



**METODE ANALISIS *THYMOQUINONE*
DALAM LARUTAN DAPAR FOSFAT pH 7,4 SECARA *ULTRA
HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UHPLC)***

Skripsi

Untuk melengkapi syarat-syarat guna memperoleh gelar Sarjana Farmasi

Disusun Oleh :

Lisa Elgania Putri

1604019017



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF.DR.HAMKA
JAKARTA
2019**

Skripsi dengan Judul

**METODE ANALISIS THYMOQUINONE
DALAM LARUTAN DAPAR FOSFAT PH 7,4 SECARA *ULTRA*
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UHPLC)**

Telah disusun dan dipertahankan di hadapan penguji oleh :

Lisa Elgania Putri, NIM 1604019017

Tanda Tangan

Tanggal

Ketua

Wakil Dekan I

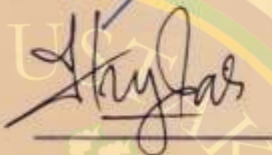
Drs. Inding Gusmayadi, M.Si., Apt.



14/5/19

Penguji I

Hariyanti, M.Si., Apt.



14-03-2019

Penguji II

Dr. Supandi, M.Si., Apt.



11-03-2019

Pembimbing I

Kori Yati, M.Farm., Apt.



11-03-2019

Pembimbing II

Almawati Situmorang, M.Farm., Apt.



13-03-2019

Mengetahui:

Ketua Program Studi

Kori Yati, M.Farm., Apt.



16/3.19

Dinyatakan lulus pada tanggal: **16 Februari 2019**

Abstrak

METODE ANALISIS *THYMOQUINONE* DALAM LARUTAN DAPAR FOSFAT pH 7,4 SECARA *ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (UHPLC)

**Lisa Elgania Putri
1604019017**

Thymoquinone adalah senyawa aktif yang terdapat dalam jinten hitam (*Nigella sativa* L) yang memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi. Senyawa aktif dari bahan alam memerlukan metode analisis yang valid. Prosedur analisis membutuhkan larutan dapar untuk keberhasilan pengujian. Tujuan penelitian ini untuk validasi metode analisis *thymoquinone* dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 menggunakan *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC). Kondisi kromatografi terdiri dari fase gerak metanol - dapar fosfat pH 7,4 (65:35) dan fase diam kolom C18, laju alir 1,0 mL/menit, volume penyuntikan 1 μ L pada λ 258 nm. Hasil analisis diperoleh waktu retensi 1,309 menit. Nilai *Limit of Detection* (LOD) dan *Limit of Quantification* (LOQ) adalah 5,4235 μ g/mL dan 16,4349 μ g/mL. Nilai linieritas yang $r= 0.9991$, %*recovery* 94,5551%. Uji presisi konsentrasi 16,224 ppm, 40,56 ppm, dan 76,05 ppm nilai %RSD sebesar 0,4021%, 0,3299%, dan 0,3748%. Hasil validasi metode analisis telah memenuhi persyaratan Farmakope Edisi V yang ditetapkan sehingga dapat digunakan untuk analisis *thymoquinone* dalam larutan dapar fosfat pH 7,4.

Kata kunci : *Thymoquinone*, UHPLC, Validasi Metode.

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat-Nya kepada penulis, sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi dengan judul: **METODE ANALISIS THYMOQUINONE DALAM LARUTAN DAPAR FOSFAT pH 7,4 SECARA ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UHPLC)**.

Penulisan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi persyaratan guna memperoleh gelar sarjana farmasi pada Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka, Jakarta.

Terselesaikannya penelitian dan skripsi ini tidak lepas dari dorongan dan uluran tangan berbagai pihak, terima kasih kepada yang terhormat:

1. Bapak Dr. Hadi Sunaryo, M.Si., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi dan Sains UHAMKA.
2. Bapak Drs. Inding Gusmayadi, M.Si., Apt., selaku Wakil Dekan I Fakultas Farmasi dan Sains UHAMKA.
3. Ibu Dra. Sri Nevi Gantini, M.Si., selaku Wakil Dekan II Fakultas Farmasi dan Sains UHAMKA.
4. Ibu Ari Widayanti, M. Farm., Apt., selaku Wakil Dekan III Fakultas Farmasi dan Sains UHAMKA.
5. Ibu Kori Yati, M. Farm., Apt., selaku Ketua Program Studi Fakultas Farmasi dan Sains UHAMKA dan Pembimbing I saya yang telah memberikan kemudahan dalam proses penyelesaian skripsi ini.
6. Ibu Almawati Situmorang, M. Farm., Apt., selaku pembimbing II yang telah memberi arahan, bimbingan, dan nasehat-nasehat yang sangat berarti selama penelitian serta terselesaikannya penyusunan skripsi ini.
7. Bapak *Kriana* Efendi, M.Farm., Apt., atas bimbingan dan nasihatnya selaku Pembimbing Akademik dan para dosen Fakultas Farmasi dan Sains UHAMKA yang telah memberikan ilmu, bimbingan, waktu, saran dan masukan-masukan yang berguna selama kuliah dan selama penulisan skripsi ini.
8. Terima kasih khususnya kepada kedua orang tuaku tercinta. Papaku Drs. Bahroni, M.M dan mamaku Nursilawati yang selalu menguat untuk terus belajar. Kepada abang arya dan adek cantika yang selalu ikut mendoakan serta memberikan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis sangat menyadari bahwa dalam melakukan penelitian serta penulisan skripsi ini masih sangat jauh dari sempurna. Untuk itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik dari pembaca untuk membangun dan menyempurnakan skripsi ini.

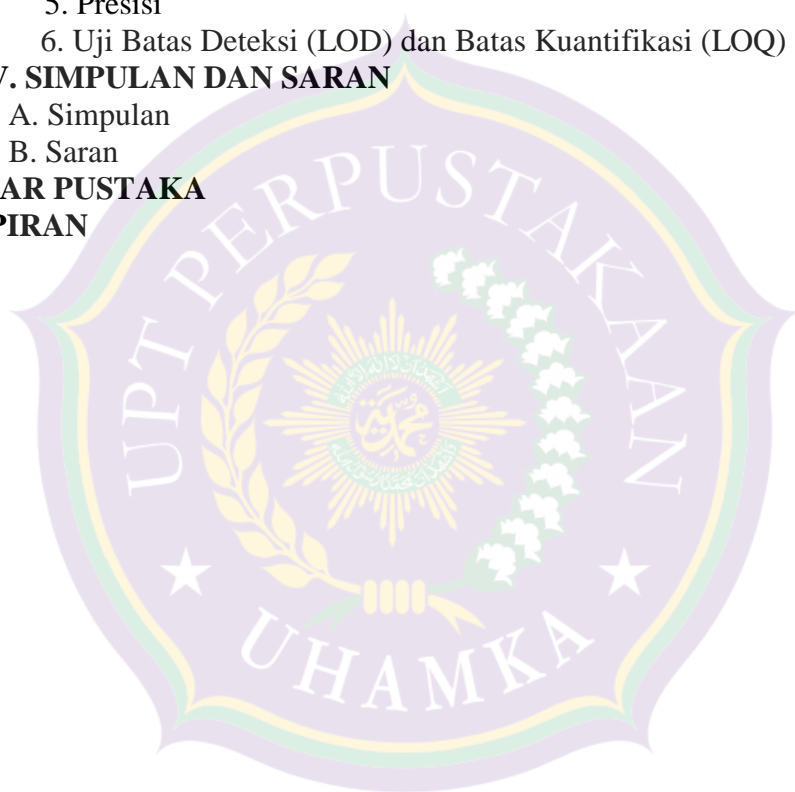
Jakarta, 16 Januari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
KATA PENGHANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Permasalahan Penelitian	2
C. Tujuan Penelitian	2
D. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Landasan Teori	4
1. <i>Thymoquinone</i>	5
2. Larutan Dapar	5
3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	5
4. <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> (UHPLC)	10
5. Kromatogram	11
6. Metode Validasi Analisis	13
B. Kerangka Berfikir	18
C. Hipotesis	18
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	19
A. Tempat Penelitian	19
B. Waktu Penelitian	19
C. Metode Penelitian	19
1. Alat Penelitian	19
2. Bahan Penelitian	19
D. Pola Penelitian	19
1. Persiapan Kondisi Pengerjaan	19
2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Timokuinon	20
3. Orientasi Fase Gerak	20
4. Validasi Metode Analisis	21
5. Analisa Data	21
E. Prosedur Penelitian	21
1. Uji Kesesuaian Sistem	21
2. Selektivitas	21
3. Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linieritas	22
4. Akurasi	22
5. Presisi	22
6. Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantifikasi (LOQ)	23
5. Analisa Data	24
1. Uji Kesesuaian Sistem	24

2. Selektivitas	24
3. Uji Linieritas	24
4. Akurasi	24
5. Presisi	24
6. Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantifikasi (LOQ)	25
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	26
A. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	26
B. Orientasi Fase Gerak Analisis Timokuinon	26
C. Validasi Metode Analisis Timokuinon	
1. Uji Kesesuaian Sistem	27
2. Selektivitas	29
3. Kurva Kalibrasi dan Linieritas	30
4. Akurasi	31
5. Presisi	32
6. Uji Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)	33
BAB V. SIMPULAN DAN SARAN	34
A. Simpulan	34
B. Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	37



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Persentasi Perolehan Kembali Konsentrasi Analit	14
Tabel 2. Hasil Orientasi Penetapan Fase Gerak	27
Tabel 3. Hasil Uji Kesesuaian Sistem Analisis <i>Thymoquinone</i>	28
Tabel 4. Hasil Uji Akurasi	31
Tabel 5. Hasil Uji Presisi	32
Tabel 6. Hasil LOD dan LOQ	33
Tabel 7. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum	38
Tabel 8. Nilai Konsentrasi dan Luas Area Kurva Kalibrasi	51
Tabel 9. Hasil Uji Linieritas	51
Tabel 10. Nilai Data Akurasi	52
Tabel 11. Hasil Uji Akurasi	54
Tabel 12. Hasil Uji Presisi	55
Tabel 13. Data Persamaan Regresi Linier dan Perhitungan LOD dan LOQ	58
Tabel 14. Data Hasil Perhitungan Uji Kesesuaian Sistem	60



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur <i>Thymoquinone</i>	4
Gambar 2. Instrumen UHPLC	10
Gambar 3. Puncak Kromatogram Asimetris	12
Gambar 4. Skema Alur Penelitian	20
Gambar 5. Serapan panjang gelombang maksimum <i>Thymoquinone</i>	26
Gambar 6. Kromatogram Blanko	29
Gambar 7. Kromatogram <i>Thymoquinone</i> standar	30
Gambar 8. Kurva Kalibrasi <i>Thymoquinone</i>	30
Gambar 9. Serapan maksimum panjang gelombang TQ	38
Gambar 10. Kurva Kalibrasi yang digunakan Uji Linieritas	51
Gambar 11. Foto Instrumen UHPLC	61
Gambar 12. Foto Tanggal Kalibrasi UHPLC	61
Gambar 13. Foto Kolom UHPLC	62
Gambar 14. pH Meter	63
Gambar 15. Foto Tanggal Kalibrasi pH Meter	63
Gambar 16. Foto Bahan <i>Thymoquinone</i> Standar	64
Gambar 17. Foto Metanol <i>Grade HPLC</i>	64

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1.	Sertifikat <i>Thymoquinone</i> 37
Lampiran 2.	Pengukuran λ Maksimum <i>Thymoquinone</i> 38
Lampiran 3.	Orientasi Fase Gerak Metanol - Dapaf fosfat 7,4 (60:40) 39
Lampiran 4.	Orientasi Fase Gerak Metanol - Dapaf fosfat 7,4 (65:35) 40
Lampiran 5.	Orientasi Fase Gerak Metanol - Dapaf fosfat 7,4 (70:30) 41
Lampiran 6.	Hasil Uji Selektivitas 42
Lampiran 7.	Hasil Uji Kesesuaian Sistem 43
Lampiran 8.	Kurva Kalibrasi 1 44
Lampiran 9.	Kurva Kalibrasi 2 45
Lampiran 10.	Kurva Kalibrasi 3 46
Lampiran 11.	Hasil Uji Akurasi 47
Lampiran 12.	Hasil Uji Presisi 48
Lampiran 13.	Perhitungan Larutan Standar Pembuatan Kurva Kalibrasi 49
Lampiran 14.	Hasil Uji Linieritas 51
Lampiran 15.	Perhitungan Konsentrasi Terukur untuk Akurasi dan Presisi 52
Lampiran 16.	Perhitungan Akurasi 54
Lampiran 17.	Perhitungan Presisi 55
Lampiran 18.	Perhitungan Y1 untuk LOD LOQ 57
Lampiran 19.	Perhitungan LOD LOQ 58
Lampiran 20.	Perhitungan Hasil Uji kesesuaian sistem 60
Lampiran 21.	Instrumen UHPLC yang Digunakan 61
Lampiran 22.	Kolom UHPLC 62
Lampiran 23.	Foto pH Meter 63
Lampiran 24.	Foto Standar <i>Thymoquinone</i> dan Metanol 64

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut telah memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Parameter validasi metode yang dianalisis menurut Farmakope Indonesia edisi V, yaitu akurasi, presisi, spesifikasi, batas deteksi, batas kuantifikasi, linieritas dan rentang (Departemen Kesehatan RI, 2014). Validasi metode dinyatakan valid untuk proses analisis apabila parameter yang diuji telah memenuhi kriteria persyaratan.

Metode analisis digunakan untuk menganalisis suatu zat, termasuk zat yang berasal dari bahan alam. Bahan alam yang biasa digunakan masyarakat Indonesia adalah jinten hitam (*Nigella sativa* L). Jinten hitam digunakan untuk mengobati beragam penyakit, antara lain gangguan pada saluran pernafasan, pencernaan, fungsi ginjal dan hati, jantung dan sistem kekebalan tubuh (BPOM RI, 2013). Zat yang terkandung dalam jinten hitam antara lain *thymoquinone* (Batool, 2018), protein, lemak, karbohidrat, saponin, terpen, alkaloid, nigellon, nigelamin, stigmaterol, tanin, dan asam lemak (BPOM RI, 2013).

Thymoquinone adalah kandungan utama dari jinten hitam yang memiliki aktivitas hepatoprotektif (Danladi *et al.*, 2013), antikanker (Rhandwa *et al.*, 2011), antitumor, antioksidan, antiinflamasi (Khader & Eckl, 2014) antibakteri (Randhawa *et al.*, 2017). Besarnya potensi yang dimiliki oleh *thymoquinone*, maka dapat dikembangkan sebagai senyawa aktif dalam industri bahan alam. Kandungan bahan alam dalam pengembangannya memerlukan suatu metode analisis yang memiliki selektivitas dan sensitifitas yang tinggi. Pada penelitian sebelumnya (Noor BR, 2016) telah melakukan validasi metode dan penetapan kadar *thymoquinone* dalam minyak biji jinten hitam menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Penelitian lainnya dilakukan yaitu uji kuantitatif *thymoquinone*, pada kandungan minyak biji komersial dan kapsul minyak biji dari Turki menggunakan instrumentasi HPLC (Isik S *et al.*, 2017).

Validasi metode *thymoquinone* yang telah dipublikasikan harus disesuaikan dengan keadaan laboratorium. Untuk mendapatkan hasil analisis yang optimal maka diperlukan metode lain untuk pengembangan metode dan analisis yang lebih sempurna. Pengembangan metode analisis dilakukan dengan bahan uji *thymoquinone* standar dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 secara *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC). Mengingat adanya perbedaan pelarut yang digunakan pada proses analisis dan instrumen yang digunakan lebih tinggi selektifitasnya maka dilakukan validasi parsial untuk mendapat data validasi dengan parameter linieritas, akurasi, presisi, selektifitas, batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ).

Validasi metode analisis *thymoquinone* pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan larutan dapar fosfat pH 7,4. Pemilihan pH 7,4 menyesuaikan pH normal darah manusia yang berada pada rentang 7,35-7,45 (Kemenkes RI, 2011). Penambahan larutan dapar digunakan dalam analisis untuk mempertahankan pH guna menunjang keberhasilan suatu pengujian (Departemen Kesehatan RI, 2014). Analisis senyawa *thymoquinone* harus menggunakan instrumen yang memiliki selektivitas yang tinggi, sehingga pada penelitian ini dilakukan analisis dengan metode *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC). UHPLC memiliki prinsip kerja sama seperti KCKT, perbedaannya terletak pada ukuran kolom dan tekanan yang diberikan.

B. Permasalahan Penelitian

Berdasarkan latar belakang diatas, dapat diidentifikasi permasalahan sebagai berikut :

1. Metode analisis yang sudah ada perlu dikembangkan untuk mendapatkan hasil yang lebih optimal.
2. Metode analisis harus disesuaikan dengan keadaan laboratorium.
3. Apakah validasi metode tersebut memenuhi kriteria penerimaan parameter uji validasi ?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapat metode analisis *thymoquinone* yang valid dalam larutan dapar fosfar pH 7,4 secara *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC).

D. Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini diharapkan diperoleh informasi tentang pengembangan metode analisis yang tepat untuk analisis *thymoquinone* dalam larutan dapar pH 7,4 secara *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) sehingga metode ini dapat digunakan untuk proses analisis *thymoquinone* dengan data yang lebih akurat serta dapat mengefisiensikan waktu dan biaya saat proses analisis.



DAFTAR PUSTAKA

- Ahlatci A, Kuzhan A, Taysi S, Demirtas OC, Alkis HE, Tarakcioglu M, Demirci A, Caglayan D, Saricicek E, Cinar K. (2014). Radiation-Modifying Abilities of *Nigella Sativa* and Thymoquinone On Radiation-Induced Nitrosative Stress In The Brain Tissue.
- Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, Damanhoury ZA, Anwar F. (2013). Therapeutic Potential on *Nigella sativa*: a Miracle Herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **3(1)** 340-341.
- Batool, A., Sultana, M., Gilani, P., & Javed, T. (2018). *International Journal of Pharma Sciences and Scientific Research*, **4(5)**, 49–61.
- BPOM RI. (2013). Serial Data Ilmiah Terkini Tumbuhhan Obat Jinten Hitam.
- Danladi, J. (2013). Hepatoprotective Effect of Black Seed (*Nigella sativa*) oil on Carbon Tetrachloride (CCl₄) Induced Liver Toxicity in Adult Wistar Rats. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, **4(3)**, 56–62.
- Departemen Kesehatan RI. (1995). *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. 1002-1010.
- Departemen Kesehatan RI. (2014). *Farmakope Indonesia*. Edisi V. Jakarta. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. 1531-1539, 1669- 1672.
- Karaçil Ermumucu, M. Ş., & Şanlıer, N. (2017). Black Cumin (*Nigella Sativa*) And Its Active Component Of Thymoquinone: Effects On Health. *Journal of Food and Health Science*, (January), 170–183.
- Gandjar IB, Rohman A. (2012). *Analisis Obat Secara Spektrofotometri dan Kromatografi*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 417-485.
- Gandjar IB, Rohman A. (2007). *Kimia Farmasi Analisa*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 330- 351.
- Goyal SN, Prajapati CP, Gore PR, Patil CR, Mahajan UB, Sharma C. (2017). *Therapeutic Potensial and Pharmaceutical Development of Thymoquinone A Multitargeted Molecul of Natural Origin*. **2(3)**. 11.
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. **(1)**, 117-131.
- Hussain S, Shaikh T. (2016). Ultra High Performance Liquid Chromatography. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 387, 389-390.
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thymoquinone> diakses pada tanggal 31 Januari 2018 pukul 22.16 WIB.

- Isik S, Kartal M, Erdem S. (2017). Quantitative Analysis of Thymoquinone in *Nigella sativa* L. (Black Cumin) Seed and Commercial Seed Oils and Seed Oil Capsules from Turkey. *Jurnal Fakultas Pharmacy of Ankara*. **41(1)**. Hlm. 34-41.
- Islam MT. (2016). Biological Activities and Therapeutic Promises of *Nigella sativa* L. *The International Journal of Pharma Science and Scientific Research*. 238.
- Kementrian Kesehatan RI. (2011). *Pedoman Interpretasi Data Klinik*. 31.
- Khader, M., & Eckl, P. M. (n.d.). Iranian Journal of Basic Medical Sciences Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications.
- Noor BR. (2016). Validasi Metode Analisis Timokuinon serta Penetapan Kadar Timokuinon dalam Minyak Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* L) Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). FKIK UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta. 8-36.
- Randhawa, M., Alenazy, A., Alrowaili, M., Basha, J. (2016). An Active Principle of *Nigella Sativa* L, Thymoquinone, Showed Significant Antimicrobial Activity Against Anaerobic Bacteria. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. **6(1)**, 97.-100.
- Randhawa MA, Alghandi MS. 2011. Anticancer Activity of *Nigella sativa* (Black Seed). *The American Journal of Chinese Medicine*. (39), 1077.
- Salmani, J. M. M., Asghar, S., Lv, H., & Zhou, J. 2014. Aqueous Solubility and Degradation Kinetics of the Phytochemical Anticancer Thymoquinone; Probing the Effects of Solvents, pH and Light. *Molecules*, 19(5), 19(5), 5925–5939.
- Seriano A, Bommel MV, Hallet J. 2011. Evaluation Between UHPLC and HPLC Analytical Methods For Characterizing Natural Dyestuffs. Cultural Heritage Agency Ministry of Education, Culture and Science.
- Susanti M, Dachriyus. (2010). *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Universitas Andalas. Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas, Padang, 9-12.
- Watson GD. Analisis Farmasi. EGG. Jakarta, 9-10.