

STANDARISASI SEDIAAN DAUN SELEDRI (*Apium graveolens* L.) SECARA KLT- DENSITOMETRI MENGGUNAKAN APIGENIN SEBAGAI PARAMETER

STANDARDIZATION OF CELERY LEAVES PREPARATION (*Apium graveolens* L.) BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHIC – DENSITOMETRY USING APIGENIN AS PARAMETER

Djarmiko M. * dan Pramono S. **

* P.T. Phapros Tbk Semarang dan ** Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada,
Yogyakarta

ABSTRAK

Dalam rangka penerapan metode standarisasi terhadap sediaan obat tradisional secara tepat, telah dilakukan tahap-tahap standarisasi suatu sediaan daun seledri (*Apium graveolens* L.) secara KLT – densitometri dengan kandungan aktif apigenin sebagai parameter standar sediaan yang berindikasi antihipertensi.

Penetapan linearitas, batas deteksi minimal dan presisi apigenin pembanding dilakukan dengan metode KLT – densitometri menggunakan fase diam silica gel GF 254 dan fase gerak kloroform – methanol – air (70 – 30 – 6,5 v/v) pada serapan maksimal 340 mm. Akurasi penetapan kadar ditetapkan sebelum dilakukan penetapan kadar sediaan dengan apigenin sebagai parameter.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode KLT – densitometri menunjukkan linearitas ($r = 0,9994$) dan presisi (koefisien variasi : 6,6 %) yang baik untuk apigenin pembanding dengan baik, deteksi minimal 3 µg. Akurasi penetapan kadar mencapai 89,6%.Kadar apigenin dalam sediaan kapsul yang diuji adalah 0,017%.

Kata Kunci : *Apium graveolens* L. , apigenin, KLT – densitometri.

ABSTRACT

In order to apply a standardization method on herbal medicines or pharmaceuticals, a thin layer chromatographic-densitometry was used to determine apigenin as the active constituent of celery extract formulated in a capsule dosage form.

Silica gel GF 254 and chloroform – methanol – water (70 – 30 – 6,5 v/v) were used as stationary and mobile phases, respectively. The areas of apigenin were evaluated at 340 mm using a TLC-Scanner.

The limit of detection was 3 µg and the accuracy was 89,6% after first extraction procedure applied on celery capsules. The apigenin content was 0,017 %.

Key Words : *Apium graveolens* L., apigenin, TLC – densitometry.

PENDAHULUAN

Apium graveolens L. dikenal dengan nama daerah seledri, merupakan tumbuhan suku Apiaceae atau Umbelliferae yang tumbuh di ketinggian 1000 – 1500 meter diatas permukaan laut. Daun tumbuhan ini, selain digunakan sebagai sayur penyedap masakan, telah secara turun temurun digunakan sebagai obat tradisional untuk hipertensi, gout, penambah nafsu makan (Perry, 1980). Kandungan kimia yang telah dilaporkan termasuk dalam golongan minyak atsiri, flavonoid, kumarin, karbohidrat.

Salah satu senyawa flavonoid yang turut berperan sebagai kandungan aktif antihipertensi adalah apigenin, suatu flavon dengan gugus hidroksi bebas pada atom karbon nomor 5,7 dan 4' (Duke, 2001). Dalam rangka program standarisasi sediaan fitofarmaka yang mengandung daun seledri telah dilakukan standarisasi sediaan kapsul dengan apigenin sebagai parameter kadar dan ditetapkan secara KLT-densitometri, sesuai dengan ketentuan Departemen Kesehatan tentang parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat (Anonim, 2000). Parameter standar ini telah diterapkan pada berbagai tumbuhan obat (Pramono, dkk, 2000).

METODOLOGI

Bahan.

Apigenin sebagai baku pembanding diperoleh dari laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Sediaan kapsul yang mengandung daun seledri diperoleh dari pasaran. Bahan kimia untuk ekstraksi dan kromatografi lapis tipis berupa etanol, lempeng silica gel GF 254, fase gerak kloroform; metanol; air (70 - 20 - 10 v/v) berderajad pro analisa buatan E.Merck.

Penetapan spesifisitas apigenin baku pembanding.

Dibuat profil kromatogram pada KLT dan spektrofotometri UV-vis dengan berbagai pereaksi diagnostik yaitu natrium hidroksida, natrium asetat, asam borat, aluminium klorida, asam klorida. Data spectra dibandingkan dengan data yang ada pada buku *The Systematic Identification of Flavonoids* (Mabry, dkk, 1970)

Analisis apigenin

Ditimbang seksama apigenin baku pembanding 10 mg. Dilarutkan dalam 10 ml metanol p.a. dalam labu takar. Sejumlah 10 µl, 20µl, 15 µl, 7 µl dan 12 µl larutan apigenin baku ditotolkan dengan menggunakan pipet Langendorf pada lempeng silica gel GF 254, kemudian dieluasi menggunakan fase gerak kloroform-metanol-air (70 : 30 : 6,5, v/v) dengan jarak rambat 8 cm. Sebelum diukur data kromatogramnya, dilakukan lebih dahulu deteksi dengan lampu UV 254, UV 366 dan uap amoniak guna mengetahui lokasi bercak.

Penetapan batas deteksi minimal apigenin.

Sejumlah 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, dan 5 µl larutan baku pembanding apigenin ditotolkan dan dikembangkan pada system kromatogram seperti sebelumnya dan diukur secara KLT- densitometri. Konsentrasi yang masih dapat dideteksi dengan KLT-densitometer dicatat luas puncak bercaknya untuk menetapkan batas deteksi minimal.

Penetapan presisi apigenin pembanding.

Sejumlah 20 µl larutan apigenin baku pembanding ditotolkan pada lempeng silica gel GF 254 dan diulangi berjajar sebanyak 5 totolan, kemudian dikembangkan dengan system seperti sebelumnya. Luas puncak masing-masing bercak dicatat dengan KLT-densitometer untuk melihat presisi penetapan kadarnya.

Penetapan akurasi apigenin dalam sediaan seledri.

Sediaan yang akan dianalisis ditimbang sebanyak 5,0 gram, ditambah metanol 7 ml dalam tabung reaksi tertutup, ultrasonik selama 20 menit. Saring dengan kertas saring ke dalam labu takar. Cuci serbuk dengan metanol secukupnya sehingga volume larutan menjadi 10,0 ml (sari pertama). Masukkan kembali serbuk bahan uji yang telah diekstraksi ke dalam tabung reaksi, tambahkan 7 ml metanol, kemudian ultrasonik selama 20 menit. Saring dengan kertas saring pertama ke dalam labu takar. Cuci serbuk dengan metanol

secukupnya sehingga volume menjadi 10,0 ml (sari kedua). Totolkan sejumlah 20 µl sari pertama dan kemudian pada titik penotolan kedua sejumlah 20 µl sari kedua. Sistem kromatogram yang digunakan sama dengan sebelumnya. Catat luas puncak secara KLT- densitometri.

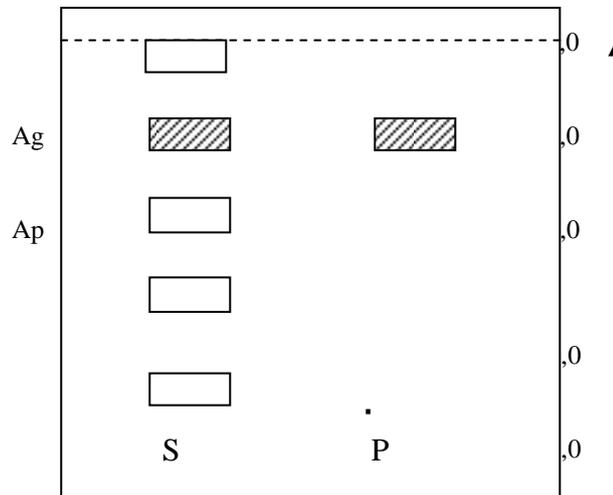
Penetapan kadar apigenin dalam sediaan seledri.

Sejumlah 20 µl sari pertama sediaan yang diperoleh pada penetapan akurasi apigenin ditotolkan pada titik penotolan kedua setelah pada titik penotolan pertama ditotolkan 20 µl larutan baku pembanding apigenin. Pada titik penotolan ketiga dan keempat ditotolkan kembali sebagai ulangan sejumlah 20 µl sari pertama sediaan yang diuji. Catat luas puncak masing-masing bercak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Spesifikasi apigenin baku pembanding.

Data Kromatogram apigenin baku pembanding dan sediaan daun seledri dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram lapis tipis silika gel GF 254, fase gerak kloroform : metanol : air (70 : 30 : 6,5 v/v). Deteksi UV 366 nm

S = Sediaan daun seledri P = Pembanding Apigenin
Ag = Apigenin Ap = Apiin

Spesifikasi data tersebut adalah fase diam Silika gel GF 254, fase gerak Kloroform – Metanol - Air (70 : 30 : 6,5), Rf. 0,70; fluoresensi ungu gelap berubah coklat kekuningan dengan uap amoniak.

Tabel I. Spektra UV-vis apigenin baku pembandingan

	Data - I		Data -II	
	Metanol	340,4	-	264,4
NaOH	379,6	-	265,6	-
Na Asetat	499,2	-	280,2	338,8
H ₃ BO ₃	340,4	-	268,4	-
Al Cl ₃	343,2	380,8	276,4	298,4
AlCl ₃ /HCl	342,0	373,2	275,6	-

Penetapan linearitas apigenin.

Tabel II. Data pengukuran luas puncak apigenin pada penetapan linearitas.

No.	µl	Kedudukan	Luas Puncak	Kadar Luas Puncak Relatif (%)
1	10	18,7	16,918	15,6
2	20	34,5	32,646	30,2
3	15	47,4	25,356	23,5
4	7	59,2	12,850	11,8
5	12	70,4	20,384	18,9
Total			=	100,0

Setelah dihitung diperoleh persamaan garis lurus :

$$Y = bx + a \quad \text{menjadi} = Y = 1,545 + 1,857$$

$$a = 1,857$$

$$b = 1,545$$

$$Y = 1,545 x + 1,857$$

Koefisien korelasi $r = 0,999$

Hasil penetapan batas deteksi minimal apigenin

Tabel. III. Data luas puncak kromatogram pada berbagai kadar yang ditotolkan.

No.	µl	Kedudukan	Luas Puncak	Kadar Luas Puncak Relatif (%)
1.	1	3,4 mm	-	-
2.	2	11,2 mm	-	-
3.	3	19,8 mm	6,304	18,9
4.	4	28,7 mm	11,978	35,9
5.	5	36,2 mm	14,992	45,0
Total			33,275	99,8 %

Terlihat pada data yang terekam bahwa batas volume penotolan larutan baku yang masih dapat terdeteksi dengan KLT-densitometri adalah 3 µl yang setara dengan 3 µg apigenin. Hal ini mempunyai arti bahwa jika dalam suatu sediaan yang akan ditetapkan mempunyai kandungan apigenin kurang dari 3 µg harus ditimbang sejumlah bahan uji sedemikian sehingga setelah ekstraksi dan ditotolkan kadarnya harus lebih dari 3 µg dihitung sebagai apigenin.

Penetapan presisi apigenin

Tabel IV. Data hasil penetapan presisi apigenin berdasarkan luas puncak masing-masing bercak.

No.	Kedudukan	Luas Puncak	Kadar Luas Puncak Relatif (%)
1.	61,3	22,356	17,9
2.	73,2	27,980	22,4
3.	85,0	23,080	18,5
4.	96,2	23,560	18,8
5.	108,4	23,598	18,9
	Total	120,577	96,50 %

Rerata luas puncak (x) ± SD = 24,115 ± 1,586

$$\text{Koefisien variasi} = \frac{\text{SD}}{x} \times 100\% = \frac{1,586}{24,115} \times 100\% = 6,6\%$$

Dilihat dari Koefisien variasi yang hanya 6,6 % menunjukkan bahwa penetapan kadar apigenin secara KLT - densitometri mempunyai tingkat presisi yang baik.

Hasil penetapan akurasi apigenin dalam sediaan seledri

Tabel V. Contoh data hasil penetapan akurasi apigenin dalam sediaan seledri yang diperiksa.

No.	Kedudukan	Luas Puncak	Kadar Luas Puncak Relatif (%)
1.	24,7	184,577	89,6
2.	41,2	112,34	7,9
3.	-	-	-
		Total	97,5

Pada percobaan yang diulang sebanyak 3 kali diperoleh prosentase relatif seperti terlihat pada tabel VI.

Tabel VI. Prosentase relatif apigenin yang terekstrasi

No.	Pengulangan	Ekstraksi Pertama	Ekstraksi Kedua	Ekstraksi Ketiga
1.	1	88,9 %	8,1 %	-
2.	2	89,6 %	7,9 %	-
3.	3	89,5 %	7,9 %	-
	Rerata	89,3	8,0	-

Terlihat bahwa dengan cara ekstraksi menggunakan metanol, diperoleh kadar apigenin yang tersari pada penyarian pertama mencapai 89,6 %, sedangkan pada penyarian kedua terhadap sisa bahan uji sebesar 8,0. Hal ini menunjukkan bahwa jika penetapan kadar sediaan dilakukan dengan sekali ekstraksi maka hasilnya harus dikalikan 100 dibagi 89,3. Jika diinginkan ekstraksi total maka harus dilakukan dua kali guna mencapai 100 % sehingga benar-benar mencerminkan keseluruhan kadar apigenin dalam sediaan.

Hasil penetapan kadar apigenin dalam sediaan seledri.

Penetapan kadar apigenin dalam sediaan dapat dilakukan melalui penggunaan kurva baku atau dengan perbandingan luas puncak secara langsung antara bercak apigenin dari sediaan dan baku pembanding

yang ditotolkan dalam satu lempeng dan dieluasi bersama. Berdasarkan pengalaman, cara kedua memberikan hasil yang lebih tepat.

Tabel VII. Data hasil penetapan luas puncak apigenin dalam sediaan seledri.

No.	Kedudukan	Luas Puncak	Kadar Luas Puncak Relatif (%)
1.	18,0	666,564	79,9 (Pembanding)
2.	33,6	51,217	6,1 N1
3.	46,8	59,113	7,0 N2
4.	58,5	56,810	6,8 N3

Jika luas puncak apigenin dalam sediaan dipurata

$$\frac{N1 + N2 + N3}{3} = \frac{6,1 + 7,0 + 6,8}{3} = 7,3$$

Kadar apigenin dalam sediaan dapat dihitung berdasarkan rumus =

$$\frac{As}{Ap} \times \frac{Cp}{Cs} \% = \frac{7,3}{79,9} \times \frac{0,1}{50} = 0,017 \%$$

- As = luas puncak sample
- Ap = luas puncak pembanding
- Cp = kadar pembanding
- Cs = kadar uji.

Jika dilihat kadar apigenin dalam sediaan yang relatif kecil, timbul pertanyaan tentang efektivitas sediaan tersebut sebagai obat anti hipertensi. Akan tetapi pertanyaan ini dapat terjawab oleh kenyataan bahwa flavonoid yang bertanggung jawab terhadap efek penurunan tekanan darah tidak hanya apigenin dan di dalam daun seledri terdapat flavonoid lain seperti apiin, luteolin, isoquersitrin dan sebagainya yang dalam pustaka disebutkan juga mempunyai efek tekanan darah (Duke, 2001). Oleh sebab itu disarankan untuk standarisasi sediaan seledri kalau kaitannya dengan efek penurun tekanan darah dilengkapi dengan penetapan kadar flavonoid total secara spektrofotometri (Masruhen, 2000).

KESIMPULAN.

Apigenin dapat digunakan sebagai parameter standarisasi sediaan daun seledri secara KLT-densitometri, presisi dan akurasi yang baik, dengan batas deteksi 3 µg.

Disarankan untuk melengkapi metode standarisasi dengan penetapan kadar total flavonoid dalam sediaan.

DAFTAR PUSTAKA.

Anonim, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Dep.Kes. RI, Jakarta, 37-38.
 Duke, 2001, *Phytochemical Database*, Beltsville Agricultural Research Centre, Beltsville, Maryland, (<http://www.ars-grin.gov/cgi-in/duke/pharmacy-scroll-3.pl>).
 Perry L.M, 1980, *Medicinal Plants of East and Southeast Asia*, The Mitch Press, Massachusetts, 413.
 Pramono S, Bayumurti Y, Santoso D, 2000, *Penetapan Bilangan Parameter Standarisasi Mutu Ekstrak Simplisia Cabe Jawa*, Laporan Uji Laboratorium, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta, 24-29.

Djatmiko M.

- Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M. B., 1970, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer Verly; Berlin, 18-25.
- Masruhen, 2000, Perbandingan Kadar Flavonoid dan Daya Antihipertensi Sari etanol 50 % Daun dan Biji Seledri (*Apium graveolus* L.) Terhadap Tekanan Darah Sistemik Kucing Dianestesi, *Skripsi*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta, 10 - 11.