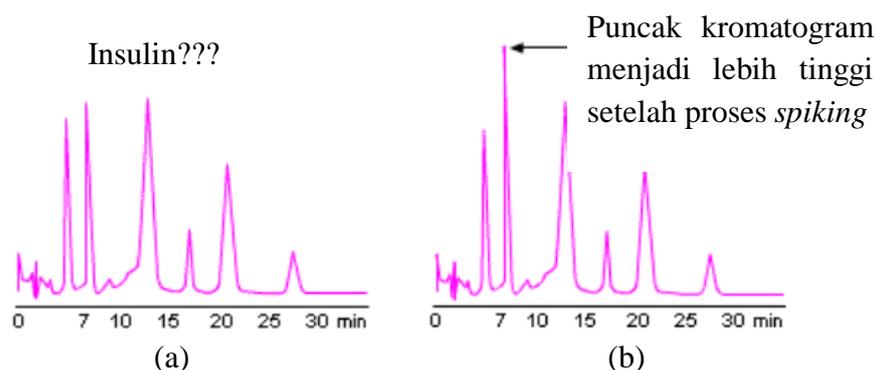
Cara yang paling mudah untuk menetapkan puncak kromatogram dalam larutan sampel adalah dengan menyuntikkan larutan standar dalam kondisi pemisahan yang sama. Kemudian membandingkan waktu retensi larutan standar yang sesuai dengan waktu retensi larutan sampel seperti pada Gambar 2.18 (Harvey, 2000).



Gambar 2.18. Identifikasi puncak sampel berbasis kesamaan waktu retensi zat standar

2.8.1.2 *Spiking* sampel

Teknik '*spiking*' sampel melibatkan penambahan bahan standar referensi yang sudah diketahui ke dalam larutan sampel, untuk mengkonfirmasi identitas salah satu puncak komponen sampel. Pada Gambar 2.19, salah satu puncak pada sampel diduga adalah insulin. Kemudian sampel ditambah dengan insulin (standar) dengan konsentrasi yang diperkirakan sama dengan dugaan konsentrasi insulin dalam sampel. Jika salah satu puncak dalam kromatogram sampel (dengan waktu retensi yang sama dengan waktu retensi standar insulin) bertambah tinggi, maka puncak tersebut adalah benar sebagai puncak dari insulin (Harvey, 2000).



Gambar 2.19. (a) Kromatogram Sampel (b) Kromatogram *spiking* sampel

2.8.1.3 Menggunakan detektor selektif dan spektrometer

Penggunaan detektor selektif dan spektrometer dapat meningkatkan analisis kualitatif. Sistem detektor seperti *Dioda Array UV Spektrometer* atau *Mass Spectrometers* (MS) yang dapat merekam spektrum untuk masing-masing puncak dalam kromatogram sampel (Harvey, 2000).

2.8.2 Analisis Kuantitatif

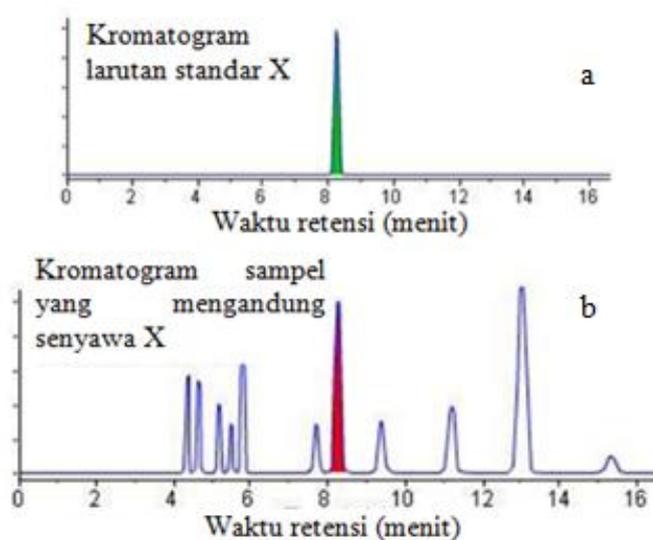
2.8.2.1 Standar Eksternal

Standar eksternal adalah prosedur kuantifikasi yang dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar dan larutan sampel pada kondisi pemisahan yang sama seperti pada Gambar 2.20, kemudian dihitung faktor respon dari standar eksternal dengan menggunakan persamaan 2.5 (Harvey, 2000).

$$Faktor\ respon = \frac{Area_{standar}}{Konsentrasi_{standar}} \quad \text{Persamaan 2.5}$$

Setelah diketahui nilai faktor respon, selanjutnya dapat dihitung kadar analit dalam larutan sampel sesuai dengan Persamaan 2.6 (Harvey, 2000).

$$Konsentrasi\ analit = \frac{Area_{analit\ dalam\ sampel}}{Faktor\ respon} \quad \text{Persamaan 2.6}$$



Gambar 2.20. (a) Kromatogram standar eksternal, (b) Kromatogram sampel

2.8.2.2 Standar Internal

Metode standar internal merupakan prosedur kuantifikasi yang dilakukan dengan menambahkan senyawa lain dalam sampel yang mempunyai sifat kimia tidak sama dengan analit dan tidak mengganggu puncak analit maupun senyawa-senyawa lain, tidak terkandung dalam sampel, memiliki kemiripan sifat dengan analit dalam tahapan penyiapan sampel, dalam bentuk yang murni dan mempunyai respon detektor yang hampir sama dengan analit pada konsentrasi yang digunakan, dengan prinsip umum seperti pada Gambar 2.21. Persamaan 2.7 dan 2.8 menunjukkan cara kuantifikasi analit dalam sampel dengan metode standar internal *single level calibration* (Harvey, 2000).

$$\text{Faktor respon internal} = \frac{\text{Area}_{std.internal} \times \text{Konsentrasi analit dalam sampel}}{\text{Konsentrasi}_{std.internal} \times \text{Area analit dalam sampel}}$$

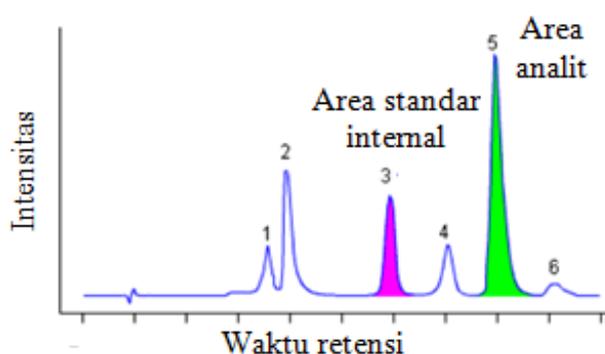
Persamaan 2.7

Konsentrasi analit dalam sampel

$$= \frac{\text{Konsentrasi}_{std.internal} \times \text{Area analit dalam sampel} \times \text{Faktor respon internal}}{\text{Area}_{std.internal}}$$

Persamaan 2.8

Fungsi dari penambahan standar internal adalah untuk mengetahui konsentrasi yang sesungguhnya dari analit karena analit dalam sampel selalu bersama dengan senyawa lain. Standar internal yang ditambahkan dalam sampel biasanya berada pada konsentrasi sepertiga sampai setengah (0,3-0,5) dari perkiraan konsentrasi maksimum analit dalam sampel. Hal tersebut sangat penting, terutama ketika menggunakan detektor MS untuk memastikan standar internal tidak mengganggu proses ionisasi dari molekul analit (Harvey, 2000).



Gambar 2.21. Kromatogram sampel yang mengandung standar internal

2.8.2.3 Spiking

Selain digunakan dalam analisis kualitatif, metode spiking juga dapat digunakan dalam analisis kuantitatif pada KCKT dengan profil kromatogram seperti pada Gambar 2.19. Penentuan konsentrasi analit dalam sampel dengan metode spiking dihitung menggunakan persamaan 2.9 (Harris, D.C., 1948).

$$\frac{C_s}{C_{std}} = \frac{A_s}{A_{std}} \quad \text{Persamaan 2.9}$$

Simbol C_s menunjukkan konsentrasi analit dalam sampel dan C_{std} adalah konsentrasi standar yang ditambahkan dalam sampel, kemudian A_s adalah luas area kromatogram analit dalam sampel dan A_{std} merupakan luas area zat standar. Luas area analit (A_s) akan bertambah setelah penambahan zat standar, sehingga

dapat diketahui bahwa luas area zat standar (A_{std}) merupakan hasil pengurangan dari luas area total kromatogram analit dalam sampel yang sudah ditambah (*dispike*) dengan larutan standar (A_{total}) dengan A_s , sebagaimana ditunjukkan pada Persamaan 2.10.

$$A_{std} = A_{total} - A_s \quad \text{Persamaan 2.10}$$

Sehingga, Persamaan 2.9 dapat diturunkan menjadi Persamaan 2.11 berikut:

$$\frac{C_s}{C_{std}} = \frac{A_s}{A_{total} - A_s}$$

$$C_s = C_{std} \times \frac{A_s}{A_{total} - A_s} \quad \text{Persamaan 2.11}$$

2.9 Teknik analisis metformin menggunakan KCKT

Penelitian yang berkaitan dengan analisis metformin hidroklorid menggunakan KCKT telah dilakukan oleh beberapa peneliti, diantaranya yaitu oleh Ranetti, M.C. *et al.* pada tahun 2009 dengan sampel plasma darah manusia. Metode KCKT yang digunakan yaitu metode standar internal (glibenklamid), dengan kondisi analisis sebagai berikut:

Fase gerak : Asetonitril:Air (1:1)

Volume sampel : 10 μ L

Laju alir : 1 mL/min

Kolom : Zorbax eclipse XBD-C18 150x4,6 mm

Suhu kolom : 40 °C

Detektor : UV 236 nm

Menggunakan kondisi analisis tersebut, metformin dapat terelusi pada waktu retensi 9 menit, dengan tingkat linieritas sebesar 0,99 (n=6) pada konsentrasi 0,05-5,00 µg/mL dan LOQ 50 ng/mL.

Selanjutnya, analisis metformin dengan menggunakan fase gerak campuran metanol dan air telah dilakukan oleh peneliti Sultana *et al.* (2013) dan peneliti Peraman, R. *et al.* (2014). Kondisi analisis metode KCKT beserta hasil yang diperoleh oleh masing-masing peneliti ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Metode dan hasil analisis metformin menggunakan fase gerak campuran metanol dan air

Peneliti	Metode KCKT						Hasil		
	Standar	Komposisi fase gerak	Volume sampel	Laju alir (mL/min)	Kolom	Detektor	Waktu retensi	Linieritas	LOD dan LOQ
Sultana <i>et al.</i> , 2013	Metformin	70:30	20 µL	1	RP-18 (250x4,6 mm)	UV 235 nm	2 menit	R ² = 0,998 (2,5-25 µg/mL)	LOD = 0,315 ng/mL LOQ = 0,95 /mL
Peraman, R. <i>et al.</i> , 2014	Metformin	45:55	20 µL	1	RP-18 (250x4,6 mm)	UV 265 nm	4,68 menit	R ² = 0,999 (100-750 µg/mL)	LOD = 0,464 µg/mL LOQ = 1,407 µg/mL

BAB III

KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep

Berdasarkan penelusuran lokasi yang telah dilakukan oleh badan kesehatan dunia, tingkat penderita diabetes semakin tahun terus meningkat, bahkan dapat mencapai 12,4 juta penderita pada tahun 2025. Sedangkan dari data Depkes, kuantitas penderita diabetes menempati posisi pertama dibandingkan dengan penyakit organ dalam yang lain. Permasalahan yang cukup signifikan tersebut membuat departemen kesehatan membentuk direktorat baru guna menangani penyakit tersebut (Maulana, 2015).

Selain itu, Menkes juga menegaskan bahwa jika permasalahan tersebut tidak diintervensikan dengan seksama, dapat menumbuhkan suatu problematika yang urgent sehingga akan sangat sulit untuk menanggulangnya. Dr. Sidhartawan Soegondo, menyampaikan bahwa untuk meminimalisir terjadinya peningkatan penderita diabetes dengan biaya yang terjangkau, maka diperlukan suatu tindakan pencegahan, yaitu pencegahan primer maupun sekunder (Maulana, 2015).

Pencegahan primer dapat dilakukan dengan berolahraga dan diet ketat terhadap berbagai makanan yang dilarang bagi penderita diabetes, sedangkan pencegahan sekunder melalui pemeriksaan rutin. Program ini memerlukan dana yang tidak sedikit, sehingga banyak orang yang beralih pada pengobatan alternatif maupun tradisional. Pengobatan alternatif dengan menggunakan akupuntur sedangkan untuk teknik pengobatan tradisional menggunakan kekayaan hewani maupun nabati (Maulana, 2015).

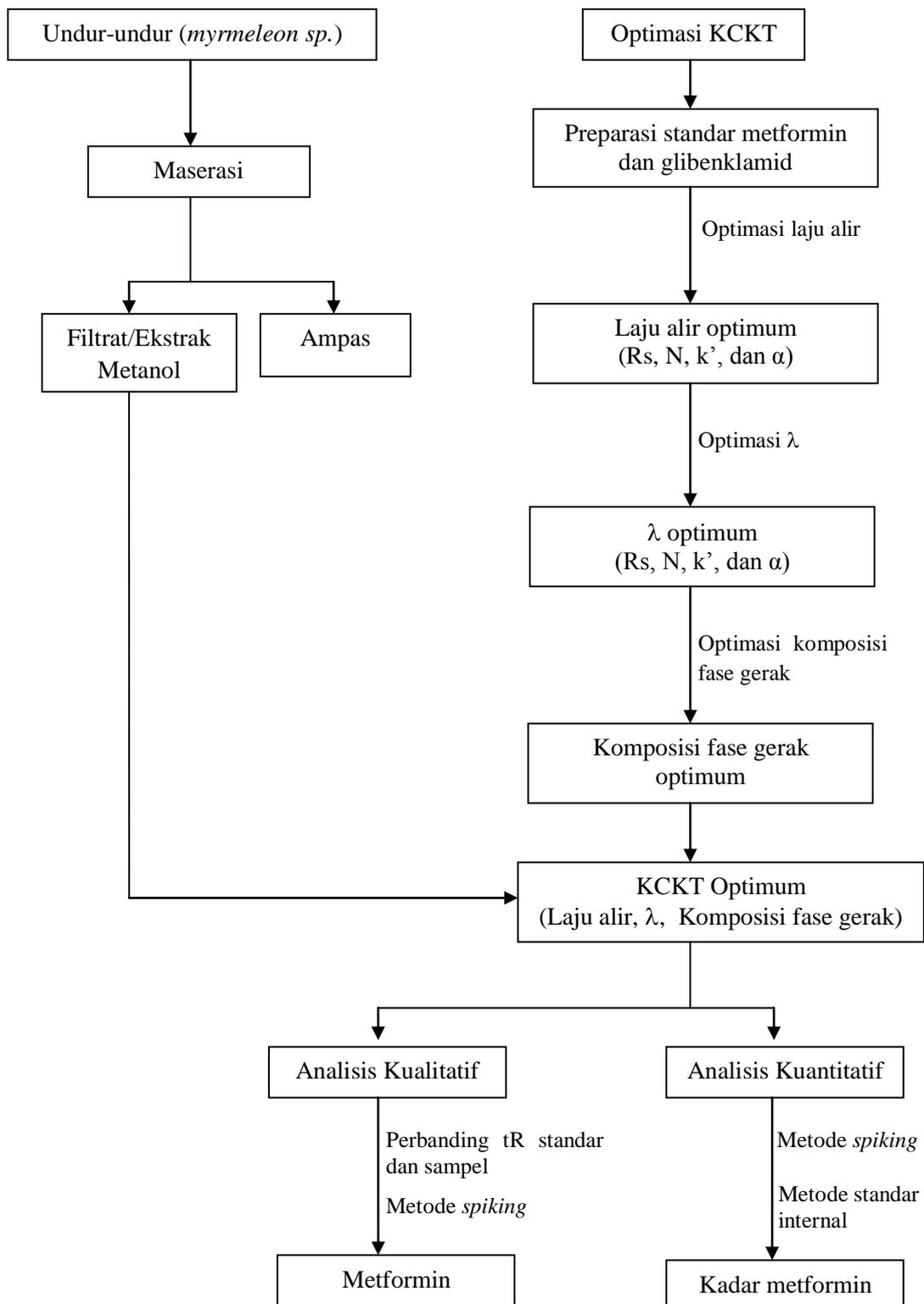
Undur-undur (*myrmeleon sp.*) merupakan hewan yang banyak ditemui di sekitar rumah penduduk. Secara langsung hewan ini seperti tidak mempunyai manfaat. Akan tetapi berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Kurniasih *et al.* (2006) dari Universitas Gajah Mada, undur-undur (*myrmeleon sp.*) mampu menurunkan kadar gula darah.

Beberapa senyawa penurun kadar gula darah yang sering digunakan dalam pembuatan obat sediaan untuk pengobatan awal diabetes yaitu metformin dan glibenklamid. Kombinasi senyawa metformin dan glibenklamid sangat cocok apabila digunakan dalam pengobatan pasien diabetes dengan hipoglikemia yang sulit terkontrol dengan terapi tunggal, olahraga maupun diet. Selain itu, kombinasi ini saling memperkuat sistem kerja dari masing-masing senyawa, sehingga penyesuaian kadar gula darah penderita diabetes dapat terkontrol dengan lebih baik. Kemudian, dengan melakukan kombinasi ini efek samping yang timbul menjadi lebih sedikit apabila dibandingkan dengan monoterapi. Metformin dapat mengurangi terjadinya kenaikan berat badan bagi pasien yang mengonsumsi glibenklamid (Satoskar, 2001).

Prinsip dari penelitian ini adalah ekstraksi senyawa metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan metode maserasi yang dilanjutkan dengan analisis kualitatif dan kuantitatif menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Analisis dilakukan melalui proses optimasi menggunakan beberapa parameter untuk mengetahui kondisi mana yang paling bagus untuk memisahkan senyawa metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*). Beberapa optimasi tersebut yaitu optimasi laju alir, optimasi panjang gelombang UV dan optimasi komposisi fase gerak. Berdasarkan optimasi parameter-parameter tersebut

diharapkan akan diperoleh kondisi paling optimal dalam memisahkan senyawa metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*).

3.2 Skema Konsep Penelitian



3.3 Hipotesis penelitian

1. Kondisi optimum metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang digunakan dalam analisis metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*) diharapkan diperoleh dengan kolom C-18 250Lx4,6 mm, laju alir 0,5 mL/min, komposisi fase gerak metanol : air (dengan kenaikan metanol 50-90%) dengan sistem elusi gradien pada daerah panjang gelombang UV 230-240 nm.
2. Kadar metformin yang terkandung dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) diharapkan bernilai tinggi, sehingga dengan mengkonsumsi 3-5 ekor undur-undur (*myrmeleon sp.*) per hari, sudah mencukupi dosis terapi yang diperlukan oleh penderita diabetes.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia lingkungan, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini akan dilakukan dalam jangka waktu 8 bulan, April-Desember 2016.

4.2 Bahan dan Alat

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan undur-undur (*myrmeleon sp.*) yang diambil dari Desa Kreet Kecamatan Srengat Kabupaten Blitar. Bahan kimia yang digunakan dalam ekstraksi maserasi adalah metanol (kelas KCKT). Bahan yang digunakan dalam pembuatan larutan standar adalah standar metformin (Sigma-Aldrich PHR 1084), standar glibenklamid (Sigma-Aldrich G0639) dan metanol (kelas KCKT). Kemudian bahan yang digunakan dalam proses analisis metformin dari undur-undur (*myemeleon sp.*) yaitu metanol (kelas KCKT) dan air (kelas KCKT).

4.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi neraca analitik, labu takar, corong gelas, gelas beaker, cawan penumbuk (mortar), sonikator, pengaduk kaca, pipet mikro, *yellow tip*, gelas arloji, botol semprot, spuit 1 cc, kertas saring *whatman*, kertas saring mikron 0,45 μm dan seperangkat instrumen kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) Shimadzu RP-18 VP-ODS 250L x 4,6 mm dengan detektor UV.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel
2. Pembuatan larutan standar metformin 6 ppm dan glibenklamid 3 ppm
3. Optimasi metode
 - a) Penentuan laju alir yang optimum
 - b) Penentuan panjang gelombang UV yang optimum
 - c) Penentuan komposisi fase gerak metanol:air optimum
4. Penentuan keberadaan metformin dari ekstrak metanol undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan metode perbandingan data waktu retensi (standar dan sampel) dan metode *spiking*
5. Pengukuran kadar metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan metode *spiking* dan metode standar internal.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Preparasi Sampel

Hewan undur-undur (*myrmeleon sp.*) dibersihkan dengan pencucian menggunakan aquades dan dikeringanginkan diatas tisu untuk menghilangkan kotoran berupa debu. Kemudian ditimbang 8 ekor undur-undur (*myrmeleon sp.*) dan dihaluskan dengan mortar sampai terbentuk seperti pasta. Pasta dimasukkan dalam botol dan dilarutkan dengan 16 mL metanol (kelas KCKT), setelah itu dilakukan perendaman dan pengadukan (menggunakan stirer magnet) selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan proses penyaringan (dengan tiga kali penyaringan menggunakan kertas saring *whatman*) untuk memisahkan antara filtrat (ekstrak

metanol) dengan ampas sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*). Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian disonikasi selama 300 detik.

4.4.2 Pembuatan Standar Metformin 6 ppm dan Glibenklamid 3 ppm

Pembuatan larutan standar metformin 6 ppm dan Glibenklamid 3 ppm masing-masing dilakukan dengan membuat larutan induk standar metformin dan glibenklamid 1000 ppm, dengan tujuan untuk mengurangi kesalahan dalam proses penimbangan dengan neraca analitik. Semakin kecil massa yang akan ditimbang, maka tingkat kesalahan akan semakin besar. Sehingga massa yang diperoleh kurang kuantitatif.

4.4.2.1 Larutan Induk Standar Metformin dan Glibenklamid 1000 ppm

Pembuatan larutan induk standar metformin 1000 ppm dilakukan dengan menimbang 10 mg serbuk standar metformin menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan dalam beaker glass dan dilarutkan dengan 5 mL metanol (kelas KCKT). Setelah larut, dimasukkan dalam labu takar 10 mL dan ditandabatkan dengan menambahkan metanol (kelas KCKT). Kemudian dihomogenkan dan disonikasi selama 300 detik, sehingga diperoleh larutan stok standar metformin 1000 ppm.

Pembuatan larutan induk standar glibenklamid 1000 ppm menggunakan prosedur yang sama seperti pada pembuatan larutan induk standar metformin 1000 ppm.

4.4.2.2 Standar Metformin 6 ppm

Pembuatan larutan standar metformin konsentrasi 6 ppm dilakukan melalui proses pengenceran dari larutan induk standar metformin 1000 ppm.

$$\begin{aligned}
 M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\
 1000 \text{ ppm} \cdot V_1 &= 6 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL} \\
 V_1 &= 0,06 \text{ mL} \\
 &= 60 \mu\text{L}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan standar metformin 6 ppm dilakukan dengan memipet 60 μL larutan induk menggunakan pipet mikro 20-200 μL dan memasukkannya dalam labu takar 10 mL. Kemudian menambahkan pelarut metanol (kelas KCKT) sampai tanda batas dan menghomogenkannya.

4.4.2.3 Standar Glibenklamid 3 ppm

Pembuatan larutan standar glibenklamid konsentrasi 3 ppm dilakukan melalui proses pengenceran dari larutan induk standar glibenklamid 1000 ppm.

$$\begin{aligned}
 M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\
 1000 \text{ ppm} \cdot V_1 &= 3 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL} \\
 V_1 &= 0,03 \text{ mL} \\
 &= 30 \mu\text{L}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan standar glibenklamid 3 ppm dilakukan dengan memipet 30 μL larutan induk menggunakan pipet mikro 20-200 μL dan memasukkannya dalam labu takar 10 mL. Kemudian menambahkan pelarut metanol (kelas KCKT) sampai tanda batas dan menghomogenkannya.

4.4.2.4 Glibenklamid 3 ppm dalam Metformin 6 ppm

Pembuatan campuran glibenklamid dan metformin dilakukan dengan memipet 5 mL larutan standar metformin 6 ppm. Kemudian dimasukkan ke dalam

botol dan ditambahkan larutan induk standar glibenklamid 1000 ppm sebanyak 15 μ L. Setelah itu dihomogenkan dan disonikasi selama 300 detik.

4.4.3 Optimasi Metode KCKT

4.4.3.1 Penentuan Laju Alir yang Optimum

Campuran larutan standar metformin 6 ppm dan glibenklamid 3 ppm (yang sudah dipreparasi pada percobaan 4.4.2.4), diambil sebanyak ± 1 mL menggunakan spuit 1 cc. Selanjutnya diinjeksikan pada KCKT (stabil) melalui penyaringan dengan kertas saring mikron 0,45 μ m. Kondisi analisis metode KCKT yaitu:

Suhu	: Suhu ruang
Kolom	: C18 VP-ODS 250L x 4,6 mm
Laju alir	: 0,3 mL/min; 0,5 mL/menit dan 0,7 mL/min
Detektor	: UV 235 nm
Fase gerak	: Metanol : Air (70:30 \rightarrow elusi isokratik)

Kemudian ditentukan laju alir yang optimum dari hasil analisis yang ditunjukkan dengan nilai R_s , N , k' , dan α yang dihitung dengan rumus pada persamaan 2.1–2.4 dari kromatogram-kromatogram yang terbentuk.

4.4.3.2 Penentuan Panjang Gelombang UV yang Optimum

Penentuan panjang gelombang optimum dilakukan dengan kondisi analisis metode KCKT yang sama seperti pada percobaan 4.4.3.1, dengan laju alir yang sudah terpilih (kondisi optimum), dan yang dibuat berbeda adalah panjang gelombang yang digunakan, yaitu 230, 233, 235, 237 dan 240 nm.

Kemudian ditentukan panjang gelombang yang optimum dari hasil analisis yang ditunjukkan dengan intensitas optimum dari kromatogram kedua komponen (standar metformin dan glibenklamid).

4.4.3.3 Penentuan Komposisi Fase gerak Metanol : Air yang Optimum

Penentuan komposisi fase gerak optimum dilakukan dengan kondisi analisis metode KCKT yang sama seperti pada percobaan 4.4.3.2, dengan panjang gelombang yang sudah terpilih (kondisi optimum), dan yang dibuat berbeda adalah komposisi fase gerak dan sistem elusi yang digunakan, yaitu metanol : air (70:30→elusi isokratik) dan metanol : air (dengan kenaikan metanol 50-90% dalam waktu 15 menit →elusi gradien).

Kemudian ditentukan komposisi fase gerak yang optimum dari hasil analisis yang ditunjukkan dengan nilai R_s , N , k' , dan α yang dihitung dengan rumus pada persamaan 2.1–2.4 dari kromatogram-kromatogram standar metformin dan glibenklamid maupun kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*).

4.4.4 Penentuan keberadaan metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*)

Percobaan ini bertujuan untuk mengetahui waktu retensi analit dalam sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) yang bersesuaian dengan waktu retensi zat standar yaitu metformin. Selain itu juga untuk mengetahui validasi metode ekstraksi dan metode analisis kualitatif KCKT yang digunakan yaitu dengan menentukan tingkat linieritas, uji batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) serta uji tingkat akurasi.

Sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) yang sudah di preparasi, disonikasi selama 300 detik. Kemudian diambil sebanyak ± 1 mL menggunakan spuit 1 cc. Selanjutnya diinjeksikan pada KCKT melalui penyaringan dengan kertas saring mikron 0,45 μm , dengan kondisi analisis optimum yang diperoleh dari percobaan 4.4.3.1-4.4.3.3. Selanjutnya, membandingkan hasil kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan kromatogram standar metformin 6 ppm. Apabila dalam kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) muncul kromatogram pada waktu retensi yang sama dengan waktu retensi kromatogram standar metformin 6 ppm, maka dapat dinyatakan bahwa keberadaan metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) adalah benar.

Selain itu, untuk memaksimalkan hasil analisis kualitatif yang diperoleh, maka dilakukan metode *spiking* yaitu dengan memipet 5 mL ekstrak metanol undur-undur (*myrmeleon sp.*) dan dimasukkan dalam botol, kemudian ditambahkan larutan induk standar metformin 1000 ppm sebanyak 30 μL . Selanjutnya dihomogenkan dan disonikasi selama 300 detik. Setelah itu, diambil sebanyak ± 1 mL menggunakan spuit 1 cc dan diinjeksikan pada KCKT melalui penyaringan dengan kertas saring mikron 0,45 μm , dengan kondisi analisis optimum yang diperoleh dari percobaan 4.4.3.1-4.4.3.3. Apabila muncul kromatogram dengan waktu retensi yang sama dengan standar metformin dan tinggi puncak yang diperoleh lebih tinggi dari kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) sebelum *dispike* dengan standar metformin, maka dapat dipastikan bahwa kromatogram dalam sampel tersebut adalah kromatogram senyawa metformin.

Kemudian untuk uji validasi metode ekstraksi dan metode analisis kualitatif KCKT dilakukan dengan menentukan (1) linieritas, yang ditunjukkan dari nilai koefisien korelasi (r^2) persamaan linier kurva kalibrasi hubungan antara luas area dengan konsentrasi standar metformin (Harmita, 2004) dan (2) Uji batas deteksi (LOD) yang bertujuan untuk mengetahui batas konsentrasi terkecil dari metformin yang dapat terukur oleh instrumen KCKT sedangkan untuk uji batas kuantitasi (LOQ) menunjukkan batas terkecil analit yang dapat terdeteksi secara kuantitatif, yang mana nilai LOD dan LOQ dapat dihitung menggunakan persamaan 4.1 (Harmita, 2004).

$$Q = \frac{k \cdot SB}{S} \quad \text{Persamaan 4.1}$$

Dimana Q merupakan batas deteksi (LOD) atau batas kuantitasi (LOQ), dan k bernilai 3 untuk penentuan LOD dan bernilai 10 untuk penentuan LOQ. Kemudian SB menunjukkan simpangan baku respon analit terhadap blanko dan S merupakan nilai slope (arah garis linier dari kurva kalibrasi yang dinyatakan dengan “a” pada persamaan $Y = ax + b$).

Selanjutnya menentukan (3) tingkat akurasi, yang mana bertujuan untuk mengevaluasi nilai % perolehan kembali (% *recovery*) metformin dalam sampel dari metode *spiking*, yang dapat dihitung menggunakan persamaan 4.2 (Ravichandran, S.S. dan Rajak, 2010).

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Area}_{\text{spiking}} - \text{Area}_{\text{sampel}}}{\text{Area}_{\text{standar}}} \times 100\% \quad \text{Persamaan 4.2}$$

4.4.5 Pengukuran kadar metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*)

Pengukuran kadar metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*) menggunakan dua metode, yaitu metode *spiking* dan metode standar internal.

Prosedur yang dilakukan pada metode *spiking* yaitu dengan menentukan luas area kromatogram metformin dalam sampel sebelum dan setelah ditambahkan larutan standar metformin yang sudah diketahui konsentrasinya yang diperoleh dari percobaan 4.4.4. Kemudian menghitung kadar metformin dalam undur-undur menggunakan Persamaan 2.11 dan mengkonversikan kadar metformin dalam satuan mg/g.

Kemudian pada metode standar internal, prosedur yang dilakukan yaitu dengan menentukan faktor respon internal dari kromatogram hasil pemisahan glibenklamid 3 ppm dalam metformin 6 ppm yang diperoleh dari percobaan 4.4.3.3 menggunakan persamaan 2.7.

Selanjutnya, menginjeksikan larutan standar internal glibenklamid 3 ppm dalam 5 mL ekstrak metanol undur-undur (*myrmeleon sp.*) pada KCKT dengan kondisi analisis optimum yang diperoleh dari percobaan 4.4.3.1-4.4.3.3. Setelah proses pemisahan selesai, maka diperoleh beberapa puncak kromatogram (diantaranya puncak metformin dan puncak standar internal glibenklamid). Kemudian melakukan analisis kuantitatif dengan menghitung konsentrasi metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) menggunakan Persamaan 2.8.

Selanjutnya, untuk mengetahui validasi metode analisis kuantitatif KCKT yang digunakan, maka dilakukan uji tingkat presisi. Parameter tingkat presisi ditentukan berdasarkan nilai standar deviasi relatif (RSD) dari beberapa konsentrasi metformin dalam sampel yang diperoleh dari hasil analisis kuantitatif metode *spiking* dan metode standar internal. Nilai RSD dapat dihitung menggunakan persamaan 4.3 (AOAC, 2005).

$$\text{RSD} = \frac{\text{Standar Deviasi (S)}}{\text{Konsentrasi rata-rata metformin dalam sampel } (\bar{x})} \times 100\% \quad \text{Persamaan 4.3}$$

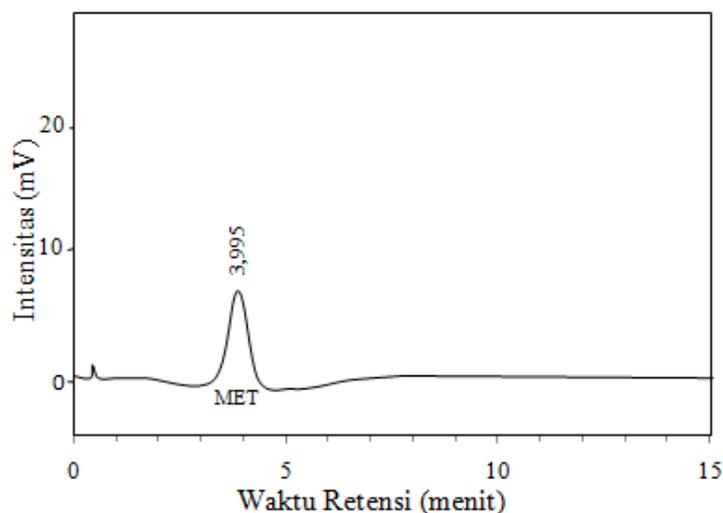
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini akan dijelaskan tentang hasil-hasil penelitian dan pembahasan meliputi standar metformin dan glibenklamid yang dipisahkan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), laju alir, panjang gelombang dan komposisi fase gerak metanol:air yang optimum dalam pemisahan metformin, yang dilanjutkan dengan analisis kualitatif dan kuantitatif metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*) menggunakan KCKT kondisi optimum.

5.1 Standar Metformin dan Glibenklamid

Standar metformin yang digunakan adalah metformin hidroklorida (MET) PHR 1084-500 mg yang merupakan standar farmasi kedua dengan bentuk sediaan berupa serbuk kristal berwarna putih. Selanjutnya, standar MET dipreparasi melalui proses pelarutan dan pengenceran menggunakan pelarut metanol sampai diperoleh larutan standar MET dengan konsentrasi 6 ppm sesuai dengan prosedur Lampiran L.2.1. Pada Gambar 5.1 berikut, menunjukkan kromatogram standar MET 6 ppm.

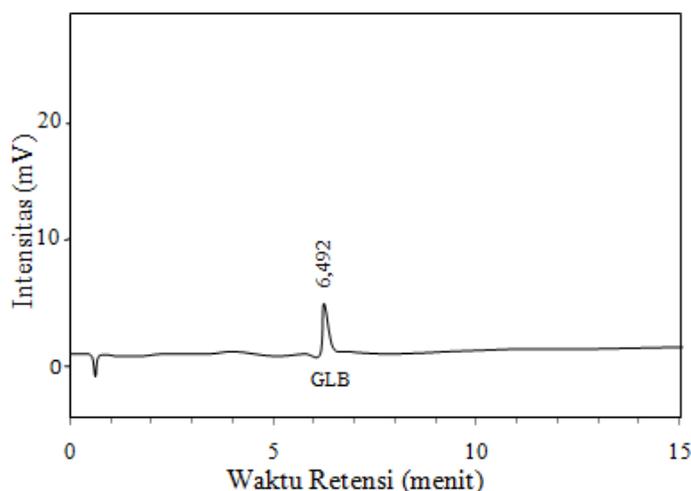


Gambar 5.1 Kromatogram Standar Metformin 6 ppm
Kondisi pemisahan: Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Laju alir 0,5 mL/menit; V. sampel 2 μ L; fase gerak Metanol:Air (70:30); λ 235 nm

Puncak kromatogram standar metformin 6 ppm keluar pada waktu retensi 3,995 dengan luas area 187621. Kemudian larutan standar kedua yaitu standar glibenklamid (GLB) Sigma G0639-5 g yang merupakan standar untuk kelas KCKT dengan tingkat kemurnian diatas 99%, dengan bentuk sediaan berupa serbuk kristal berwarna putih. Pada penelitian ini, glibenklamid dipilih sebagai standar internal karena memiliki waktu retensi yang berdekatan dan tidak mengganggu puncak metformin maupun senyawa-senyawa lain dalam sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*), memiliki kemiripan sifat dengan metformin dalam tahapan preparasi sampel, tersedia dalam bentuk yang murni dan mempunyai respon detektor yang hampir sama dengan metformin pada konsentrasi yang digunakan.

Standar internal (GLB) yang ditambahkan yaitu 3 ppm (Lampiran L.2.2), yang berada pada konsentrasi setengah dari konsentrasi maksimum analit (MET) dalam sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*). Dengan penambahan menggunakan metode *spiking* sebagaimana tertera pada Lampiran L.3. Gambar 5.2 berikut,

menunjukkan puncak kromatogram standar glibenklamid 3 ppm, dengan waktu retensi 6,492 dan luas area 46371.

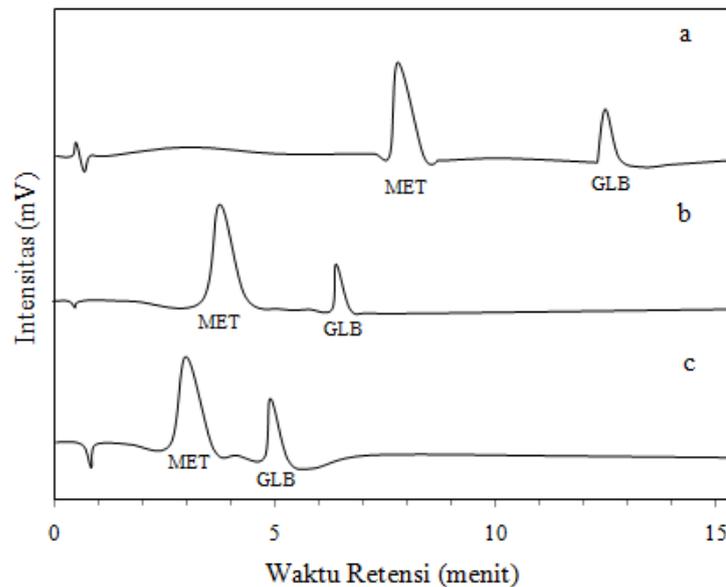


Gambar 5.2. Kromatogram Standar Glibenklamid 3 ppm
Kondisi Pemisahan: Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Laju alir 0,5 mL/min; V.Sampel 2 μ L; Fase gerak metanol:air (70:30); λ 235 nm

Kemudian untuk mengetahui kondisi optimum pemisahan senyawa MET, maka dilakukan beberapa optimasi diantaranya yaitu optimasi laju alir, optimasi panjang gelombang UV dan optimasi komposisi fase gerak metanol:air.

5.2 Laju Alir Optimum dalam Pemisahan Metformin

Laju alir menunjukkan tingkat kecepatan aliran zat tertentu persatuan waktu. Optimasi laju alir menggunakan tiga variasi yaitu 0,3 mL/min; 0,5 mL/min dan 0,7 mL/min. Optimasi ini dilakukan selain dengan tujuan untuk mengetahui kondisi optimum laju alir dalam pemisahan MET, juga dilakukan untuk mengetahui apakah dengan perubahan laju alir (dari lambat ke cepat), akan berpengaruh linier terhadap perubahan waktu retensi pemisahan MET. Gambar 5.3 berikut menunjukkan hasil pemisahan MET dan GLB dengan tiga variasi laju alir.



Gambar 5.3 Kromatogram Standar MET 6 ppm dan GLB 3 ppm dengan tiga variasi laju alir (a) 0,3 mL/min, (b) 0,5 mL/min dan (c) 0,7 mL/min; Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Fase gerak metanol:air (70:30); V.sampel 2 μ L; λ 235 nm

Laju alir bernilai linier dengan waktu retensi, yaitu semakin cepat laju alir yang digunakan pada proses pemisahan MET dan GLB, maka waktu retensi yang diperlukan juga semakin cepat. Kondisi optimum diperoleh pada laju alir 0,5 mL/min, dengan nilai kualitas kromatogram terbaik sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Evaluasi pemisahan MET dan GLB pada berbagai laju alir

Laju alir (mL/min)	R	N		k'		α
		MET	GLB	MET	GLB	
0,3	6,27	1202,01	6938,89	14,6	24	1,64
0,5	4	400	3340,84	5,67	9,83	1,73
0,7	2,77	248,06	1568,16	4,25	7,25	1,71

Keterangan:

R = Resolusi ($\geq 1,5$)

N = Jumlah plat teori (semakin tinggi semakin bagus)

k' = Faktor kapasitas (1-10)

α = Selektivitas (>1)

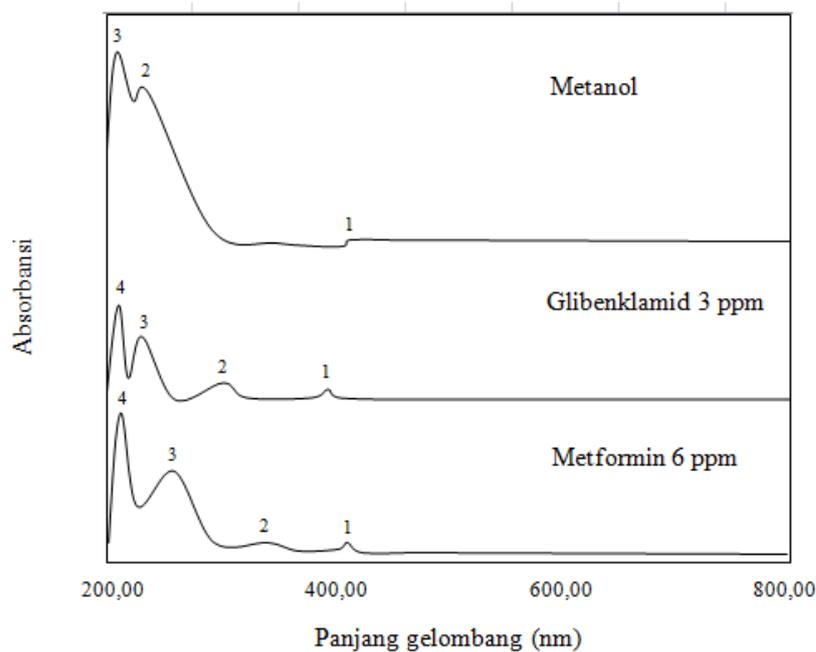
5.3 Panjang Gelombang Optimum dalam Pemisahan Metformin

Kondisi panjang gelombang maksimum dipilih karena pada panjang gelombang tersebut zat akan memberikan respon yang maksimum atau absorbansi

terbesar. Nilai dari panjang gelombang maksimum ini dapat digunakan untuk identifikasi kualitatif suatu senyawa, karena bersifat spesifik untuk setiap senyawa yang mempunyai gugus kromofor tertentu.

Panjang gelombang maksimum digunakan untuk suatu analisis kuantitatif agar pengukuran yang dilakukan pada daerah panjang gelombang maksimum, diperoleh nilai absorbtivitas molar (ϵ) yang tinggi. Semakin tinggi absorbtivitas molar, diharapkan sensitivitas pengukuran akan semakin baik, dengan demikian maka kesalahan pada saat pengukuran akan semakin kecil.

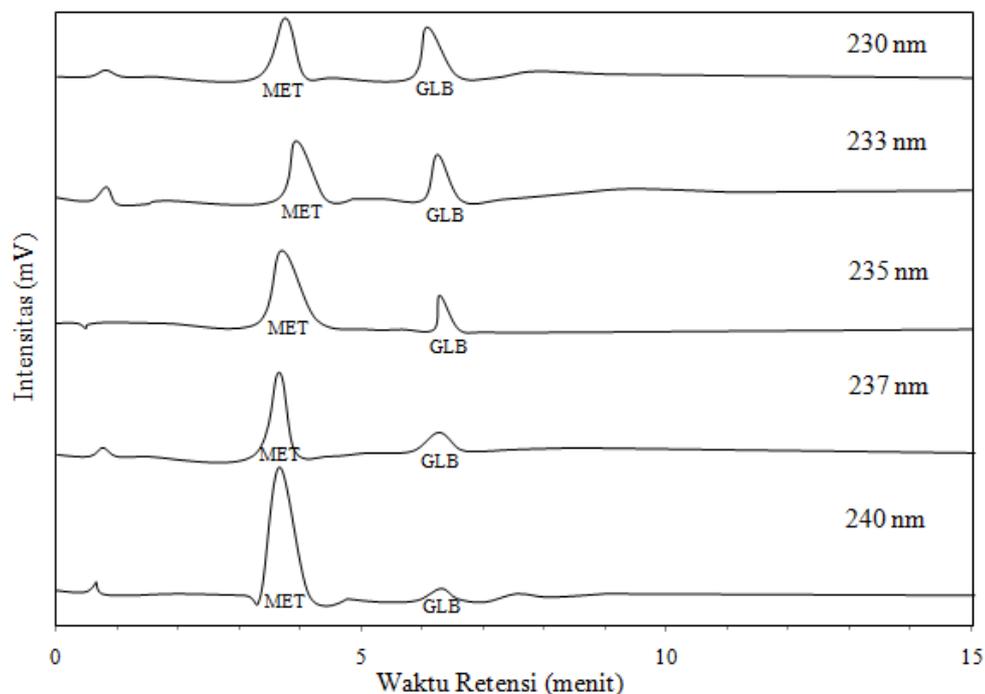
Optimasi panjang gelombang dilakukan pada lima titik sesuai dari hasil scanning panjang gelombang menggunakan UV-Vis, sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4 Puncak spektra scanning UV 200-800 nm

Berdasarkan pada Gambar 5.4, absorbansi maksimum untuk standar glibenklamid 3 ppm dan standar metformin 6 ppm secara berurutan berada pada daerah panjang gelombang 229,50 nm dan 240 nm. Sehingga untuk proses

optimasi panjang gelombang, dilakukan pada lima titik yaitu 230 nm, 233 nm, 235 nm, 237 nm dan 240 nm. Gambar 5.5 berikut merupakan hasil pemisahan MET dan GLB pada lima titik panjang gelombang.



Gambar 5.5 Kromatogram Standar MET 6 ppm dan GLB 3 ppm dengan lima titik panjang gelombang (230 nm, 233 nm, 235 nm, 237 nm, 240 nm). Kondisi pemisahan: Kolom C-18 250Lx4,6mm; Laju alir 0,5 mL/menit; Fase gerak metanol:air (70:30); V.sampel 2 μ L

Panjang gelombang berpengaruh terhadap intensitas puncak kromatogram, untuk intensitas MET mengalami kenaikan seiring dengan naiknya panjang gelombang yang digunakan, sedangkan untuk intensitas GLB mengalami penurunan. Salah satu kemungkinan yang menjadi penyebab yaitu karena standar MET mempunyai absorbansi maksimum pada panjang gelombang 240 nm, sehingga secara linier intensitasnya juga naik (maksimum). Demikian juga pada standar GLB mempunyai intensitas maksimum pada panjang gelombang dengan absorbansi maksimum yaitu mendekati 230 nm. Sehingga, berdasarkan intensitasnya kondisi optimum pemisahan MET dan GLB dipilih pada panjang gelombang 233 nm. Karena meskipun intensitas MET maupun GLB tidak berada

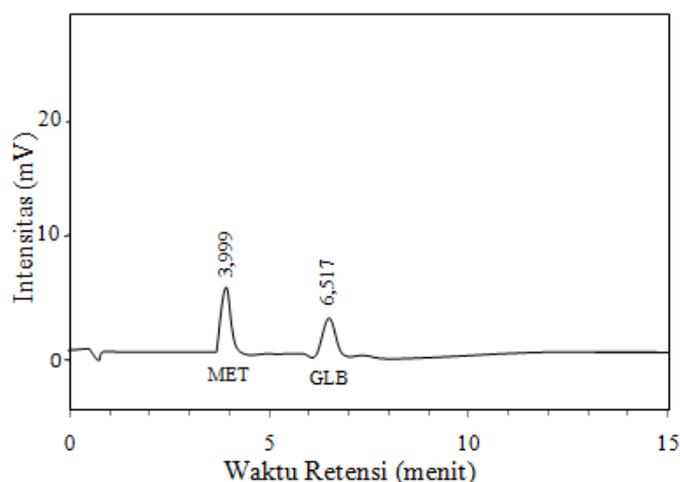
pada titik maksimum, tetapi intensitas yang ditunjukkan pada panjang gelombang 233 nm lebih menunjukkan sensitivitas yang tinggi dibandingkan pada panjang gelombang yang lain, sehingga kedua komponen (MET dan GLB) dapat terdeteksi.

5.4 Komposisi Fase gerak Metanol:Air Optimum dalam Pemisahan Metformin

Optimasi komposisi fase gerak (metanol:air) dilakukan dengan elusi isokratik maupun elusi gradien, dengan tujuan untuk memperoleh hasil pemisahan yang optimum tidak hanya untuk puncak MET dan GLB tetapi juga untuk senyawa-senyawa lain dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*).

a. Elusi Isokratik

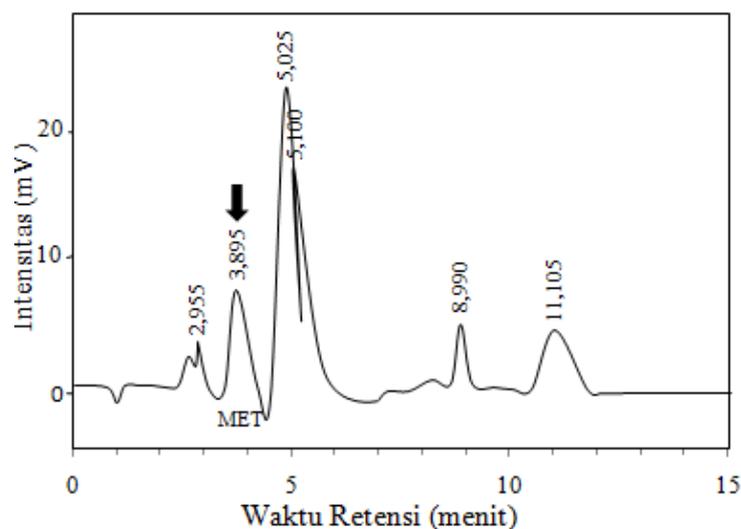
Sistem elusi isokratik merupakan sistem elusi dengan komponen fase gerak (metanol:air) tidak berubah selama analisis, yaitu pada penelitian ini dibuat pada perbandingan 70:30. Gambar 5.6 berikut, menunjukkan kromatogram MET dan GLB menggunakan komposisi metanol:air (70:30) yang dielusi secara isokratik.



Gambar 5.6. Kromatogram Standar MET 6 ppm dan GLB 3 ppm dengan elusi isokratik fase gerak Metanol:Air (70:30); Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Laju alir 0,5 mL/menit; V.sampel 2 μ L; λ 233 nm

Standar MET dan GLB dapat terpisah dengan baik pada waktu retensi 3,999 dengan luas area 175946 (untuk MET) dan 6,517 dengan luas area 48735 (untuk GLB). Kemudian untuk memastikan komposisi fase gerak metanol:air (70:30) dengan sistem elusi isokratik yang digunakan sudah optimum, maka dilakukan percobaan pemisahan pada sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan kondisi pemisahan yang sama seperti pada Gambar 5.6.

Hasil pemisahan sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) ditunjukkan pada Gambar 5.7. Puncak kromatogram senyawa MET dapat terpisah dari senyawa-senyawa lain, akan tetapi kurang optimal karena masih terbentuk ekor dengan puncak 1 dan 3. Kemudian, juga terdapat puncak yang saling berhimpit yaitu pada puncak 3 dan 4. Selain itu, untuk puncak 6 membutuhkan waktu elusi yang terbilang cukup lama. Sehingga dapat disimpulkan bahwa komposisi fase gerak metanol:air (70:30) dengan sistem elusi isokratik masih belum cukup optimum untuk memisahkan MET maupun senyawa-senyawa lain dari ekstrak metanol undur-undur (*myrmeleon sp.*).



Gambar 5.7. Kromatogram Sampel Undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan elusi isokratik (ISO) fase gerak Metanol:Air (70:30); Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Laju alir 0,5 mL/menit; V.sampel 2 μ L; λ 233 nm

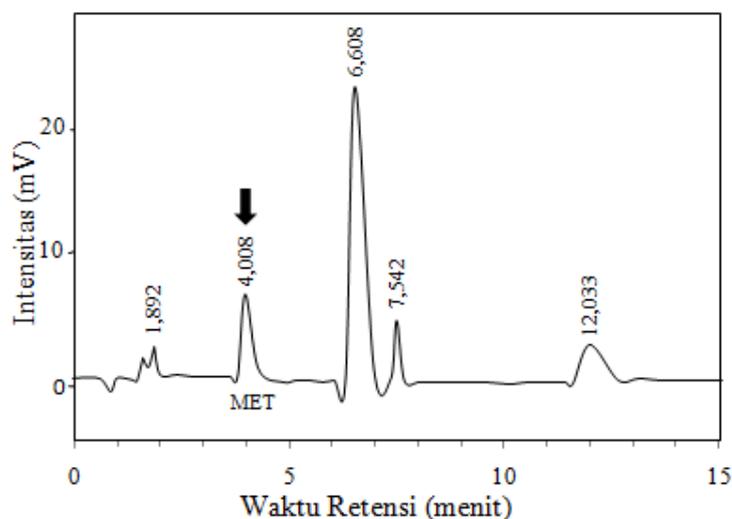
b. Elusi Gradien

Sistem elusi gradien merupakan sistem elusi dengan komposisi fase gerak diubah selama proses analisis. Pada penelitian ini, sistem gradien dengan komposisi fase gerak metanol:air diubah dengan tujuan untuk mendapatkan hasil pemisahan yang optimum untuk semua senyawa dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*).

Komposisi fase gerak pertama yang digunakan yaitu metanol 60-80% dan air 40-20% dalam 7 menit, kemudian metanol 60% dan air 10% pada menit ke-7,01-15,00. Tujuannya adalah untuk memisahkan puncak 1 dan 2, puncak 3 dan 4, dan untuk mempercepat proses elusi pada puncak 5 dan 6.

Berdasarkan hasil perbandingan puncak-puncak kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan sistem elusi isokratik (ISO) dan sistem elusi gradien komposisi pertama (GRD 1) sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 5.8, menunjukkan bahwa dengan komposisi fase gerak lebih polar yaitu metanol:air (60:40) puncak 1 terelusi lebih cepat (maju) yaitu dari waktu retensi 2,955 menit (ISO) menjadi 1,892 menit (GRD 1). Sehingga dapat diketahui, bahwa senyawa pada puncak 1 bersifat polar (terikat lemah dengan kolom). Kemudian, untuk puncak 2 (senyawa MET) sengaja dibuat tetap yaitu pada komposisi fase gerak metanol:air (70:30), sehingga antara puncak 1 dan 2 sudah dapat terpisah dengan baik. Selanjutnya untuk puncak 3 dan 4, terjadi *overlapping* dengan waktu retensi keduanya yang lebih lama (mundur semua) yaitu dari 5,025 dan 5,100 (puncak 3 dan 4 pada sistem ISO) menjadi 6,608 (GRD 1) dengan komposisi fase gerak yang lebih kurang polar yaitu metanol:air (80:20). Sehingga, dugaan sementara untuk puncak 3 dan 4 adalah senyawa-senyawa yang bersifat polar. Kemudian

pada puncak 5 dan 6 dengan komposisi fase gerak yang dikembalikan pada kondisi lebih polar yaitu metanol:air (60:40), diperoleh puncak kromatogram dengan waktu retensi yang lebih cepat untuk puncak 5 (8,999→7,542) dan waktu retensi lebih lama untuk puncak 6 (11,105→12,033). Sehingga, dapat diketahui bahwa senyawa pada puncak 5 bersifat polar dan pada puncak 6 bersifat non polar.

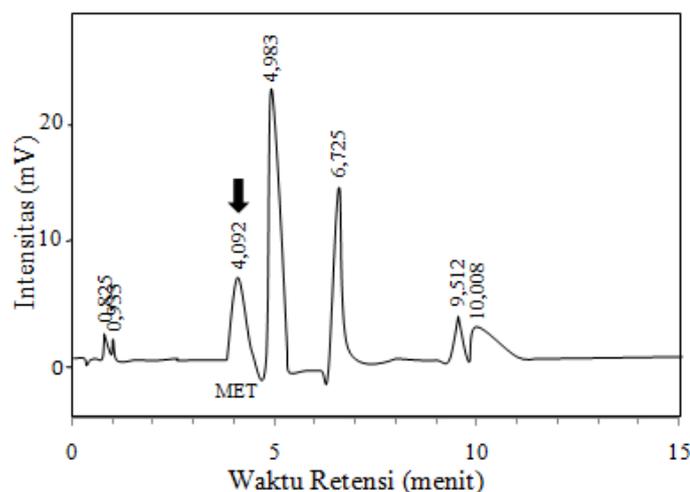


Gambar 5.8. Kromatogram Sampel Undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan elusi GRD 1; Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Laju alir 0,5 mL/menit; V.sampel 2 μ L; λ 233 nm

Komposisi fase gerak kedua yaitu metanol 50-90% dan air 50-10% pada waktu 15 menit, dengan tujuan untuk menghasilkan pemisahan yang lebih bagus dari komposisi pertama yaitu dengan memisahkan puncak yang berhimpitan dengan puncak 1, memisahkan puncak 3 dan 4 (*overlapping* pada puncak 3), serta mempercepat waktu retensi puncak 5.

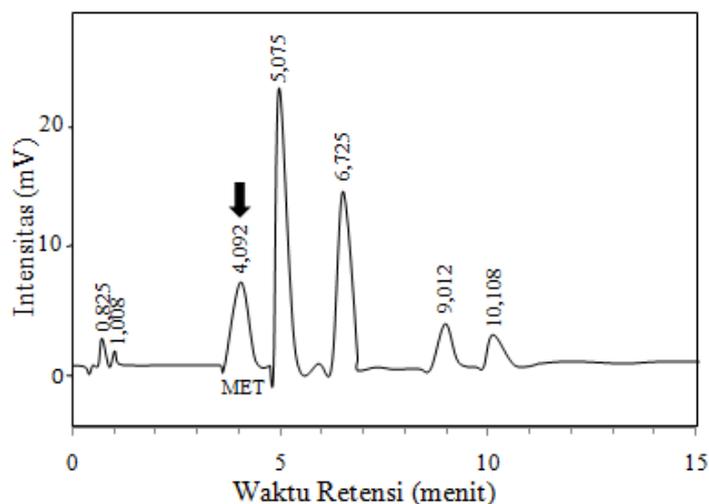
Berdasarkan hasil perbandingan puncak-puncak kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan sistem elusi gradien komposisi pertama (GRD 1) dan sistem elusi gradien komposisi kedua (GRD 2) sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 5.9, menunjukkan bahwa dengan komposisi fase gerak

lebih polar yaitu metanol:air (50:50) puncak 1 terelusi lebih cepat (maju) yaitu dari waktu retensi 1,892 menit (GRD 1) menjadi 0,825 menit (GRD 2). Sehingga dapat diketahui, bahwa senyawa pada puncak 1 bersifat polar (terikat lemah dengan kolom). Kemudian, puncak yang berhimpit dengan puncak 1 dapat terelusi kembali dengan waktu retensi 0,933 menit sehingga posisi kedua puncak tersebut menjadi saling bertukar dari posisi ketika menggunakan elusi GRD 1. Sehingga, dapat dipastikan bahwa senyawa pada puncak 2 bersifat non polar. Selanjutnya, untuk puncak 3 (senyawa MET) sengaja dibuat tetap dan untuk puncak 4 dikembalikan seperti pada sistem ISO, yaitu metanol:air (70:30) sehingga dapat terpisah dari puncak 5 (yang sengaja dibuat tetap seperti sistem GRD 1). Secara berurutan perubahan waktu retensi puncak 3, 4 dan 5 yaitu 4,008→4,092 (tetap); 6,608→4,983 (maju) dan 6,608→6,725 (tetap). Kemudian untuk puncak 6 terelusi lebih lama (7,542→9,512) dan puncak 7 terelusi lebih cepat (12,033→10,008) dengan komposisi fase gerak yang lebih kurang polar dari sistem GRD 1, yaitu metanol:air (90:10) yang dimulai pada menit ke-6,51-15,00. Puncak 6 dan 7, terelusi pada waktu retensi yang berdekatan, sehingga saling berhimpitan.



Gambar 5.9. Kromatogram Sampel Undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan elusi GRD 2; Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Laju alir 0,5 mL/menit; V.sampel 2 μ L; λ 233 nm

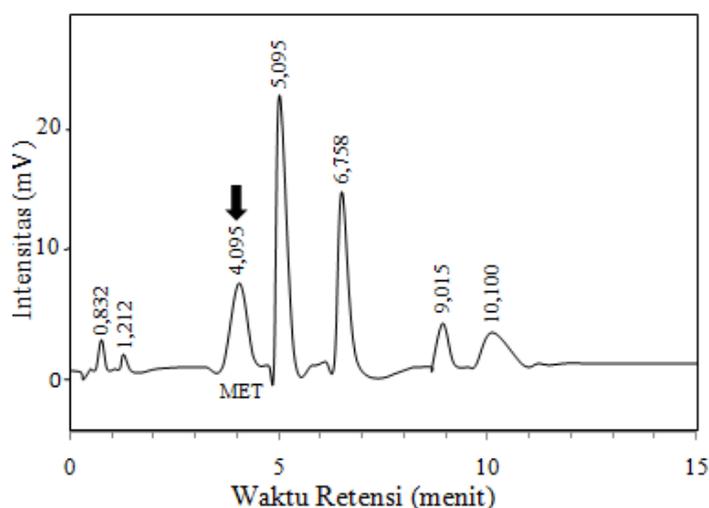
Permasalahan pada sistem GRD 2 dapat diselesaikan dengan menggunakan komposisi fase gerak ketiga yang diatur seperti pada sistem GRD 2, yang dibuat berbeda adalah pada komposisi metanol:air (90:10) yaitu dimulai pada menit ke-9,51. Puncak kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) pada puncak 1-5 dan puncak 7 dibuat tetap dengan kondisi pemisahan seperti pada sistem GRD 2, yang dibuat berbeda adalah waktu elusi untuk puncak 6 yaitu pada menit ke-5,51-9,51 dengan komposisi fase gerak yang lebih polar dari sistem GRD 2 yaitu metanol:air (80:20)), karena diketahui bahwa senyawa pada puncak 6 bersifat polar, sehingga dapat terelusi lebih cepat (dari waktu retensi 9,512 menit → 9,012 menit). Jadi puncak 6 dan 7 sudah dapat terpisah dengan baik seperti ditunjukkan pada Gambar 5.10.



Gambar 5.10. Kromatogram Sampel Undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan elusi GRD 3; Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Laju alir 0,5 mL/menit; V.sampel 2 μ L; λ 233 nm

Selanjutnya, teknik pemisahan MET dilakukan dengan menggunakan sistem elusi gradien komposisi fase gerak keempat (GRD 4) dengan pengaturan metanol 50-40% dan air 50-60% dalam waktu 2,5 menit dan kemudian pada menit ke-2,51-15 menggunakan metanol 70-90% dan air 30-10%, dengan hasil

pemisahan ditunjukkan pada Gambar 5.11. Sistem GRD 4 ini bertujuan untuk memaksimalkan pemisahan senyawa-senyawa dari ekstrak metanol sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) khususnya pada puncak 1 dan 2, dengan mengurangi komposisi pelarut organik (metanol) pada menit ke 0,90-2,51 maka puncak 2 dapat terpisah dari puncak 1 dengan waktu retensi yang lebih lama dari sistem GRD 3 yaitu dari 0,933 menit menjadi 1,212 menit, karena diketahui bahwa puncak 2 bersifat non polar.

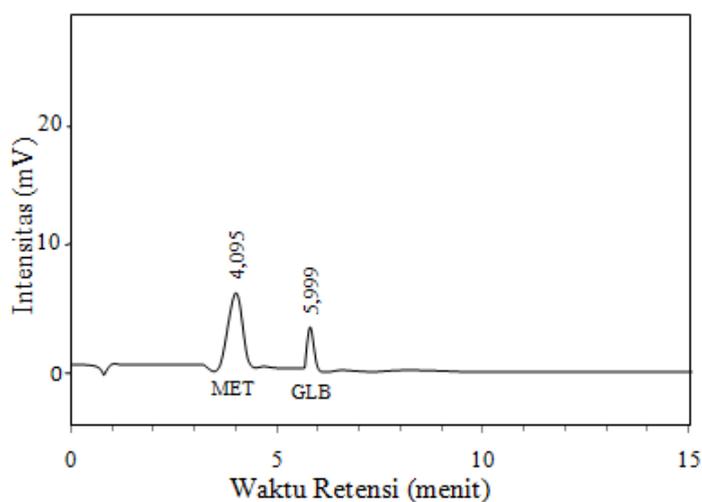


Gambar 5.11. Kromatogram Sampel Undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan elusi GRD 4; Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Laju alir 0,5 mL/menit; V.sampel 2 μ L; λ 233 nm

Setelah diperoleh komposisi fase gerak yang memberikan hasil pemisahan optimum untuk sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*), maka untuk selanjutnya dilakukan pemisahan campuran standar MET 6 ppm dengan GLB 3 ppm menggunakan kondisi pemisahan yang sama seperti pada Gambar 5.11, dengan tujuan untuk memastikan bahwa standar internal GLB dapat terpisahkan dengan baik apabila ditambahkan ke dalam sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*).

Pemisahan senyawa MET dan GLB menggunakan sistem GRD 4 menunjukkan waktu retensi GLB yang lebih cepat dibandingkan dengan sistem

ISO, yaitu pada waktu retensi 5,999 (Gambar 5.12). Hal tersebut terjadi karena GLB mempunyai sedikit atom yang lebih elektronegatif, sehingga kemungkinan dalam membentuk pusat muatan negatif dan positif adalah lebih kecil (momen dipol < 0 , bersifat kurang polar) apabila dibandingkan dengan MET. Selain itu, GLB mempunyai banyak gugus siklik (benzena dan alkana) yang bersifat non polar (hidrofobik) (Gambar 2.2). Sehingga dengan mengatur komposisi fase gerak yang semakin non polar (GLB terelusi pada menit 5,999, pada komposisi metanol:air (80:20)), GLB akan lebih cepat terelusi.



Gambar 5.12. Kromatogram Standar MET 6 ppm dan GLB 3 ppm dengan kondisi KCKT optimum

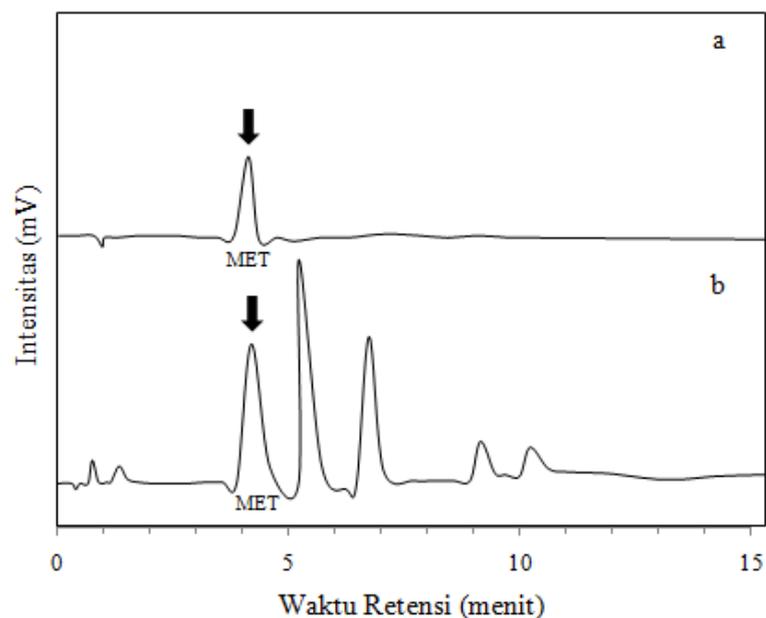
Kondisi KCKT optimum yang dipilih dalam pemisahan MET adalah pada komposisi fase gerak metanol:air dengan sistem GRD 4, karena selain menunjukkan waktu pemisahan yang lebih cepat juga menunjukkan kualitas kromatogram yang optimum, seperti ditunjukkan pada Tabel 5.2 dan dengan perhitungan sesuai pada Lampiran L.5.3.

Tabel 5.2 Evaluasi pemisahan standar MET dan GLB dengan sistem ISO dan GRD 4

Sistem Elusi	R	N		k'		α
		MET	GLB	MET	GLB	
Isokratik	5,04	1023,49	2718,16	3,99	7,15	1,79
Gradien	5,44	1073,22	14395,20	4,12	6,5	1,58

5.5 Analisis Kualitatif Metformin dalam Undur-undur (*myrmeleon sp.*)

Keberadaan senyawa metformin dalam sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*), secara kualitatif yaitu berdasarkan hasil perbandingan data waktu retensi standar MET (Gambar 5.13.a) dengan waktu retensi puncak kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) (Gambar 5.11) dengan menggunakan metode KCKT pada kondisi optimum, maka dapat diketahui bahwa dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) mengandung metformin yaitu pada puncak ketiga dengan waktu retensi 4,095 dan luas area 255786.



Gambar 5.13. (a) Kromatogram standar metformin 6 ppm,
 (b) Kromatogram *Spiking* metformin 6 ppm dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan kondisi KCKT optimum

Analisis kualitatif metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) juga menggunakan metode *spiking* yaitu dengan menambahkan larutan standar MET yang sudah diketahui konsentrasinya (6 ppm) dalam sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) (Lampiran L.6). Metode *spiking* ini dilakukan dengan tujuan untuk mengevaluasi efisiensi praperlakuan (*pretreatment*) dan proses preparasi sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan menghitung nilai perolehan kembali (% *recovery*). Sesuai dalam AOAC (2002), rentang % *recovery* yang dapat diterima pada konsentrasi $\geq 0,1$ ppm yaitu 80-110%. Gambar 5.13.b berikut merupakan kromatogram *spiking* MET 6 ppm dalam sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*), yang mana puncak kromatogram MET semakin tinggi pada waktu retensi 4,092 dengan luas area 427693. Sehingga dapat dipastikan bahwa dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) terkandung senyawa metformin.

Kemudian berdasarkan validasi metode analisis kualitatif KCKT diperoleh tingkat linieritas larutan standar MET yang cukup baik pada konsentrasi 3-12 ppm dengan R^2 mendekati 1 (yaitu 0,990), yang mana berdasarkan kurva baku yang ditunjukkan pada lampiran L.7.1. Kemudian uji batas deteksi (LOD) yang bertujuan untuk mengetahui batas konsentrasi terkecil dari metformin yang dapat terukur oleh instrumen KCKT dan batas kuantitasi (LOQ) yang menunjukkan batas terkecil analit yang dapat terdeteksi secara kuantitatif diperoleh pada konsentrasi 0,07 ppm (untuk LOD) dan 0,23 ppm (untuk LOQ) dengan perhitungan pada lampiran L.7.2. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa konsentrasi MET dapat terdeteksi apabila sampel yang diukur memiliki konsentrasi lebih besar dari nilai LOQ, sehingga hasilnya dapat dipercaya. Akan tetapi, apabila sampel yang terdeteksi lebih kecil dari nilai LOQ dapat dipastikan

bahwa hasil tersebut bukanlah murni dari sampel melainkan *noise* atau gangguan saat analisis, dengan demikian data yang dihasilkan kurang akurat atau tidak dapat dipercaya.

Parameter akurasi metode menggunakan metode *spiking* yang didasarkan pada persen (%) perolehan kembali (Ravichandran, Shalini, Sundram dan Rajak, 2010). Proses ini dilakukan dengan cara menambahkan larutan standar (MET) yang sudah diketahui konsentrasinya dan berdasarkan AOAC (2002), konsentrasi standar yang ditambahkan harus identik atau relatif sama dengan konsentrasi sampel. Pada penelitian ini, diperoleh nilai % *recovery* yang dapat diterima sesuai AOAC (2002) yaitu 92,6 % (Tabel 5.3), sesuai dengan perhitungan pada Lampiran L.7.3 Sehingga dapat disimpulkan bahwa metode yang dikembangkan memenuhi persyaratan validasi.

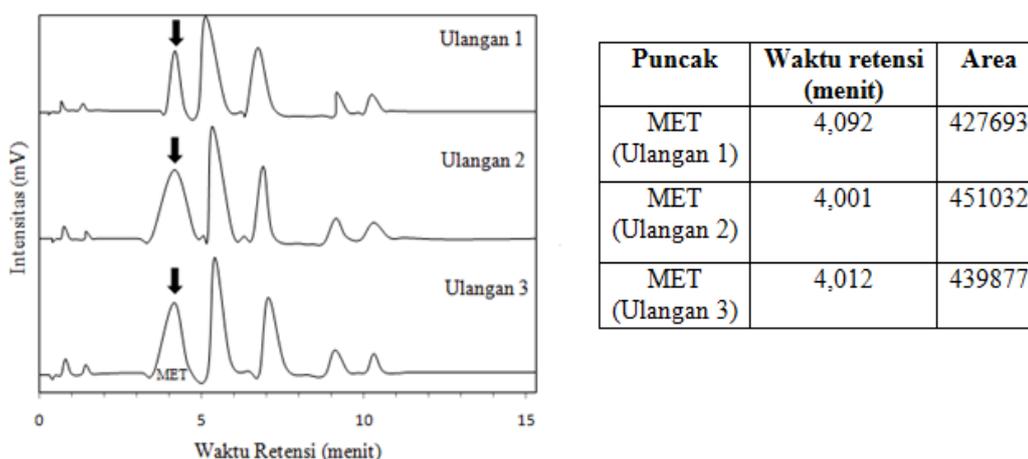
Tabel 5.3 Hasil perolehan kembali senyawa metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) (n=3)

Senyawa	Sampel undur-undur (<i>myrmeleon sp.</i>)	Konsentrasi standar yang ditambahkan (ppm)	Konsentrasi terukur (ppm)	Perolehan kembali (%)
Metformin	a	0	7,74	-
	b	6	8,38	92,6

5.6 Analisis Kuantitatif Metformin dalam Undur-undur (*myrmeleon sp.*)

Analisis kuantitatif metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) menggunakan metode *spiking* dan metode standar internal. Metode *spiking* dilakukan seperti pada prosedur yang ditunjukkan dalam lampiran L.6. Penentuan konsentrasi metformin dalam sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) metode *spiking* dilakukan dengan tiga kali pengulangan, karena salah satu syarat suatu penelitian dinyatakan valid adalah bersifat reproduisibel (menghasilkan hasil yang

sama ketika penelitian dilakukan kembali). Pada pengujian dengan KCKT, reproduibilitas data hasil dari suatu penelitian dapat dilihat berdasarkan nilai standar deviasi relatif (RSD). Apabila nilai RSD berkisar antara 5-15% maka dapat dikatakan bahwa penelitian tersebut sudah bersifat reproduibel (AOAC, 2005). Hasil pemisahan undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan metode *spiking* standar metformin 6 ppm menggunakan metode KCKT optimum ditunjukkan seperti pada Gambar 5.14.



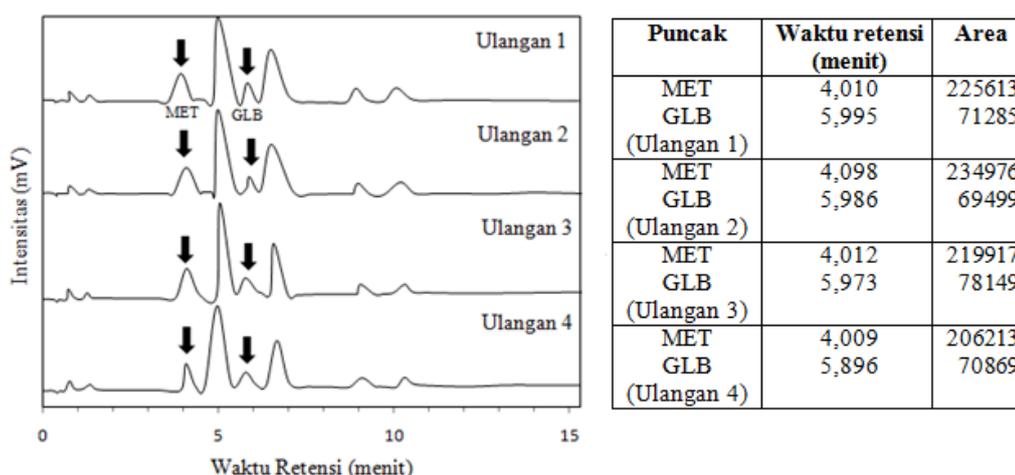
Gambar 5.14. Kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan *spiking* standar metformin 6 ppm pada kondisi KCKT optimum

Analisis kuantitatif kedua menggunakan metode standar internal, karena senyawa metformin dalam sampel bersama dengan senyawa lain. Sehingga dengan menggunakan standar internal dapat diketahui konsentrasi asli dari senyawa metformin. Komponen standar internal yaitu glibenklamid yang ditambahkan dalam sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*).

Tahapan dalam analisis kuantitatif metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) yaitu dengan menentukan faktor respon internal (dari standar glibenklamid 3 ppm dalam metformin 6 ppm) dan kemudian menentukan konsentrasi metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*). Nilai faktor respon

internal dari hasil pemisahan MET dan GLB dengan metode KCKT optimum (Gambar 5.12) yaitu sebesar 0,624, dengan perhitungan sesuai pada Lampiran L.9.1.

Selanjutnya, menentukan konsentrasi metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan menambahkan standar internal (glibenklamid 3 ppm) sesuai dengan prosedur Lampiran L.8.2.b Hasil pemisahan undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan penambahan standar internal glibenklamid 3 ppm menggunakan metode KCKT optimum dengan empat kali pengulangan ditunjukkan seperti pada Gambar 5.15.



Gambar 5.15. Kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan standar internal glibenklamid 3 ppm pada kondisi KCKT optimum

Konsentrasi rata-rata metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*) adalah sebesar 0,577 mg/g (untuk metode *spiking*) dan 0,398 mg/g (untuk metode standar internal) sesuai perhitungan pada Lampiran L.8. Konsentrasi yang terbilang tinggi, sehingga dengan mengkonsumsi 3-5 ekor undur-undur (*myrmeleon sp.*) per hari, sudah mencukupi dosis terapi yang diperlukan oleh penderita diabetes.

Kedua metode tersebut menunjukkan hasil yang bersifat reproduibel dengan nilai RSD sebesar 6,93% (pada metode *spiking*) dan 8,75% (pada metode standar internal) (Tabel 5.4).

Tabel 5.4. Nilai % RSD konsentrasi metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*)

Metode Analisis	Ulangan	[MET] _{sampel} (mg/g)	\bar{x} (mg/g)	RSD (%)	$\bar{x} \pm S$
Spiking	1	0,616	0,577	6,93	0,577 \pm 0,040
	2	0,543			
	3	0,573			
Standar internal	1	0,410	0,398	8,75	0,398 \pm 0,035
	2	0,440			
	3	0,360			
	4	0,380			

Keterangan:

[MET]_{sampel} : Konsentrasi metformin dalam sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*)

\bar{x} : Konsentrasi rata-rata metformin dalam sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*)

RSD : Standar deviasi relatif

S : Standar deviasi

Akan tetapi, metode analisis kuantitatif yang dipilih untuk analisis metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) adalah dengan menggunakan metode *spiking* dengan beberapa alasan yaitu yang pertama, metode *spiking* menggunakan perbandingan standar yang sesuai dengan senyawa dalam sampel yaitu metformin. Kedua, pada metode standar internal menggunakan teknik penghitungan yang kurang tepat, yaitu seharusnya menggunakan 2 macam standar dan 1 zat itu sendiri (dugaan senyawa). Dalam penelitian ini, hanya menggunakan 1 macam standar (glibenklamid). Ketiga, standar metformin dan glibenklamid pada konsentrasi yang sama (yaitu 3 ppm) menunjukkan respon detektor yang berbeda yaitu 83848,3 (untuk metformin) dan 56921 (untuk glibenklamid).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang ekstraksi metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*) menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), diperoleh kesimpulan antara lain adalah:

1. Kondisi optimum metode KCKT yang digunakan untuk analisis metformin dari undur-undur (*myrmeleon sp.*) adalah pada laju alir 0,5 mL/min dengan panjang gelombang UV 233 nm dengan sistem elusi gradien pada komposisi fase gerak metanol 50-40% dan air 50-60% dalam waktu 2,5 menit diikuti dengan metanol 70-90% dan air 30-10% pada menit ke-2,51-15.
2. Konsentrasi metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) adalah sebesar 0,577 mg/g.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk meningkatkan analisis kualitatif metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) dengan menggunakan sistem detektor selektif seperti *Mass Spectrometers* (MS) yang dapat merekam spektrum untuk masing-masing puncak dalam kromatogram sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- Adler, A.I., Shaw, E.J., Stokes, T., dan Ruiz, F., 2009, **Newer agents for blood glucose control in type 2 diabetes: summary of NICE guidance**, *BMJ* 338, b1668
- AOAC, 2002, **Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals**, *AOAC International*, 1–38
- Association of Official Analytical Chemists, 2005, **Official Methods of Analysis**, Association of Official Analytical Chemists, Benjamin Franklin Station, Washington
- Dalimartha, Setiawan, 2006, **Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Diabetes Mellitus**, Penebar Swadaya: Jakarta
- David, V., Albu, F. dan Medvedovici, A, 2005, **Retention Behavior of Metformin and Related Impurities in Ion-Pairing Liquid Chromatography**, *Journal Liquid Chromatography Rel Technology*, 28: 81.
- Poretsky, Leonid, 2010, **Principles of Diabetes Mellitus Second Edition**, Springer New York Dordrecht Heidelberg: London
- Djarubito, 1998, **Zoologi Dasar**, Erlangga: Jakarta
- Gong Li, Goswami Srijib, Giacomini Kathleen M, Altman Russ B, Klein Teri E., 2012, **Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics**, Pharmacogenetics and genomics
- Greene, MF., 2000, **Oral Hypoglycemic Drugs for Gestational Diabetes**, *N Engl J Med*, 343: 1178-1179
- Harmita, 2004, **Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya**, 117–135.
- Harris, D.C., 1948, **Quantitative Chemical Analysis (4th edition)**, Freeman: USA
- Harvey, David, 2000, **Modern Analytical Chemistry**, McGraw-Hill Higher Education: Amerika
- Peraman, R., Peruru, K.K., Yiragam, P.R., dan Gowra, C.S., 2014, **Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Metformin Hydrochloride and Pioglitazone Hydrochloride in Dosage Form**, *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 12, No. 1, 33-46

- Klepser, TB. Kelly, MW. (1997). **Metformin hydrochloride: an antihyperglycemic agent**. *Am J. Health System Pharm.* 54: 893-903.
- Kurniasih, T., Isma'il, M., Susilowati, F. dan Lestari, S.P., 2006, **Kajian Potensi Undur-undur Darat (myrmeleon sp.) Sebagai Antidiabetes**, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta
- Kusnaeni, V., 2008, **Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Fraksi n-Heksana dari Ekstrak Kulit Batang Angsret (*Spathoda campanulata beauv*)**, Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya: Malang
- Lamanna, C., Monami, M., Marchionni, N., dan Mannucci, E., 2011, **Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials**. *Diabetes Obes Metab* 13, 221-228
- Maulana, Mirza, 2015, **Mengenal Diabetes Melitus**, KATAHATI: Yogyakarta
- Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Ferrannini, E., Holman, R.R., Sherwin, R., dan Zinman, B., 2009, **Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes**, *Diabetes Care* 32, 193-203
- Negru, D.S., Markus, S., dan Cristea, A.N., 2007, **Pharmacotherapeutic and Pharmacoeconomic approach of Type 2 Diabetes Mellitus**, *Farmacia*, LV, 3:73-81
- Octavia, D.R., 2009, **Uji Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat dan Etanol Daun Binahong (*Anredera corfolia* (Tenore) Steen) dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrasil)**, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah: Surakarta
- Penny, 1997, **Obat Alternatif Diabetes Melitus**, Jakarta: Bumi Sakti
- Ranetti, Maria-Cristina, dan A. Ranetti, 2006, **The Pharmacokinetics of Some Oral Antidiabetic a Pharmaceutical Approach**, *Farmacia*, LIV, 6:3-13
- Ravichandran, V., Shalini, S., Sundram, K.M., dan Rajak, H., 2010, **Validation of analytical methods-Strategies and importance**. *International Journal Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 2(3), 18-22
- Rouessac, F. and Rouessac, A., 2007, **Chemical Analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques**, Edisi kedua, Prancis

- Satoskar, RS, Bhanbarkar, D, dan Nirmala, N, 2001, **Pharmacology dan Pharmacotherapeutics, Edisi 17**, Popular Prakashan: India
- Schafer, H.J., Mainka, L., Rathgeber, G., and Zimmer, G., 1983, **Photoaffinity crosslinking of oligomycin-sensitive ATPase from beef heart mitochondria by 3'-arylazido-8-azido ATP**, Biochem Biophys Res Commun 111, 732-739
- Selvin, E., Bolen, S., Yeh, H.C., Wiley, C., Wilson, L.M., Marinopoulos, S.S., Feldman, L., Vassy, J., Wilson, R., Bass, E.B., dan Brancati, F.L., 2008, **Cardiovascular outcomes in trials of oral diabetes medications: a systematic review**. Arch Intern Med 168, 2070-2080
- Siswandono dan Soekarjo, B., 1995, **Kimia Medisinal**, Surabaya: Airlangga University Press
- Skoog, Douglas A., 2004, **Fundamentals of Analytical Chemistry, Edisi 8**, Thomson Learning Academic Resource Center: United States
- Subagja, Hamid Prasetya, 2013, **Lintah dan Undur-undur itu Ajaib**, Obat Ampuh Penyakit-penyakit Serius, Buku Biru: Yogyakarta
- Sultana, N., Naveed, S. dan M. Arayne, S., 2013, **An Ultra-Sensitive and Selective LC-UV Method for the Simultaneous Determination of Metformin, Glibenclamide and Glimepiride in API, Pharmaceutical Formulation and Human Serum**, J Anal Bioanal Tech 5, 4: 1-8
- Zhou, K., Donnelly, L.A., Kimber, C.H., Donnan, P.T., Doney, A.S., Leese, G., Hattersley, A.T., McCarthy, M.I., Morris, A.D., Palmer, C.N., and Pearson, E.R., 2009, **Reduced-function SLC22A1 polymorphisms encoding organic cation transporter 1 and glycemic response to metformin: a GoDARTS study**, Diabetes 58, 1434-1439

LAMPIRAN

L.1 Preparasi sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*)

Sampel *myrmeleon sp.*

- Disiapkan 8 ekor undur-undur
- Dicuci dengan aquades (direndam dengan pengadukan)
- Dikeringanginkan diatas tissu
- Ditimbang (232 mg)
- Dihaluskan dengan mortar
- Dilarutkan dalam 16 mL metanol (kelas KCKT)
- Direndam dan diaduk dengan magnetik stirer (30 menit)
- Disaring dengan kertas saring (3x penyaringan)
- Disonikasi selama 300 detik

Sampel ekstrak metanol

L.2 Pembuatan larutan standar

L.2.1 Standar metformin 6 ppm

Standar metformin

- Ditimbang 10 mg
- Dimasukkan dalam gelas beaker
- Dilarutkan dengan 5 mL metanol (kelas KCKT)
- Dimasukkan dalam labu takar 10 mL
- Ditandabatkan dengan metanol (kelas KCKT)
- Dihomogenkan
- Disonikasi selama 300 detik

Larutan standar metformin 1000 ppm

- Dipipet 60 μ L
- Dimasukkan dalam labu takar 10 mL
- Ditandabatkan dengan metanol (kelas KCKT)
- Disonikasi 300 detik

Larutan standar metformin 6 ppm

L.2.2 Standar glibenklamid 3 ppm

Standar glibenklamid

- Ditimbang 10 mg
- Dimasukkan dalam gelas beaker
- Dilarutkan dengan 5 mL metanol (kelas KCKT)
- Dimasukkan dalam labu takar 10 mL
- Ditandabatkan dengan metanol (kelas KCKT)
- Dihomogenkan
- Disonikasi selama 300 detik

Larutan standar glibenklamid 1000 ppm

- Dipipet 30 μ L
- Dimasukkan dalam labu takar 10 mL
- Ditandabatkan dengan metanol (kelas KCKT)
- Disonikasi 300 detik

Larutan standar glibenklamid 3 ppm

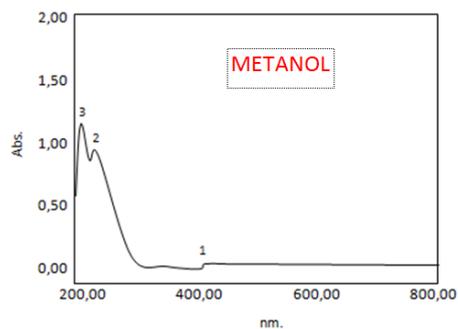
L.3 *Spiking* glibenklamid 3 ppm dalam metformin 6 ppm

Larutan standar metformin 6 ppm

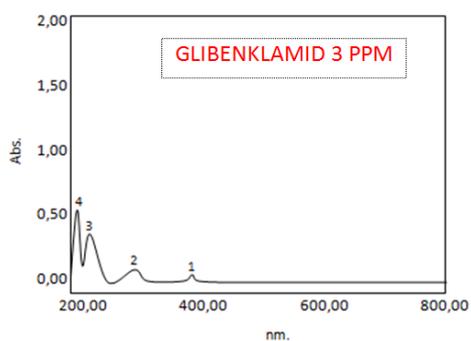
- Dipipet 5 mL
- Dimasukkan dalam botol
- Ditambahkan larutan standar glibenklamid 1000 ppm sebanyak 15 μ L
- Dihomogenkan dan disonikasi selama 300 detik

Larutan standar glibenklamid 3 ppm dalam metformin 6 ppm

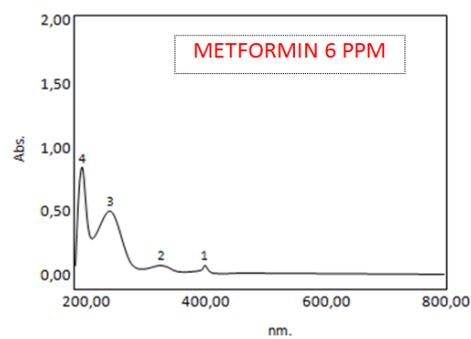
L.4 Puncak spektra *scanning* UV 200-800 nm



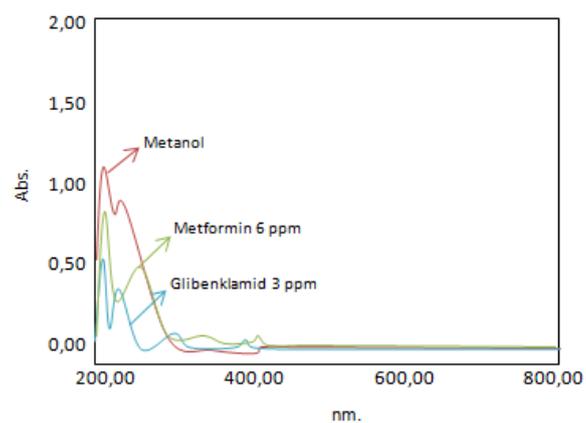
No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	412,00	0,015
2	↑	228,00	0,095
3	↑	213,00	1,205



No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	399,00	0,020
2	↑	302,00	0,100
3	↑	229,50	0,350
4	↑	210,50	0,550



No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	400,50	0,012
2	↑	325,00	0,150
3	↑	240,00	0,500
4	↑	205,50	0,850

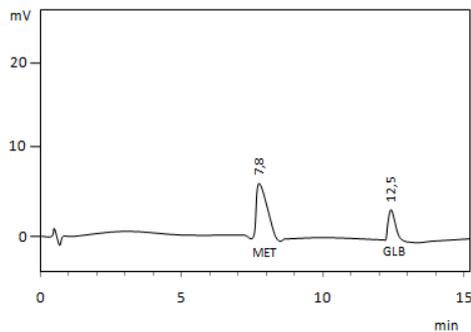


L.5 Evaluasi pemisahan standar MET dan GLB

(dihitung nilai R_s , N , k' dan α)

L.5.1 Optimasi laju alir

a. 0,3 mL/min



Peaks	Ret.Time	Area
1	7,8	178857
2	12,5	45793
Total		224650

Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (70:30→isokratik); Laju alir 0,3 mL/min; λ 235 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

$$W_1 = 0,9$$

$$W_2 = 0,6$$

$$t_0 = 0,5$$

$$tR_1 = 7,8$$

$$tR_2 = 12,5$$

$$R = \frac{2 \cdot \Delta tR}{W_1 + W_2} = \frac{2 \cdot (12,5 - 7,8)}{0,9 + 0,6} = 6,27$$

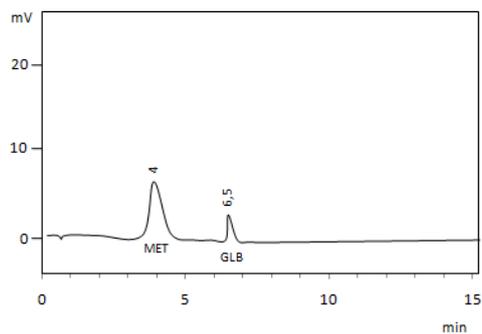
$$N_1 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 7,8}{0,9} \right]^2 = 1202,01$$

$$k'_1 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{7,8 - 0,5}{0,5} = 14,6$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{24}{14,6} = 1,64$$

$$N_2 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 12,5}{0,6} \right]^2 = 6938,89$$

$$k'_2 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{12,5 - 0,5}{0,5} = 24$$

b. 0,5 mL/min

Peaks	Ret.Time	Area
1	4	180351
2	6,5	43276
Total		223627

Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (70:30→isokratik); Laju alir 0,5 mL/min; λ 235 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

$$W_1 = 0,8$$

$$W_2 = 0,45$$

$$t_0 = 0,6$$

$$tR_1 = 4$$

$$tR_2 = 6,5$$

$$R = \frac{2 \cdot \Delta tR}{W_1 + W_2} = \frac{2 \cdot (6,5 - 4)}{0,8 + 0,45} = 4$$

$$N_1 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 4}{0,8} \right]^2 = 400$$

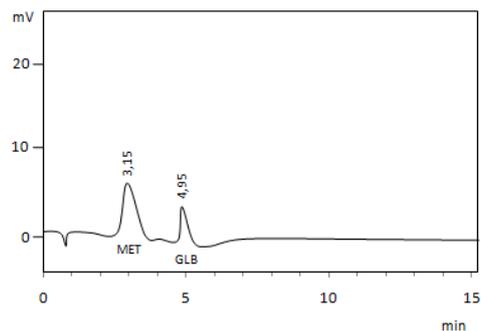
$$k'_1 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{4 - 0,6}{0,6} = 5,67$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{9,83}{5,67} = 1,73$$

$$N_2 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 6,5}{0,45} \right]^2 = 3340,84$$

$$k'_2 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{6,5 - 0,6}{0,6} = 9,83$$

c. 0,7 mL/min



Peaks	Ret.Time	Area
1	3,15	180536
2	4,95	48397
Total		228933

Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (70:30→isokratik); Laju alir 0,7 mL/min; λ 235 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

$$W_1 = 0,8$$

$$W_2 = 0,5$$

$$t_0 = 0,6$$

$$tR_1 = 3,15$$

$$tR_2 = 4,95$$

$$R = \frac{2 \cdot \Delta tR}{W_1 + W_2} = \frac{2 \cdot (4,95 - 3,15)}{0,8 + 0,5} = 2,77$$

$$N_1 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 3,15}{0,8} \right]^2 = 248,06$$

$$N_2 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 4,95}{0,5} \right]^2 = 1568,16$$

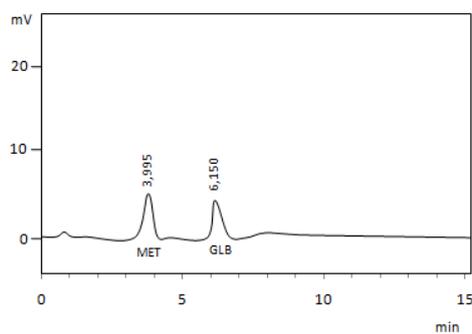
$$k'_1 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{3,15 - 0,6}{0,6} = 4,25$$

$$k'_2 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{4,95 - 0,6}{0,6} = 7,25$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{7,25}{4,25} = 1,71$$

L.5.2 Optimasi panjang gelombang

a. 230 nm



Peaks	Ret.Time	Area
1	3,995	168354
2	6,150	152746
Total		321100

Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (70:30→isokratik); Laju alir 0,5 mL/min; λ 230 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

$$W_1 = 0,9$$

$$W_2 = 0,8$$

$$t_0 = 0,7$$

$$tR_1 = 3,995$$

$$tR_2 = 6,150$$

$$R = \frac{2 \cdot \Delta tR}{W_1 + W_2} = \frac{2 \cdot (6,150 - 3,995)}{0,9 + 0,8} = 2,54$$

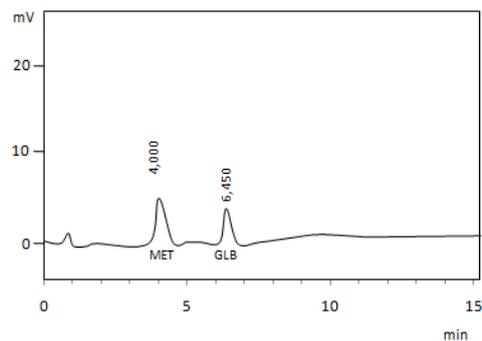
$$N_1 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 3,995}{0,9} \right]^2 = 315,42$$

$$N_2 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 6,150}{0,8} \right]^2 = 945,56$$

$$k'_1 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{3,995 - 0,7}{0,7} = 4,71$$

$$k'_2 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{6,150 - 0,7}{0,7} = 7,79$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{7,79}{4,71} = 1,65$$

b. 233 nm

Peaks	Ret.Time	Area
1	4,000	170651
2	6,45	102354
Total		273005

Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (70:30→isokratik); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

$$W_1 = 0,9$$

$$W_2 = 0,8$$

$$t_0 = 0,9$$

$$tR_1 = 4,000$$

$$tR_2 = 6,45$$

$$R = \frac{2 \cdot \Delta tR}{W_1 + W_2} = \frac{2 \cdot (6,45 - 4,000)}{0,9 + 0,8} = 2,88$$

$$N_1 = \left[\frac{4 \cdot tR_1}{W_1} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 4,000}{0,9} \right]^2 = 316,13$$

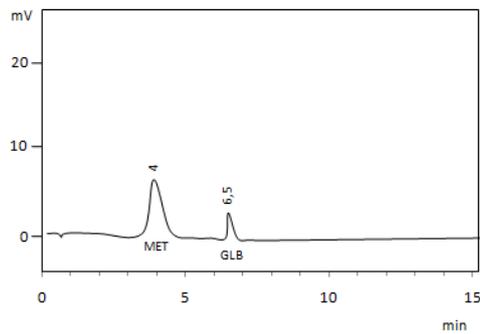
$$N_2 = \left[\frac{4 \cdot tR_2}{W_2} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 6,45}{0,8} \right]^2 = 1040,06$$

$$k'_1 = \frac{tR_1 - t_0}{t_0} = \frac{4,000 - 0,9}{0,9} = 3,44$$

$$k'_2 = \frac{tR_2 - t_0}{t_0} = \frac{6,45 - 0,9}{0,9} = 6,17$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{6,17}{3,44} = 1,79$$

c. 235 nm



Peaks	Ret.Time	Area
1	4	180351
2	6,5	43276
Total		223627

Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (70:30→isokratik); Laju alir 0,5 mL/min; λ 235 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

$$W_1 = 0,8$$

$$W_2 = 0,45$$

$$t_0 = 0,6$$

$$tR_1 = 4$$

$$tR_2 = 6,5$$

$$R = \frac{2 \cdot \Delta tR}{W_1 + W_2} = \frac{2 \cdot (6,5 - 4)}{0,8 + 0,45} = 4$$

$$N_1 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 4}{0,8} \right]^2 = 400$$

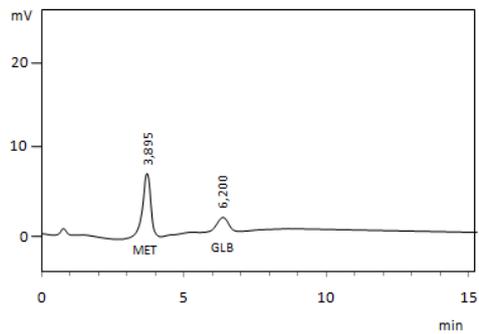
$$k'_1 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{4 - 0,6}{0,6} = 5,67$$

$$9,83$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{9,83}{5,67} = 1,73$$

$$N_2 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 6,5}{0,45} \right]^2 = 3340,84$$

$$k'_2 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{6,5 - 0,6}{0,6} =$$

d. 237 nm

Peaks	Ret.Time	Area
1	3,895	213745
2	6,2	32018
Total		245763

Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (70:30→isokratik); Laju alir 0,5 mL/min; λ 237 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

$$W_1 = 0,6$$

$$W_2 = 1$$

$$t_0 = 0,65$$

$$tR_1 = 3,895$$

$$tR_2 = 6,2$$

$$R = \frac{2 \cdot \Delta tR}{W_1 + W_2} = \frac{2 \cdot (6,2 - 3,895)}{0,6 + 1} = 2,88$$

$$N_1 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 3,895}{0,6} \right]^2 = 674,44$$

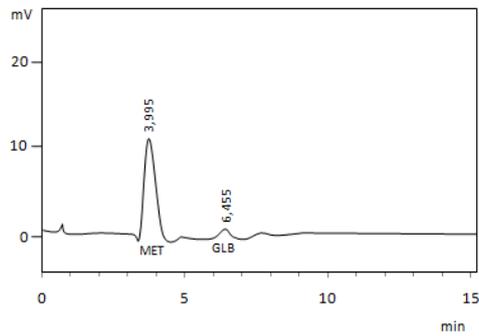
$$k'_1 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{3,895 - 0,65}{0,65} = 4,99$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{8,54}{4,99} = 1,71$$

$$N_2 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 6,2}{1} \right]^2 = 615,04$$

$$k'_2 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{6,2 - 0,65}{0,65} = 8,54$$

e. 240 nm



Peaks	Ret.Time	Area
1	3,995	296472
2	6,455	20108
Total		316580

Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (70:30→isokratik); Laju alir 0,5 mL/min; λ 240 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

$$W_1 = 0,9$$

$$W_2 = 1$$

$$t_0 = 0,6$$

$$tR_1 = 3,995$$

$$tR_2 = 6,455$$

$$R = \frac{2 \cdot \Delta tR}{W_1 + W_2} = \frac{2 \cdot (6,455 - 3,995)}{0,9 + 1} = 2,59$$

$$N_1 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 3,995}{0,9} \right]^2 = 315,42$$

$$N_2 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 6,455}{1} \right]^2 = 666,67$$

$$k'_1 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{3,995 - 0,6}{0,6} = 5,66$$

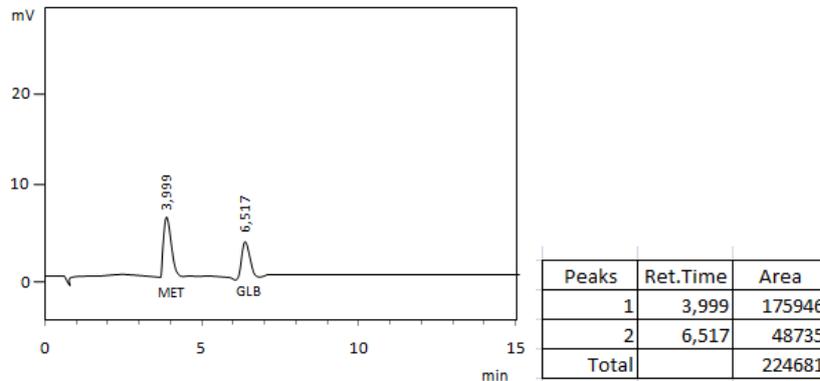
$$k'_2 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{6,455 - 0,6}{0,6} = 9,76$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{9,76}{5,66} = 1,72$$

L.5.3 Optimasi komposisi eluen

a. Elusi isokratik (metanol:air → 70:30)

➤ Standar MET dan GLB



Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (70:30 → isokratik); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

$$W_1 = 0,5$$

$$W_2 = 0,5$$

$$t_o = 0,8$$

$$tR_1 = 3,999$$

$$tR_2 = 6,517$$

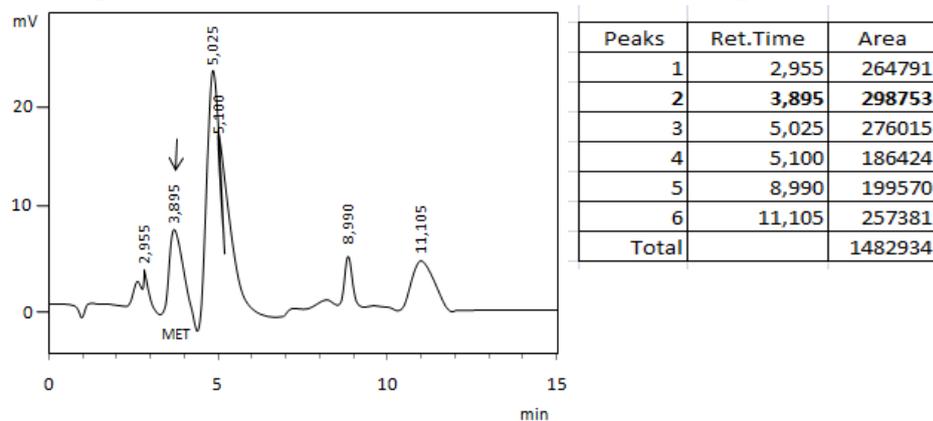
$$R = \frac{2 \cdot \Delta tR}{W_1 + W_2} = \frac{2 \cdot (6,517 - 3,999)}{(0,5 + 0,5)} = 5,04$$

$$N_1 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 3,999}{0,5} \right]^2 = 1023,49 \quad N_2 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 6,517}{0,5} \right]^2 = 2718,16$$

$$k'_1 = \frac{tR - t_o}{t_o} = \frac{3,999 - 0,8}{0,8} = 3,999 \quad k'_2 = \frac{tR - t_o}{t_o} = \frac{6,517 - 0,8}{0,8} = 7,15$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{7,15}{3,999} = 1,79$$

➤ Sampel ekstrak metanol undur-undur (*myrmeleon sp.*)

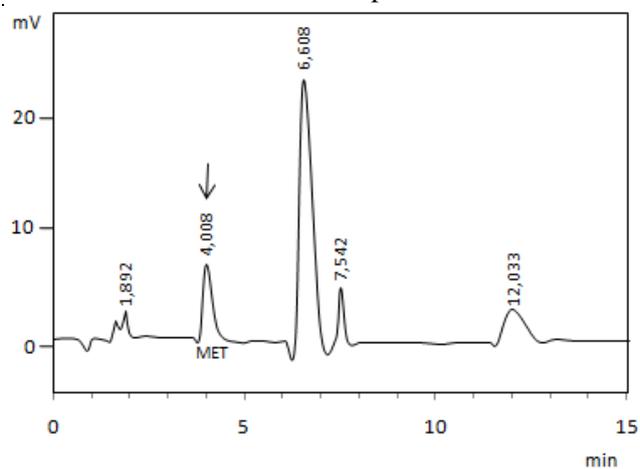


Kondisi Analisis

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Fase gerak Metanol:Air (70:30); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

**b. Elusi gradien
GRD 1**

Time	Module	Action	Value
0,01	Controller	Start	
0,02	Pumps	B.Conc	60
0,02	Pumps	D.Conc	40
2,51	Pumps	B.Conc	70
2,51	Pumps	D.Conc	30
4,51	Pumps	B.Conc	80
4,51	Pumps	D.Conc	20
7,01	Pumps	B.Conc	60
7,01	Pumps	D.Conc	40
15,00	Controller	Stop	



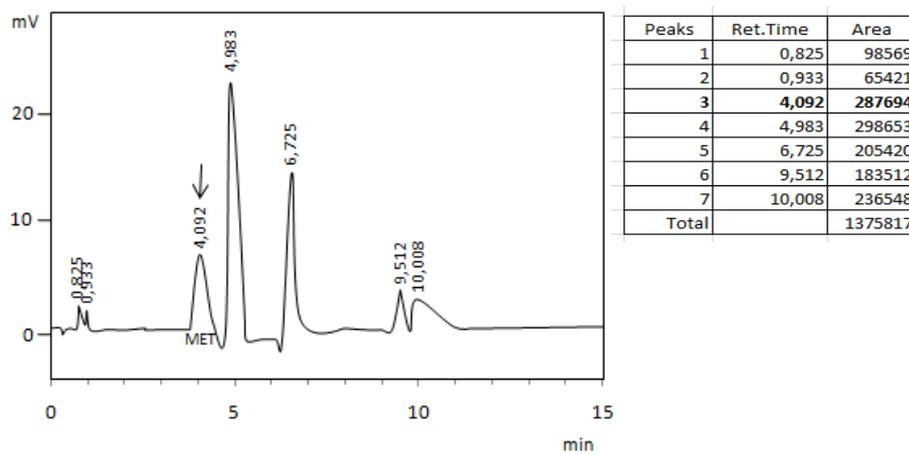
Peaks	Ret.Time	Area
1	1,892	201352
2	4,008	246483
3	6,608	365214
4	7,542	179589
5	12,033	216548
Total		1209186

Kondisi Analisis

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

GRD 2

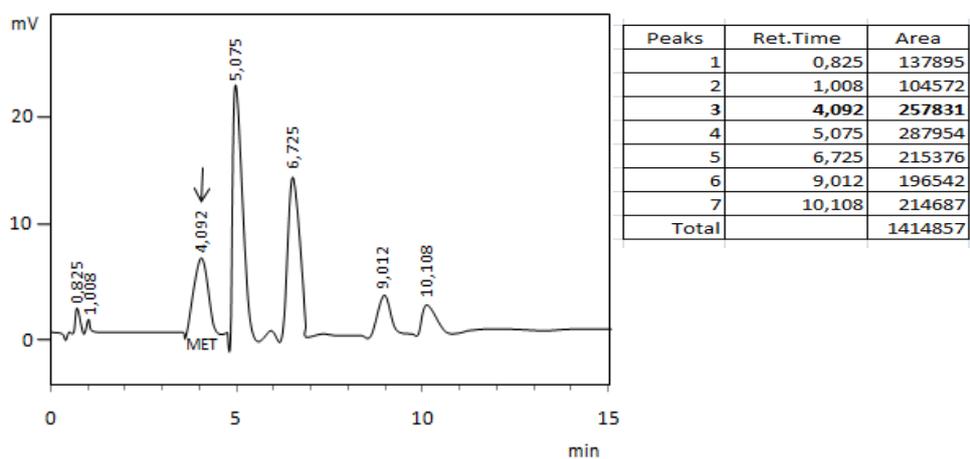
Time	Module	Action	Value
0,01	Controller	Start	
0,02	Pumps	B.Conc	50
0,02	Pumps	D.Conc	50
1,51	Pumps	B.Conc	60
1,51	Pumps	D.Conc	40
2,51	Pumps	B.Conc	70
2,51	Pumps	D.Conc	30
5,51	Pumps	B.Conc	80
5,51	Pumps	D.Conc	20
6,51	Pumps	B.Conc	90
6,51	Pumps	D.Conc	10
15,00	Controller	Stop	

**Kondisi Analisis**

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

GRD 3

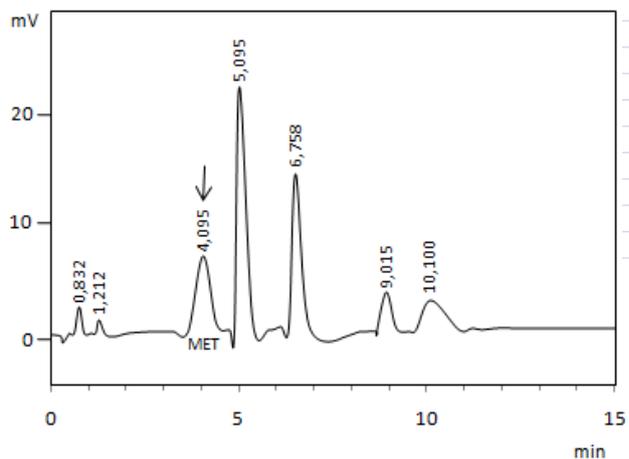
Time	Module	Action	Value
0,01	Controller	Start	
0,02	Pumps	B.Conc	50
0,02	Pumps	D.Conc	50
1,51	Pumps	B.Conc	60
1,51	Pumps	D.Conc	40
2,51	Pumps	B.Conc	70
2,51	Pumps	D.Conc	30
5,51	Pumps	B.Conc	80
5,51	Pumps	D.Conc	20
9,51	Pumps	B.Conc	90
9,51	Pumps	D.Conc	10
15,00	Controller	Stop	

**Kondisi Analisis**

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

GRD 4

Time	Module	Action	Value
0,01	Controller	Start	
0,02	Pumps	B.Conc	50
0,02	Pumps	D.Conc	50
0,90	Pumps	B.Conc	40
0,90	Pumps	D.Conc	60
2,51	Pumps	B.Conc	70
2,51	Pumps	D.Conc	30
5,51	Pumps	B.Conc	80
5,51	Pumps	D.Conc	20
9,51	Pumps	B.Conc	90
9,51	Pumps	D.Conc	10
15,00	Controller	Stop	

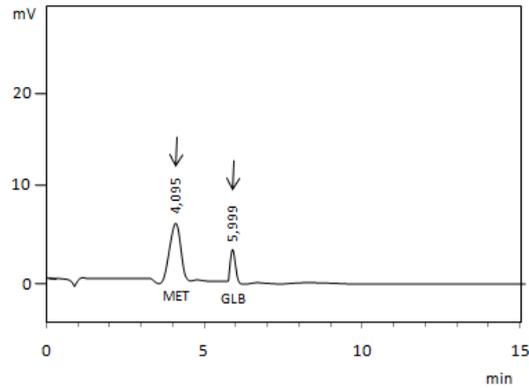
Sampel ekstrak metanol undur-undur (*myrmeleon sp.*)

Peaks	Ret.Time	Area
1	0,832	157832
2	1,212	132654
3	4,095	255786
4	5,095	289734
5	6,758	204326
6	9,015	187529
7	10,100	237618
Total		1465479

Kondisi Analisis

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Standar MET dan GLB



Peaks	Ret.Time	Area
MET	4,095	182356
GLB	5,999	56921
Total		239277

Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (GRD 4); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

$$W_1 = 0,5$$

$$W_2 = 0,2$$

$$t_0 = 0,8$$

$$tR_1 = 4,095$$

$$tR_2 = 5,999$$

$$R = \frac{2 \cdot \Delta tR}{W_1 + W_2} = \frac{2 \cdot (5,999 - 4,095)}{(0,5 + 0,2)} = 5,44$$

$$N_1 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 4,095}{0,5} \right]^2 = 1073,22 \quad N_2 = \left[\frac{4 \cdot tR}{W} \right]^2 = \left[\frac{4 \cdot 5,999}{0,2} \right]^2 = 14395,20$$

$$k'_1 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{4,095 - 0,8}{0,8} = 4,12 \quad k'_2 = \frac{tR - t_0}{t_0} = \frac{5,999 - 0,8}{0,8} = 6,5$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{6,5}{4,12} = 1,58$$

L.6 Analisis kualitatif metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*) (metode *spiking*)

Sampel *myrmeleon sp.*

- Dipipet 5 mL
- Dimasukkan dalam botol
- Ditambahkan larutan standar metformin 1000 ppm sebanyak 30 μ L
- Dihomogenkan dan disonikasi selama 300 detik

Larutan standar metformin 6 ppm dalam sampel

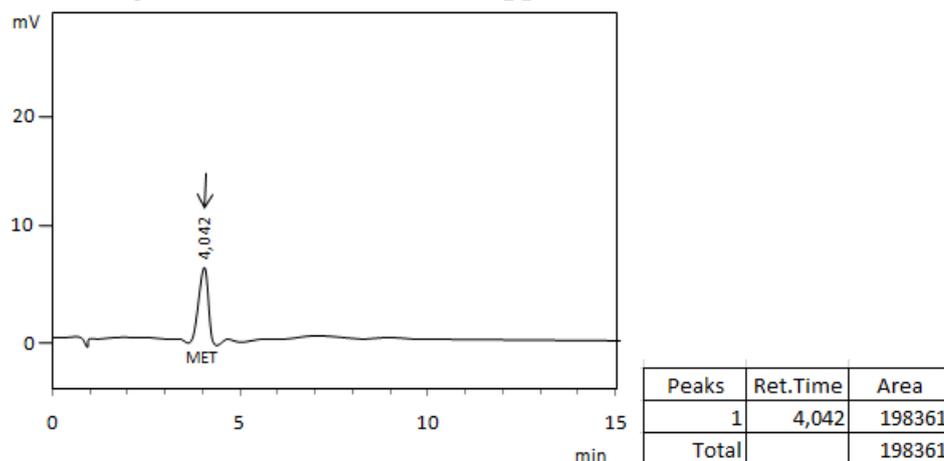
- Langsung diinjeksikan 2 μ L (Kondisi KCKT: Kolom C-18; Laju alir 0,5 mL/menit; eluen Metanol:Air (sistem GRD 4); λ 233 nm)

Hasil

LC.Time Prog.

Time	Module	Action	Value
0,01	Controller	Start	
0,02	Pumps	B.Conc	50
0,02	Pumps	D.Conc	50
1,21	Pumps	B.Conc	60
1,21	Pumps	D.Conc	40
2,51	Pumps	B.Conc	70
2,51	Pumps	D.Conc	30
5,51	Pumps	B.Conc	80
5,51	Pumps	D.Conc	20
9,51	Pumps	B.Conc	90
9,51	Pumps	D.Conc	10
15,00	Controller	Stop	

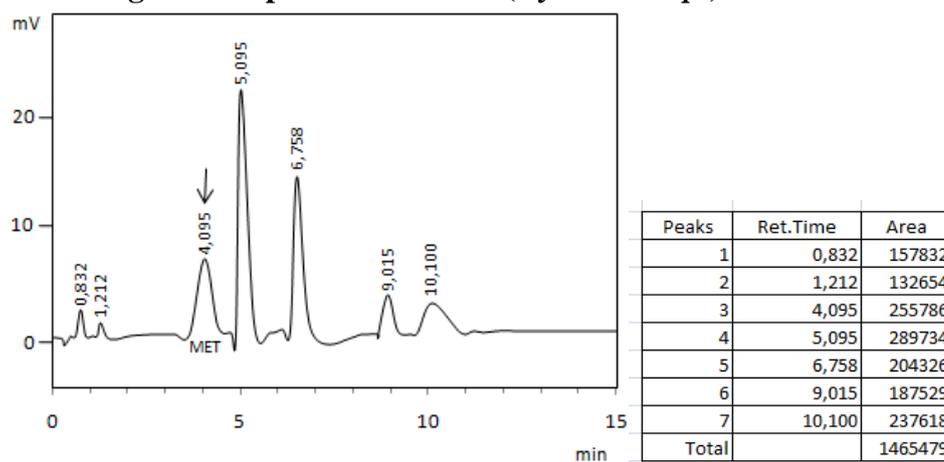
Kromatogram standar metformin 6 ppm



Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (→GRD 4); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

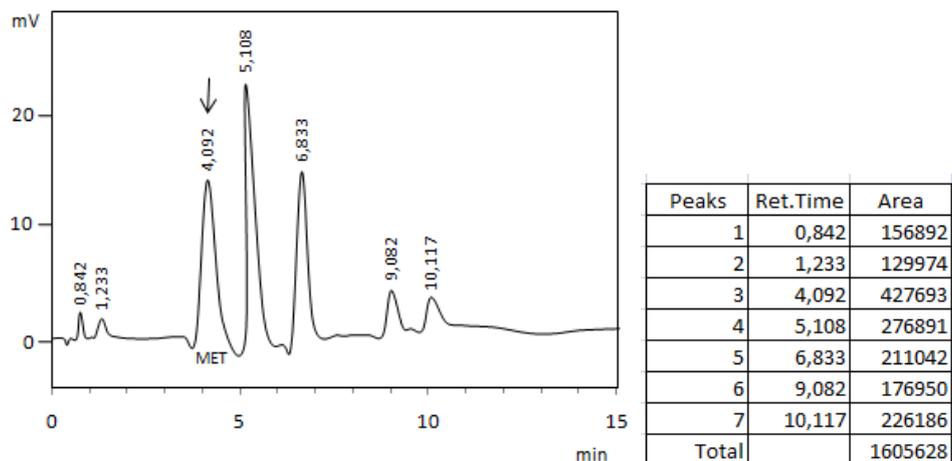
Kromatogram sampel undur-undur (*myrmeleon sp.*)



Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (GRD 4); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Kromatogram *Spiking* metformin 6 ppm dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*)



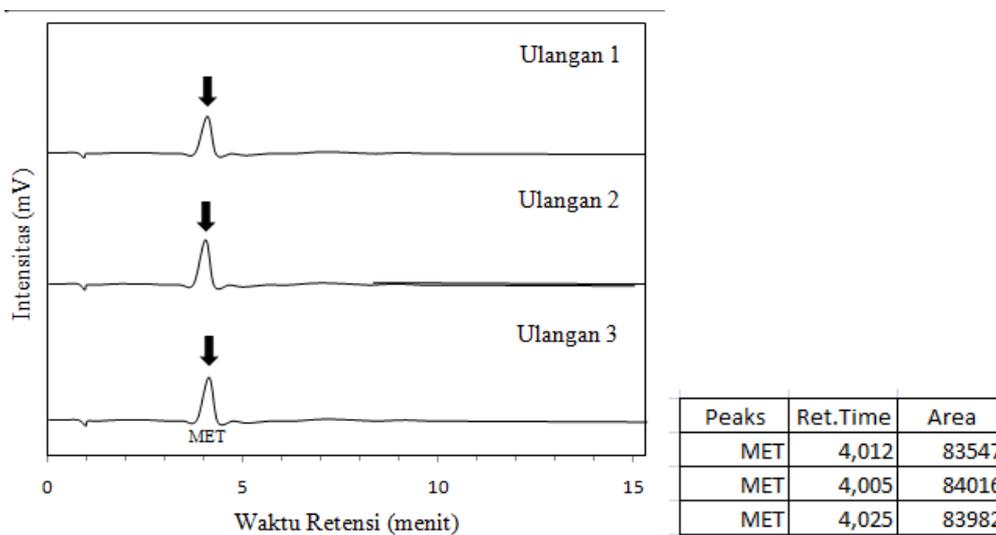
Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (GRD 4); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

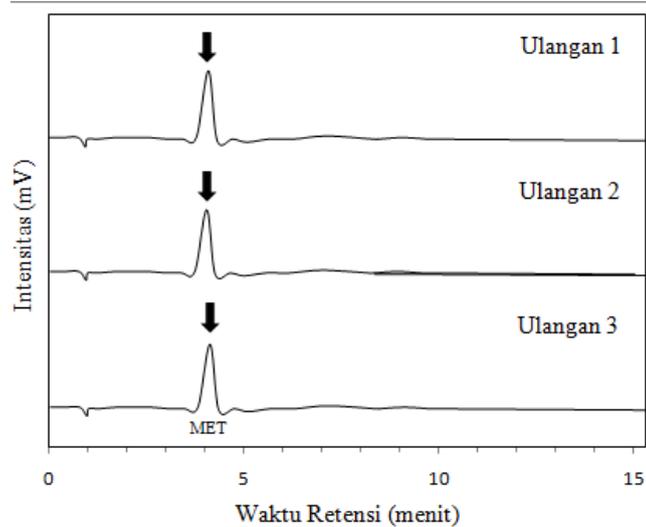
L.7 Validasi metode analisis kualitatif KCKT

L.7. 1 Penentuan tingkat linieritas

Kromatogram standar MET 3 ppm (n=3)

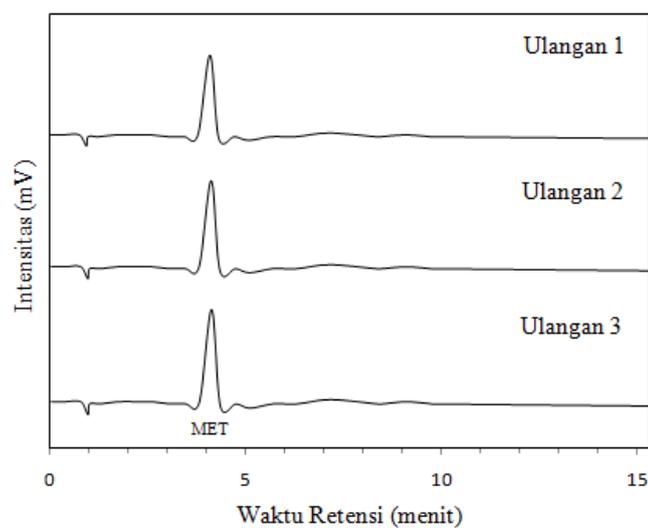


Kromatogram standar MET 6 ppm (n=3)



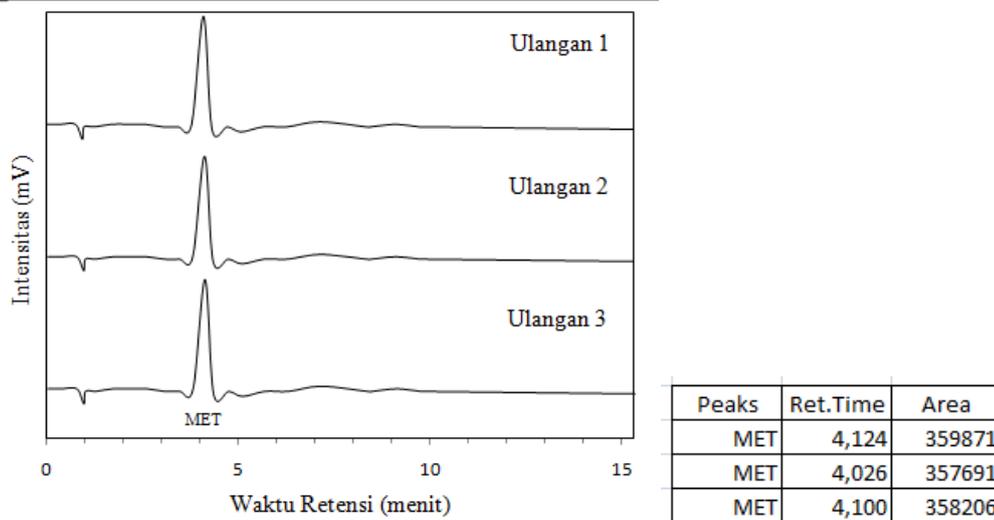
Peaks	Ret.Time	Area
MET	4,042	198361
MET	4,001	197928
MET	4,054	198219

Kromatogram standar MET 9 ppm (n=3)



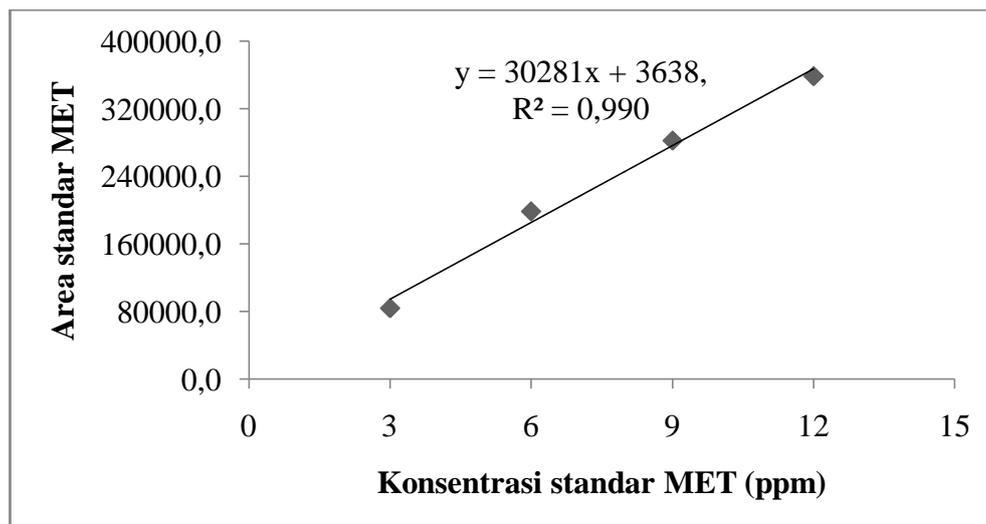
Peaks	Ret.Time	Area
MET	4,024	281032
MET	4,031	283124
MET	4,025	282973

Kromatogram standar MET 12 ppm (n=3)



Konsentrasi (ppm)	Area			Area rata-rata (A=ppm)	Simpangan Baku (SB)
	1	2	3		
3	83547	84016	83982	83848,3	261,5
6	198361	197928	198219	198169,3	220,7
9	281032	283124	282973	282376,3	1166,7
12	359871	357691	358206	358589,3	1139,4

Kurva baku



L.7.2 Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Diketahui:

Slope (S) : 30281

Simpangan baku (SB): 697,1

Ditanya LOD dan LOQ?

Jawab:

$$Q = \frac{k.SB}{S} \rightarrow \text{LOD} = \frac{3 \times 697,1}{30281} = 0,07 \text{ ppm dan LOQ} = \frac{10 \times 697,1}{30281} = 0,23 \text{ ppm}$$

L.7.3 Penentuan % recovery

Ulangan 1

$$\begin{aligned} \% \text{ Recovery} &= \frac{\text{Area spiking} - \text{Area sampel}}{\text{Area standar}} \times 100\% \\ &= \frac{427693 - 255786}{198361} \times 100\% \\ &= 86,7 \% \end{aligned}$$

Ulangan 2

$$\begin{aligned} \% \text{ Recovery} &= \frac{\text{Area spiking} - \text{Area sampel}}{\text{Area standar}} \times 100\% \\ &= \frac{451032 - 255786}{198361} \times 100\% \\ &= 98,4 \% \end{aligned}$$

Ulangan 3

$$\begin{aligned} \% \text{ Recovery} &= \frac{\text{Area spiking} - \text{Area sampel}}{\text{Area standar}} \times 100\% \\ &= \frac{439877 - 255786}{198361} \times 100\% \\ &= 92,8 \% \end{aligned}$$

$$\% \text{ Recovery rata-rata} = \frac{86,7 + 98,4 + 92,8}{3} = 92,6 \%$$

Konsentrasi terukur

(a) Sebelum spiking

$$\begin{aligned} \text{Faktor respon} &= \frac{\text{Area standar}}{\text{Konsentrasi standar}} \\ &= \frac{198361}{6} \\ &= 33060,17 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [\text{metformin}]_{\text{sampel}} &= \frac{\text{Area sampel}}{\text{faktor respon}} \\ &= \frac{255786}{33060,17} \\ &= 7,74 \text{ ppm} \end{aligned}$$

(b) Setelah spiking

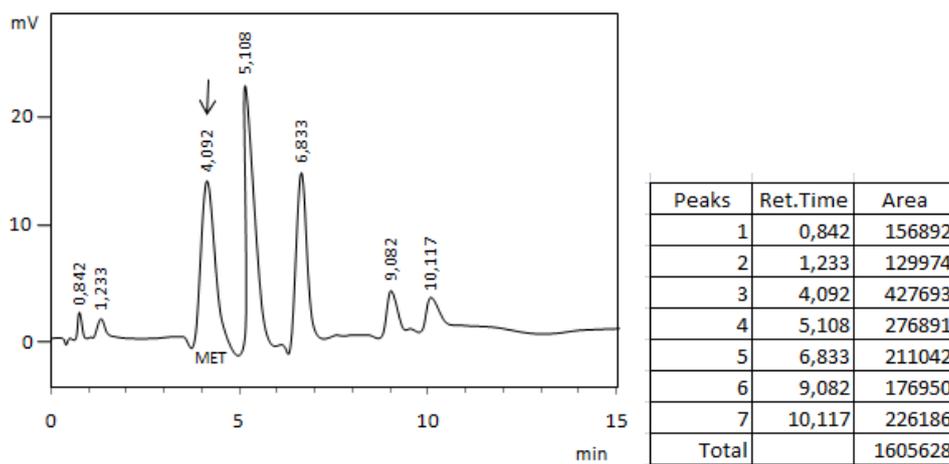
$$C_s = \frac{8,93+7,86+8,34}{3} = 8,38 \text{ ppm}$$

Catatan: Data diperoleh dari lampiran L.6 dan L.8.1

L.8 Analisis kuantitatif metformin dalam ekstrak metanol undur-undur (*myrmeleon sp.*)

L.8.1 Metode Spiking

a. Kromatogram *spiking* ulangan 1



Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (GRD 4); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

Konsentrasi standar MET (C_{std}) : 6 ppm

Area MET dalam sampel sebelum *spiking* (A_s) : 255786

Area MET setelah *spiking* (A_{total}) : 427693

Ditanya: Konsentrasi MET dalam sampel (C_s)?

Jawab:

$$A_{std} = A_{total} - A_s$$

$$\frac{C_s}{C_{std}} = \frac{A_s}{A_{std}}$$

$$\frac{C_s}{C_{std}} = \frac{A_s}{A_{total} - A_s}$$

$$C_s = C_{std} \times \frac{A_s}{A_{total} - A_s}$$

$$C_s = 6 \text{ ppm} \times \frac{255786}{427693 - 255786}$$

$$C_s = 6 \text{ ppm} \times \frac{255786}{171907}$$

$$C_s = 8,93 \text{ ppm}$$

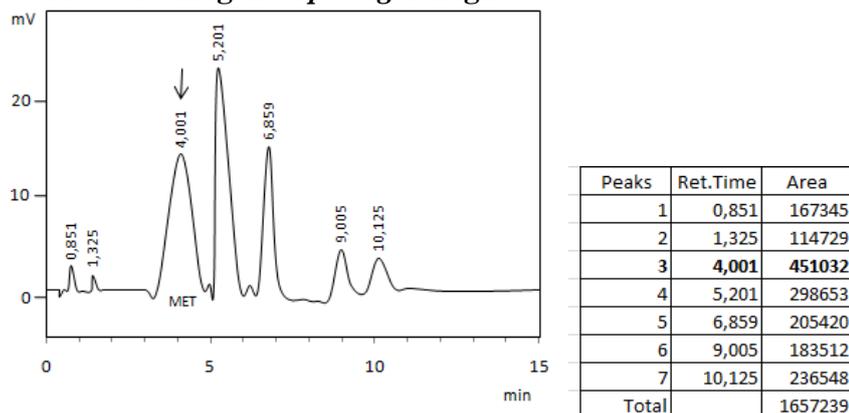
Dari HPLC diperoleh konsentrasi metformin dari ekstrak metanol *myrmeleon sp.* sebesar 8,93 ppm dalam 16 mL pelarut metanol. Sehingga apabila dalam 1 L pelarut metanol terkandung metformin sebesar:

$$\frac{16}{1000} \times 8,93 \text{ ppm} = 0,143 \text{ mg (dalam 232 mg sampel myrmeleon sp.)}$$

Sehingga apabila dalam 1 g sampel *myrmeleon sp.* maka konsentrasi metformin sebesar:

$$\frac{1000}{232} \times 0,143 \text{ mg} = \mathbf{0,616 \text{ mg/g}}$$

b. Kromatogram *spiking* ulangan 2



Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (GRD 4); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

Konsentrasi standar MET (C_{std}) : 6 ppm

Area MET dalam sampel sebelum *spiking* (A_s) : 255786

Area MET setelah *spiking* (A_{total}) : 451032

Ditanya: Konsentrasi MET dalam sampel (C_s)?

Jawab:

$$A_{std} = A_{total} - A_s$$

$$\frac{C_s}{C_{std}} = \frac{A_s}{A_{std}}$$

$$\frac{C_s}{C_{std}} = \frac{A_s}{A_{total} - A_s}$$

$$C_s = C_{std} \times \frac{A_s}{A_{total} - A_s}$$

$$C_s = 6 \text{ ppm} \times \frac{255786}{451032 - 255786}$$

$$C_s = 6 \text{ ppm} \times \frac{255786}{195246}$$

$$C_s = 7,86 \text{ ppm}$$

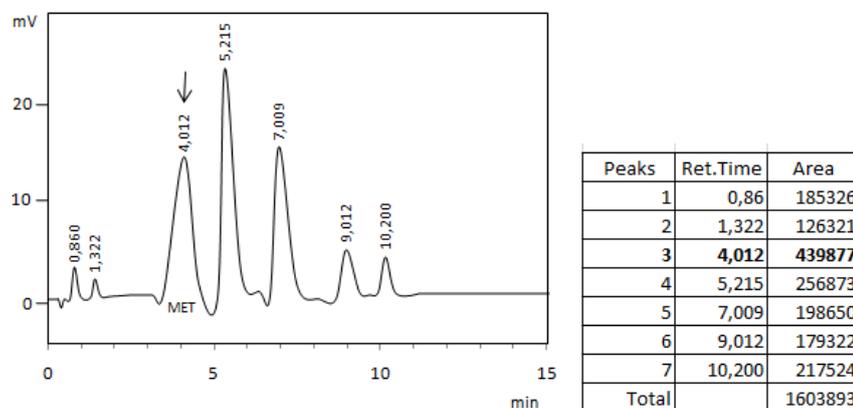
Dari HPLC diperoleh konsentrasi metformin dari ekstrak metanol *myrmeleon sp.* sebesar 7,86 ppm dalam 16 mL pelarut metanol. Sehingga apabila dalam 1 L pelarut metanol terkandung metformin sebesar:

$$\frac{16}{1000} \times 7,86 \text{ ppm} = 0,126 \text{ mg (dalam 232 mg sampel myrmeleon sp.)}$$

Sehingga apabila dalam 1 g sampel *myrmeleon sp.* maka konsentrasi metformin sebesar:

$$\frac{1000}{232} \times 0,126 \text{ mg} = \mathbf{0,543 \text{ mg/g}}$$

c. Kromatogram *spiking* ulangan 3



Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (GRD 4); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

Konsentrasi standar MET (C_{std}) : 6 ppm

Area MET dalam sampel sebelum *spiking* (A_s) : 255786

Area MET setelah *spiking* (A_{total}) : 439877

Ditanya: Konsentrasi MET dalam sampel (C_s)?

Jawab:

$$A_{std} = A_{total} - A_s$$

$$\frac{C_s}{C_{std}} = \frac{A_s}{A_{std}}$$

$$\frac{C_s}{C_{std}} = \frac{A_s}{A_{total} - A_s}$$

$$C_s = C_{std} \times \frac{A_s}{A_{total} - A_s}$$

$$C_s = 6 \text{ ppm} \times \frac{255786}{439877 - 255786}$$

$$C_s = 6 \text{ ppm} \times \frac{255786}{184091}$$

$$C_s = 8,34 \text{ ppm}$$

Dari HPLC diperoleh konsentrasi metformin dari ekstrak metanol *myrmeleon sp.* sebesar 8,34 ppm dalam 16 mL pelarut metanol. Sehingga apabila dalam 1 L pelarut metanol terkandung metformin sebesar:

$$\frac{16}{1000} \times 8,34 \text{ ppm} = 0,133 \text{ mg (dalam 232 mg sampel } myrmeleon sp.)$$

Sehingga apabila dalam 1 g sampel *myrmeleon sp.* maka konsentrasi metformin sebesar:

$$\frac{1000}{232} \times 0,133 \text{ mg} = \mathbf{0,573 \text{ mg/g}}$$

Berdasarkan data analisis dari tiga kali pengulangan diperoleh nilai konsentrasi MET dari HPLC dengan metode *spiking* yaitu 0,616; 0,543 dan 0,573 mg/g. Sehingga dapat ditentukan nilai rata-rata (\bar{x}) dari $[MET]_{\text{sampel } myrmeleon sp.}$, standar deviasi (S) dan *relative standar deviation* (RSD).

$$a. \quad \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3}{n} = \frac{0,616 + 0,543 + 0,573}{3} = 0,577 \text{ mg/g}$$

$$b. \quad S = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$= \sqrt{\frac{(0,616 - 0,577)^2 + (0,543 - 0,577)^2 + (0,573 - 0,577)^2}{3-1}}$$

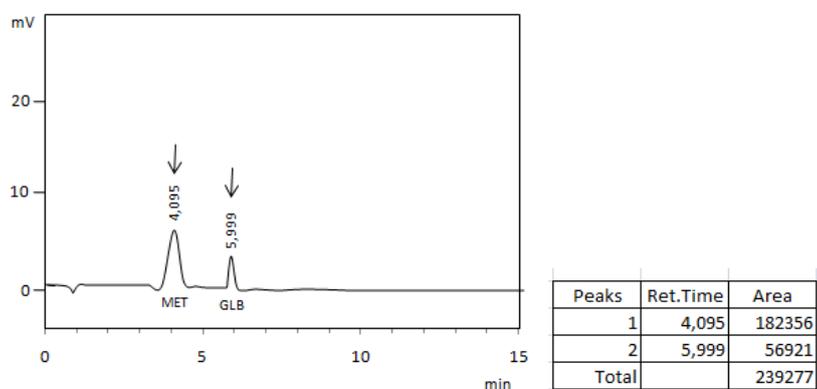
$$= \sqrt{\frac{(0,039)^2 + (-0,034)^2 + (-0,004)^2}{2}}$$

$$\begin{aligned}
 &= \sqrt{\frac{0,002+0,001+0,00002}{2}} \\
 &= \sqrt{\frac{0,003}{2}} \\
 &= \sqrt{0,002} \\
 &= 0,040
 \end{aligned}$$

$$c. \quad RSD = \frac{100 \cdot S}{\bar{x}} = \frac{100 \cdot 0,04}{0,577} = 6,93 \%$$

L.8.2 Metode Standar Internal

a. Penentuan faktor respon internal



Kromatogram standar glibenklamid 3 ppm dalam metformin 6 ppm

Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (GRD 4); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

[GLB] (Konsentrasi glibenklamid (standar internal)) : 3 ppm

[MET] (Konsentrasi metformin) : 6 ppm

A_{GLB} (Area glibenklamid) : 39847

A_{MET} (Area metformin) : 182356

Ditanya faktor respon internal?

Jawab:

$$\begin{aligned}
 \text{Faktor respon internal} &= \frac{\text{Area}_{GLB} \times [\text{MET}]}{[\text{GLB}] \times \text{Area}_{MET}} \\
 &= \frac{56921 \times 6 \text{ ppm}}{3 \text{ ppm} \times 182356} \\
 &= \frac{341526}{547068} \\
 &= 0,624
 \end{aligned}$$

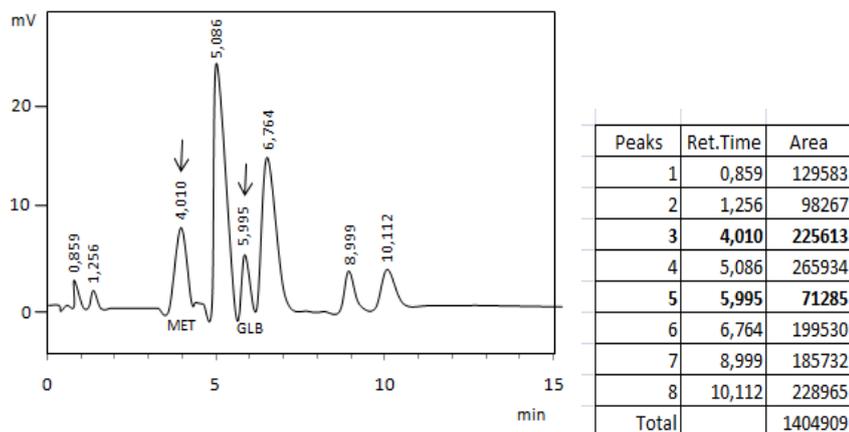
b. Penentuan konsentrasi metformin dalam undur-undur (*myrmeleon sp.*)

Ekstrak metanol *myrmeleon sp.*

- Dipipet 5 mL
- Dimasukkan dalam botol
- Ditambahkan larutan standar internal glibenklamid 1000 ppm sebanyak 15 μ L
- Dihomogenkan dan disonikasi selama 300 detik

Larutan standar glibenklamid 3 ppm dalam ekstrak metanol *myrmeleon sp.*

1) Ulangan 1



Kromatogram sampel *myrmeleon sp.* dengan standar internal glibenklamid
Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (GRD 4); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

[GLB] (Konsentrasi glibenklamid (standar internal)): 3 ppm

A_{GLB} (Area glibenklamid) : 71285

A_{MET} (Area metformin) : 225613

Faktor respon internal : 0,624

Ditanya konsentrasi MET dalam *myrmeleon sp.*?

Jawab:

$$\begin{aligned}
 [MET]_{\text{sampel myrmeleon sp.}} &= \frac{[GLB] \times Area_{MET} \times \text{faktor respon internal}}{Area_{GLB}} \\
 &= \frac{3 \text{ ppm} \times 225613 \times 0,624}{71285} \\
 &= 5,93 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

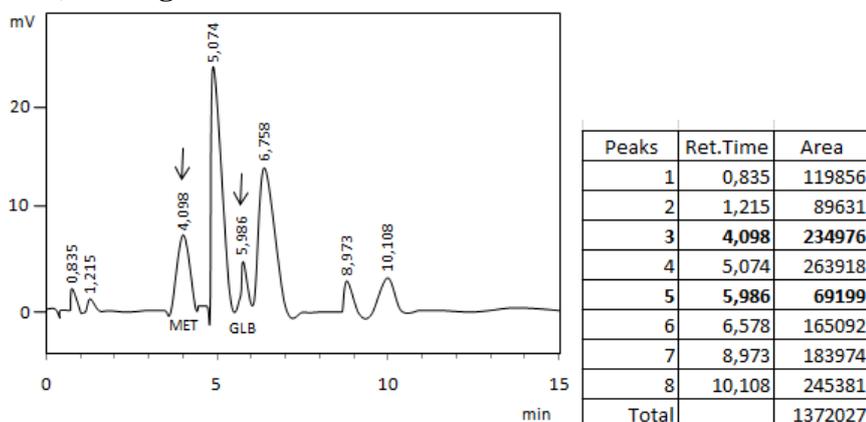
Dari KCKT diperoleh konsentrasi metformin dari ekstrak metanol *myrmeleon sp.* sebesar 5,93 ppm dalam 16 mL pelarut metanol. Sehingga apabila dalam 1 L pelarut metanol terkandung metformin sebesar:

$$\frac{16}{1000} \times 5,93 \text{ ppm} = 0,095 \text{ mg (dalam 232 mg sampel myrmeleon sp.)}$$

Sehingga apabila dalam 1 g sampel *myrmeleon sp.* maka konsentrasi metformin sebesar:

$$\frac{1000}{232} \times 0,095 \text{ mg} = 0,410 \text{ mg/g}$$

2) Ulangan 2



Kromatogram sampel *myrmeleon sp.* dengan standar internal glibenklamid
Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (GRD 4); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

[GLB] (Konsentrasi glibenklamid (standar internal)): 3 ppm

A_{GLB} (Area glibenklamid) : 69199

A_{MET} (Area metformin) : 234976

Faktor respon internal : 0,624

Ditanya konsentrasi MET dalam *myrmeleon sp.*?

Jawab:

$$\begin{aligned}
 [MET]_{\text{sampel myrmeleon sp.}} &= \frac{[GLB] \times Area_{MET} \times \text{faktor respon internal}}{Area_{GLB}} \\
 &= \frac{3 \text{ ppm} \times 234976 \times 0,624}{69199} \\
 &= 6,36 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

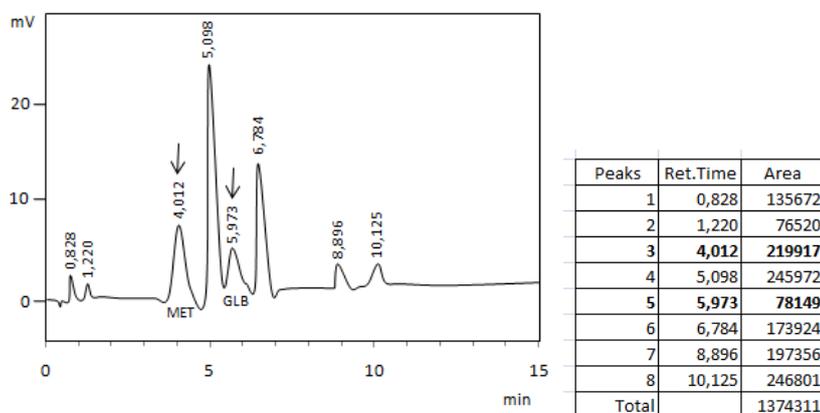
Dari KCKT diperoleh konsentrasi metformin dari ekstrak metanol *myrmeleon sp.* sebesar 6,36 ppm dalam 16 mL pelarut metanol. Sehingga apabila dalam 1 L pelarut metanol terkandung metformin sebesar:

$$\frac{16}{1000} \times 6,36 \text{ ppm} = 0,102 \text{ mg (dalam 232 mg sampel myrmeleon sp.)}$$

Sehingga apabila dalam 1 g sampel *myrmeleon sp.* maka konsentrasi metformin sebesar:

$$\frac{1000}{232} \times 0,102 \text{ mg} = 0,440 \text{ mg/g}$$

3) Ulangan 3



Kromatogram sampel *myrmeleon sp.* dengan standar internal glibenklamid
Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (GRD 4); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

[GLB] (Konsentrasi glibenklamid (standar internal)): 3 ppm

A_{GLB} (Area glibenklamid) : 78149

A_{MET} (Area metformin) : 219917

Faktor respon internal : 0,624

Ditanya konsentrasi MET dalam *myrmeleon sp.*?

Jawab:

$$\begin{aligned}
 [MET]_{\text{sampel myrmeleon sp.}} &= \frac{[GLB] \times Area_{MET} \times \text{faktor respon internal}}{Area_{GLB}} \\
 &= \frac{3 \text{ ppm} \times 219917 \times 0,624}{78149} \\
 &= 5,28 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

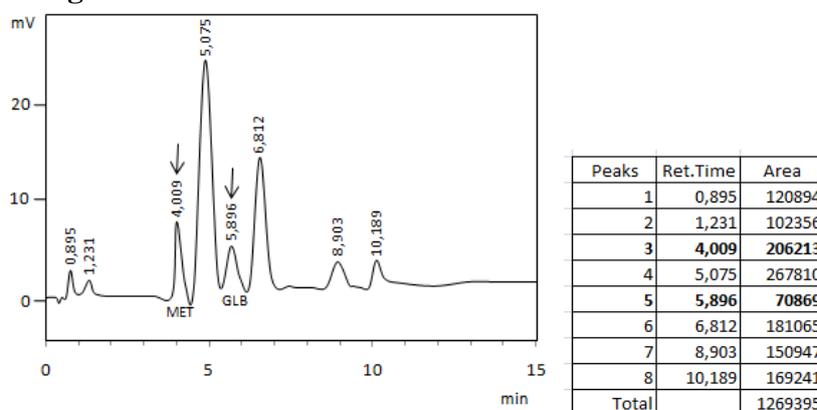
Dari KCKT diperoleh konsentrasi metformin dari ekstrak metanol *myrmeleon sp.* sebesar 5,28 ppm dalam 16 mL pelarut metanol. Sehingga apabila dalam 1 L pelarut metanol terkandung metformin sebesar:

$$\frac{16}{1000} \times 5,28 \text{ ppm} = 0,084 \text{ mg (dalam 232 mg sampel } myrmeleon \text{ sp.)}$$

Sehingga apabila dalam 1 g sampel *myrmeleon sp.* maka konsentrasi metformin sebesar:

$$\frac{1000}{232} \times 0,084 \text{ mg} = 0,360 \text{ mg/g}$$

4) Ulangan 4



Kromatogram sampel *myrmeleon sp.* dengan standar internal glibenklamid

Kondisi analisis:

Kolom C-18 250Lx4,6 mm; eluen metanol:air (GRD 4); Laju alir 0,5 mL/min; λ 233 nm; dan V. sampel 2 μ L

Diketahui:

[GLB] (Konsentrasi glibenklamid (standar internal)): 3 ppm

A_{GLB} (Area glibenklamid) : 70869

A_{MET} (Area metformin) : 206213

Faktor respon internal : 0,624

Ditanya konsentrasi MET dalam *myrmeleon sp.*?

Jawab:

$$\begin{aligned}
 [MET]_{\text{sampel } myrmeleon \text{ sp.}} &= \frac{[GLB] \times Area_{MET} \times \text{faktor respon internal}}{Area_{GLB}} \\
 &= \frac{3 \text{ ppm} \times 206213 \times 0,624}{70869} \\
 &= 5,45 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

Dari KCKT diperoleh konsentrasi metformin dari ekstrak metanol *myrmeleon sp.* sebesar 5,45 ppm dalam 16 mL pelarut metanol. Sehingga apabila dalam 1 L pelarut metanol terkandung metformin sebesar:

$$\frac{16}{1000} \times 5,45 \text{ ppm} = 0,087 \text{ mg (dalam 232 mg sampel } myrmeleon \text{ sp.)}$$

Sehingga apabila dalam 1 g sampel *myrmeleon sp.* maka konsentrasi metformin sebesar:

$$\frac{1000}{232} \times 0,087 \text{ mg} = 0,380 \text{ ppm}$$

Berdasarkan data analisis dari empat kali pengulangan diperoleh nilai konsentrasi MET dari KCKT yaitu 0,410; 0,440; 0,360 dan 0,380 mg/g. Sehingga dapat ditentukan nilai rata-rata (\bar{x}) dari $[MET]_{\text{sampel } myrmeleon \text{ sp}}$, standar deviasi (S) dan *relative standar deviation* (RSD).

$$d. \quad \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_4}{n} = \frac{0,41 + 0,44 + 0,36 + 0,38}{4} = 0,398 \text{ mg/g}$$

$$e. \quad S = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2 + (x_4 - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$= \sqrt{\frac{(0,41 - 0,398)^2 + (0,44 - 0,398)^2 + (0,36 - 0,398)^2 + (0,38 - 0,398)^2}{4-1}}$$

$$= \sqrt{\frac{(0,012)^2 + (0,042)^2 + (-0,038)^2 + (-0,018)^2}{3}}$$

$$= \sqrt{\frac{0,0001 + 0,0017 + 0,0014 + 0,0003}{3}}$$

$$= \sqrt{\frac{0,0035}{3}}$$

$$= \sqrt{0,0012}$$

$$= 0,035$$

$$f. \quad RSD = \frac{100 \cdot S}{\bar{x}} = \frac{100 \cdot 0,035}{0,4} = 8,75 \%$$