

**PENETAPAN KADAR FLAVONOID KUERSETIN EKSTRAK KULIT
BUAH APEL HIJAU (*Pyrus malus L.*) DENGAN MENGGUNAKAN
METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

Andika Nugraha¹⁾, MT. Ghozali²⁾

¹⁾Mahasiswa Farmasi FKIK, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

²⁾Dosen Farmasi FKIK, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

ABSTRACT

Apple (*Pyrus malus, L*) is a fruit having much uses for health containing phytochemical and flavonoid substances. One of the substances contained in apple rind is quercetin. Quercetin is the largest group of a flavonol, quercetin and glycosides are the amount approximately 60 - 75% of flavonoid. Sample preparation conducted with the technique of using ethanol 70% extraction solvents and maceration for five days continued re-maceration. Determining of quercetin in green apple peel extracts made by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using mobile phase methanol : water (59:41), using C18 column (250 x 4,6 mm), detection UV at a wavelength of 371 nm, and water rate 1,2 mL/menit. Based on the linearity test obtained from the calibration curve correlation coefficient of 0.999 with the linearity regression $Y = 48820,280x - 4075,605$. Average quercetin concentration in green apple peel extracts is 0,017%.

Keywords : Apple, Flavonoid, HPLC, Quercetin

ABSTRAK

Buah Apel (*Pyrus malus, L*) merupakan buah yang memiliki banyak kegunaan dalam kesehatan, yang mengandung zat fitokimia dan flavonoid. Salah satu zat yang terkandung dalam kulit buah apel adalah kuersetin. Kuersetin adalah senyawa kelompok flavonol terbesar, kuersetin dan glikosidanya berada dalam jumlah sekitar 60-75 % dari flavonoid. Preparasi sampel dilakukan dengan teknik ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 70%. Penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak kulit buah apel hijau dilakukan dengan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan C-18 (250 x 4,6 mm) dengan detektor spektrofotometer UV pada panjang gelombang 371 nm dengan fase gerak Methanol : Air (59: 41), laju air 1,2 ml/menit. Hasil analisis menunjukkan waktu retensi 6,138 menit yang didapat dengan persamaan regresi linier $y = 47572x$. Kadar rata-rata kuersetin dalam ekstrak etanol kulit buah apel hijau adalah 0,0143 %.

Kata Kunci : Buah Apel, Flavonoid, KCKT, Kuersetin

PENDAHULUAN

Indonesia terkenal dengan kekayaan alam yang memiliki berbagai jenis tumbuhan yang berkhasiat sebagai obat. Obat tradisional telah dikenal dan digunakan secara turun-temurun oleh masyarakat Indonesia. Pemanfaatan obat tradisional pada umumnya lebih diutamakan untuk menjaga kesehatan, meskipun pemanfaatannya ada pula ditujukan sebagai pengobatan suatu penyakit (Suharmiati, *et al.*, 2003).

Buah apel (*Pyrus malus L.*) merupakan tanaman yang biasa tumbuh di iklim sub tropis (Soelarso, 1997). Khasiat buah apel (*Pyrus malus L.*) sangat bermanfaat untuk kesehatan diantaranya menurunkan kolesterol darah, menurunkan tekanan darah, meningkatkan HDL, memperlancar pencernaan, menjaga kesehatan jantung (Waji, 2009), mengeluarkan toksin yang ada dalam tubuh, menjaga kestabilan sistem imun dan memperlancar peredaran darah (Soelarso, 1997).

Kuersetin merupakan golongan flavonoid dilaporkan menunjukkan beberapa aktivitas biologi. Aktivitas ini dikaitkan dengan sifat antioksidan kuersetin, antara lain karena kemampuan menangkap radikal bebas dan spesi oksigen reaktif seperti anion superoksida dan radikal hidroksil (Morikawa, *et al.*, 2003; Schmalhausen, *et al.*, 2007). Kuersetin menunjukkan efek proteksi terhadap tukak lambung yang diinduksi etanol, melalui penghambatan peroksidasi lipid dan peningkatan aktivitas enzim-enzim antioksidan (Coskun, *et al.*, 2004).

Aktivitas farmakologi flavonoid khususnya senyawa kuersetin yang begitu potensial, menimbulkan keinginan peneliti

untuk mengetahui kandungan kuersetin yang terdapat dalam ekstrak kulit buah apel hijau dengan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

Adapun tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut : untuk mengetahui bagaimana cara uji kualitatif dan kuantitatif flavonoid kuersetin dari ekstrak kulit hijau (*Pyrus malus. L.*) dengan menggunakan metode KCKT, untuk mengetahui apakah didalam kulit buah apel hijau (*Pyrus malus. L.*) terdapat senyawa flavonoid kuersetin, untuk mengetahui kadar flavonoid kuersetin yang terdapat pada ekstrak kulit buah apel hijau (*Pyrus malus. L.*).

METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa alat-alat gelas (Pyrex[®]) yang lazim digunakan, batang pengaduk, cawan petri, freezer (Sanyo[®] freezer HF-S6L), kertas saring, kompor listrik, labu erlenmeyer, mikropipet ukuran 1000 μ L dan 10 -100 μ L, tabung reaksi, saringan (Corong Buchner), sentrifuge (K-Centrifuge[®] plc series PLC-05), sonikator (Elmasonik S 30 H[®]), spektrofotometer (Shimadzu[®] UV-1800), detektor UV-Vis (Shimadzu[®] SPD-20A Uv-Vis), kolom fase diam KCKT (Shimadzu[®] Shim-pack VP-ODS 250Lx4,6 μ m), *vacum rotary evaporator* (IKA[®] RV10), vortex (Labinco L46[®]), dan *water bath*.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa: kulit kering buah Apel hijau (*Pyrus malus. L.*) yang sudah dideterminasikan di Laboratorium Unit II Biologi Farmasi, Universitas Gadjah

Mada, metanol 70% (ekstraksi), dan standar flavonoid kuersetin.

Cara Kerja

Pengeringan Buah Apel hijau : Preparasi ekstraksi kering (simplisia) yaitu buah apel hijau dicuci bersih, kemudian dikupas kulitnya. Setelah itu diambil kulitnya, lalu dikeringkan selama 7 hari dibawah sinar matahari. Kemudian didapatkan simplisia kering kulit buah apel hijau. Simplisia kering itu kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak (disaring untuk menyeragamkan partikel simplisia).

Pembuatan Ekstrak Buah Apel hijau : Ekstrak dibuat dengan cara maserasi menggunakan metanol 70%. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 50 gram kemudian dilarutkan dalam 250 mL metanol 70% dalam bejana kaca dan diaduk sampai homogen. Proses ini (maserasi) dilakukan selama 5 hari dan digojok setiap pagi, siang dan sore. Hari ke-5, dilakukan penyaringan dan remaserasi dengan menambahkan 125 mL metanol 70% selama 2 hari dengan perlakuan sama. Hari ke-2 remaserasi dilakukan penyaringan. Hasil penyaringan (filtrat) maserasi dan remaserasi dicampur dan diuapkan menggunakan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak yang kental. Tuangkan dalam cawan porselin, dipanaskan dengan kompor listrik dan dibantu dengan kipas angin sambil terus diaduk juga suhu tetap di kontrol dengan termometer. Proses ini untuk menguapkan etanol sehingga diperoleh ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%.

Pembuatan Larutan Baku Standar Kuersetin : Larutan standar kuersetin dibuat dengan melarutkan standar kuersetin dengan methanol dan

disonikator selama 15 menit, lalu disaring dengan *membrane filter* 0,22 μm . Hasil pembuatan larutan standar kuersetin mendapatkan hasil yang larut dan siap digunakan untuk analisis ke dalam sistem KCKT.

Preparasi Standar dan Sampel : Untuk preparasi standar hal yang pertama dilakukan adalah standar kuersetin ditimbang sebanyak 10,0 mg. Kemudian standar tersebut dilarutkan ke dalam labu takar 10 mL dengan pelarut methanol hingga tanda (Kadar kuersetin menjadi 1 mg/mL atau 1000 $\mu\text{g/mL}$). Lalu larutan induk 1000 $\mu\text{g/mL}$ diambil sebanyak 1 mL dilarutkan ke dalam labu takar 10 mL dengan pelarut metanol hingga tanda (Kadar kuersetin menjadi 100 $\mu\text{g/mL}$). Dibuat kurva baku dari larutan induk 100 $\mu\text{g/mL}$ dengan cara memipet 10; 30; 60; 120; 240; dan 480 μL dilarutkan ke dalam labu takar 10 mL dengan pelarut metanol hingga tanda (kadar larutan standar menjadi 0,1; 0,3; 0,6; 1,2; 2,4; dan 4,8 $\mu\text{g/mL}$). Kemudian saring larutan dengan membran filter 0,22 μm . Injeksikan masing-masing larutan kedalam sistem KCKT sebanyak 20 μL . Selanjutnya untuk preparasi sampel ditimbang 25,0 mg sampel, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga 10 mL. Saring larutan sampel dengan membran filter 0,22 μm . Kemudian injeksikan filtrat sampel kedalam sistem KCKT sebanyak 20 μL . Lakukan replikasi minimal 5 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini buah apel hijau yang digunakan seperti diperlihatkan pada Gambar 1. Tanaman ini biasa tumbuh di iklim sub tropis. Pengambilan buah apel hijau berasal dari Pasar Kranggan Kota Yogyakarta. Untuk memastikan kebenarannya tumbuhan ini telah

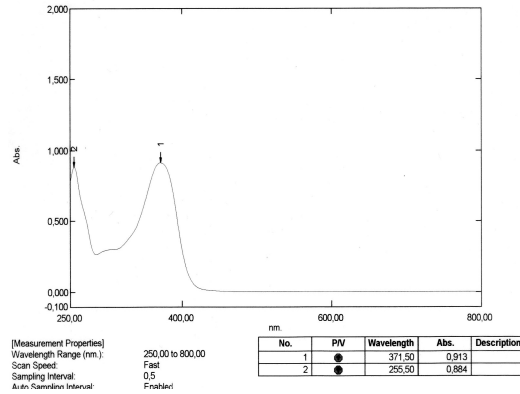
dideterminasikan di bagian Biologi Farmasi oleh Bapak Djoko Santosa, S.Si., M.Si, Universitas Gadjah Mada.



Gambar 1. Buah Apel Hijau (*Pyrus malus L.*)

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 50 gram kemudian dilarutkan dalam 250 mL metanol 70% dalam bejana kaca dan diaduk sampai homogen. Proses ini (maserasi) dilakukan selama 5 hari dan digojok setiap pagi, siang dan sore. Tujuan penggojogan ini adalah cairan pelarut akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan pelarut dengan konsentrasi rendah (proses difusi).

Penentuan Panjang Gelombang Pengukuran Baku Standar Kuersetin: Penentuan panjang gelombang pengukuran standar kuersetin dibuat menggunakan spektrofotometer UV antara panjang gelombang 250 – 800 nm. Standar kuersetin memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 371,50 nm dengan absorbansi 0,913 dan digunakan pada pendeteksian hasil analisis dengan KCKT. Hasil *scanning* panjang gelombang dapat dilihat pada Gambar 2.

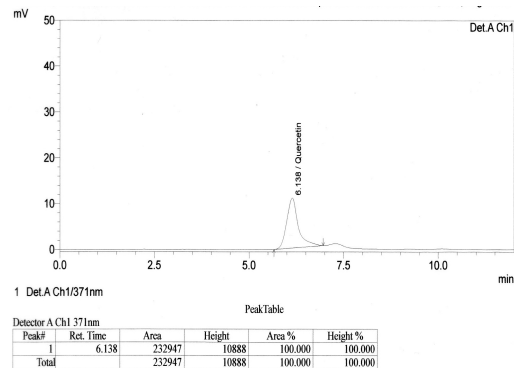


Gambar 2. Scanning Panjang Gelombang

Optimasi Sistem KCKT : Sistem KCKT yang digunakan untuk analisis kuersetin adalah sebagai berikut (Bharti, *et al.*, 2012) :

KCKT: Shimadzu ; Fase diam : Kolom C-18 (250 x 4,6 mm): Fase gerak Methanol : Air (59 :41) Kecepatan alir : 1,2 ml/menit ; Volume injeksi (*loop*) : 20 μ L ; Detektor : UV 371 nm

Hasil optimasi dalam analisis senyawa kuersetin didapatkan waktu retensi 6,138 menit. Kromatogram yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Optimasi KCKT

Kurva Kalibrasi :Uji linearitas dilakukan pada seri larutan standar kuersetin dengan konsentrasi kuersetin 0; 0,1; 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 dan 4,8 μ g/mL. Hubungan antara kadar kuersetin dengan luas area memberikan persamaan garis $y = 47572x$

dengan koefisien korelasi (r^2) 0,9978, dimana y adalah luas area yang terbentuk (AUC) dan x adalah kadar kuersetin ($\mu\text{g/mL}$). Tabel linieritas dan kurva kalibrasi standar kuersetin dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 4.

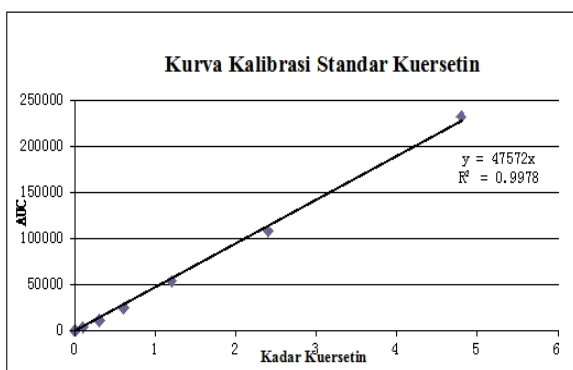
Tabel 1. Tabel Linieritas Standar

Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Area Kuersetin
0	0
0,1	3950
0,3	10995
0,6	24806
1,2	53727
2,4	108032
4,8	232947
Slope (B)	47572
Intercept (A)	0
Koefisien Korelasi (r^2)	0,9978

Hasil dari penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak kulit buah apel hijau diperoleh sebesar 0,0143% b/b. Penetapan kadar kuersetin dari hasil luas area yang didapat dari kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sampel yang digunakan untuk menetapkan kadar flavonoid kuersetin dalam kulit buah apel ini adalah hasil ekstrak kental yang sudah dilakukan rotary. Volume tiap injeksi adalah 20 μL . Pembuatan sampel untuk analisis KCKT dilakukan dengan mengencerkan 1 kali masing-masing sampel.

Sampel yang telah diencerkan selanjutnya dianalisis dengan KCKT. Dari hasil KCKT tersebut hanya didapatkan beberapa puncak, hal ini dikarenakan panjang gelombang yang digunakan pada 371 nm. Kemungkinan senyawa yang bisa terdeteksi pada panjang gelombang tersebut hanya beberapa Senyawa-senyawa lain kemungkinan mempunyai rentang panjang gelombang yang berbeda.

Penetapan kadar kuersetin dari hasil luas area sebesar 17033 yang didapat dari kromatografi (KCKT) ini didapatkan 0,0143% b/b yang berarti tiap 100 gram



ekstrak kulit buah apel hijau mengandung 0,0143 gram kuersetin.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Uji kualitatif dan kuantitatif flavonoid kuersetin dapat dilakukan dengan menggunakan KCKT fase terbalik yang dilengkapi detektor spektrofotometer UV.
2. Kulit buah apel (*Pyrus malus* L.) positif mengandung senyawa flavonoid kuersetin.
3. Senyawa flavonoid kuersetin ekstrak kulit buah apel hijau yang dianalisis dengan KCKT diperoleh kadar rata-rata sebesar 0,0143% b/b

Saran dari penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian dengan jenis buah apel lainnya.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang kandungan yang lain yang terdapat dalam apel selain kuersetin.

DAFTAR PUSTAKA

- Bharti, J., Eradatmand, AD., and Rashmi, R., 2012, Quantitative analysis of quercetin in *Pueraria tuberosa* by using high performance liquid chromatography, *J Chem Bio Phy Sci* 2 (4) : 1688 - 1692.
- Coskun, O., Kanter, M., Armutcu, F., Cetin, K., Kaybolmaz, B., and Yazgan, O., 2004, Protective effects of quercetin, a flavonoid antioxidant, in absolute

ethanol- induced acut gastric ulcer. *Eur. J. Gen. Med.* , 1(3), 37-42.

Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi, K., and Yoshikawa, T., Kumazawa, Y., and Morikawa, S., 2003, Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats . *Life Sci.* , 26(6), 709-21.

Resi Agestia Waji, 2009, *Kimia Organik Bahan Alam Flavonoid (Quersetin)*, makalah, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Makassar.

Soelarso, Bambang, 1997, *Budidaya Apel*, Yogyakarta : Kanisius.