

Pengujian Senyawa Marker Sebagai Kontrol Kualitas Produk Fitofarmaka: Studi Kasus Pada Produk Fitofarmaka Kelas Terapi Kardiovaskular

Farida Kurniawati^{a,1*}, Aan Risma Uli^{a,2}, Nany Bodrorini^{a,3}

^a Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional, Badan Pengawas Obat dan Makanan, Jl. Percetakan Negara No.23, Jakarta Pusat, 10560, Indonesia

¹ farida.kurniawati@pom.go.id*; ² risma.uli@pom.go.id; ³ nany.bodrorini@pom.go.id

* corresponding author

ARTICLE INFO

ABSTRACT / ABSTRAK

Article history

Received:
October 31, 2023

Revised:
March 22, 2024

Accepted:
March 28, 2024

DOI:
<https://doi.org/10.54384/eruditio.v4i1.185>

Pengawasan mutu produk fitofarmaka menjadi prioritas karena telah masuk dalam sistem Jaminan Kesehatan Nasional (JKN). Pengawasan dilakukan melalui penetapan kadar senyawa aktif dalam produk. Saat ini, metode yang tersedia meliputi pengujian senyawa aktif dalam simplisia atau ekstrak tanaman, dan belum ada untuk produk jadi. Produk fitofarmaka kelas terapi sistem kardiovaskular mempunyai komposisi ekstrak *Apii graveolentis herba* dan *Orthosiphonis staminei folium*. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode analisis yang bersifat selektif, akurat, dan andal untuk penetapan kadar sinensetin dalam produk mengandung ekstrak *Apii graveolentis herba* secara KLT dan apigenin dalam produk mengandung ekstrak *Orthosiphonis staminei folium* secara LC-MS/MS. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua metode tersebut valid dan terpercaya dengan nilai linieritas, presisi, dan akurasi yang memenuhi syarat. Linieritas sinensetin dan apigenin mempunyai nilai koefisien korelasi berturut-turut 0,9972 dan 0,9995, serta nilai deviasi residual (V_{x0}) 4,0% dan 1,7%. Keberulangan metode sangat baik, ditunjukkan dengan kecilnya nilai presisi yang diperoleh. Presisi sinensetin pada konsentrasi 91,83; 310,33; dan 586,68 $\mu\text{g/g}$ berturut-turut 1,11; 0,61; dan 1,50%, sedangkan presisi apigenin pada konsentrasi 5; 15; dan 25 $\mu\text{g/g}$ berturut-turut 5,82; 4,36; dan 2,32%. Akurasi sinensetin pada konsentrasi 100,24; 300,72; dan 601,44 $\mu\text{g/g}$ berturut-turut 90,8 - 92,7%; 102,5 - 103,7%; dan 96,5 - 99,2 %, sedangkan akurasi apigenin pada konsentrasi 5; 15; dan 25 $\mu\text{g/g}$ berturut-turut 81,58 - 91,57%; 86,71 - 93,76%; dan 89,12 - 93,31 %. Kedua metode tersebut bersifat sensitif dengan nilai batas kuantitasi (LoQ) sinensetin dan apigenin 3,34 ng/g dan 6,67 $\mu\text{g/g}$. Metode terbukti dapat digunakan untuk menetapkan kadar sinensetin dan apigenin dalam produk fitofarmaka kelas terapi sistem kardiovaskular.

*Quality control of phytopharmaceutical products becomes a priority because they are included in the National Health Insurance. Quality control is carried out through active compound determination in the product. Currently, testing methods for active compounds are in herbs or plant extracts, but none for products. Phytopharmaceutical products for cardiovascular system therapy class contain *Apii graveolentis herba* and *Orthosiphomis staminei folium* extracts. The research aims to develop analytical methods that are selective, accurate and reliable to assay the active compounds of sinensetin in product contains *Apii graveolentis herba* extract by TLC and apigenin in product contains *Orthosiphomis staminei folium* extract by LC-MS/MS. From the results, it is proven that both methods are valid and reliable with linearity, precision and accuracy values that meet the requirements. The linearity of sinensetin and apigenin has correlation coefficient*

values of 0.9972 and 0.9995, with residual deviation values (V_{x0}) of 4.0% and 1.7%. Good repeatability is represented by the low number of precision values. Sinensetin precision at a concentration of 91.83; 310.33; and 586.68 $\mu\text{g/g}$ were 1.11; 0.61; and 1.50%, while the apigenin precision at a concentration of 5; 15; and 25 $\mu\text{g/g}$ were 5.82; 4.36; and 2.32% respectively. Accuracy of sinensetin at a concentration of 100.24; 300.72; and 601.44 $\mu\text{g/g}$ were 90.8 - 92.7%; 102.5 - 103.7%; and 96.5 - 99.2%, while the accuracy of apigenin at a concentration of 5; 15; and 25 $\mu\text{g/g}$ were 81.58 - 91.57%; 86.71 - 93.76%; and 89.12 - 93.31 % respectively. The developed methods were sensitive with the limit of quantitation (LoQ) values for sinensetin and apigenin were 3.34 ng/g and 6.67 $\mu\text{g/g}$. The validated methods can be applied to determine sinensetin and apigenin in cardiovascular system therapy class phytopharmaceutical products.

Keywords: apigenin, marker compounds, phytopharmaceutical product, sinensetin
Kata Kunci: apigenin, produk fitofarmaka, senyawa penanda, sinensetin

1. Pendahuluan

Saat ini animo masyarakat terhadap penggunaan produk fitofarmaka meningkat. Hal ini dikarenakan kesadaran masyarakat untuk kembali ke alam, antara lain dengan mengkonsumsi produk dari bahan alam. Sebelum adanya pelayanan kesehatan menggunakan obat-obat modern, masyarakat Indonesia memanfaatkan bahan alam untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Selain lebih ekonomis, masyarakat meyakini bahwa produk dengan bahan alam atau obat bahan alam mempunyai efek samping yang lebih kecil dibanding dengan produk obat (Ismail, 2015).

Berdasarkan cara pembuatan serta jenis klaim penggunaan dan tingkat pembuktian khasiat, Obat Bahan Alam Indonesia dikelompokkan menjadi Jamu, Obat Herbal Terstandar, dan Fitofarmaka. Untuk dapat dikategorikan sebagai Fitofarmaka harus memenuhi kriteria aman sesuai dengan persyaratan yang ditetapkan, sedangkan klaim khasiat harus dapat dibuktikan secara ilmiah/praklinis, telah dilakukan standarisasi terhadap bahan baku yang digunakan dalam produk jadi, serta memenuhi persyaratan mutu yang berlaku (BPOM RI, 2004).

Menurut Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Nomor 32 Tahun 2019 tentang Persyaratan Keamanan dan Mutu Obat Tradisional, yang dimaksud sebagai fitofarmaka adalah produk yang mengandung bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji pra-klinis dan uji klinis, serta bahan baku dan produk jadinya telah distandarisasi (BPOM RI, 2019). Obat fitofarmaka didefinisikan sebagai produk yang mengandung fraksi murni dan terstandarisasi, mengandung minimal 4 (empat) senyawa bioaktif atau senyawa fitokimia (ditentukan secara kualitatif dan kuantitatif) dari ekstrak tanaman, untuk keperluan internal atau eksternal bagi manusia atau hewan untuk keperluan diagnosis, pengobatan, mitigasi, atau pencegahan penyakit atau kelainan apapun, tetapi tidak termasuk pemberian melalui rute parenteral (Nooreen et al., 2018).

Saat ini Kementerian Kesehatan telah merancang untuk memasukkan produk fitofarmaka ke dalam sistem pengobatan Jaminan Kesehatan Nasional. Fitofarmaka diharapkan mampu bersaing dengan obat non-herbal dengan khasiat sama dan berkontribusi dalam pengobatan modern. Oleh karena itu, sangat penting untuk memastikan mutu produk sehingga konsumen yakin akan manfaat dan khasiat produk fitofarmaka yang dikonsumsi (Muhamad, 2023).

BPOM melakukan pengawasan produk Obat dan Makanan termasuk fitofarmaka secara full spektrum, yaitu dengan *pre-market evaluation* sebelum produk beredar dan *post-market control* selama produk beredar. *Pre-market evaluation* dilakukan sebagai tindakan pencegahan untuk menjamin Obat dan Makanan yang beredar termasuk produk fitofarmaka memenuhi standar dan persyaratan keamanan, khasiat/manfaat, dan mutu produk yang ditetapkan. Sedangkan *post-market control* bertujuan untuk memastikan Obat dan Makanan yang beredar memenuhi standar dan persyaratan keamanan, khasiat/manfaat, dan mutu serta tindakan penegakan hukum (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2020).

Pre-market evaluation untuk produk fitofarmaka dilakukan melalui evaluasi terhadap dokumen yang dilampirkan pada saat melakukan registrasi. Hasil pengujian mutu yang dievaluasi adalah hasil uji klinis produk, yang menjadi persyaratan utama, pembeda antara produk fitofarmaka dengan produk jamu, obat tradisional, dan OHT.

BPOM memiliki kewenangan melakukan pengawasan produk selama beredar (*post-market control*) melalui pengujian sesuai peraturan yang berlaku. Hasil pengujian laboratorium terhadap produk beredar menjadi kontrol kualitas bahwa produk yang beredar masih dan tetap memenuhi persyaratan mutu dan keamanan, sesuai yang disetujui saat pendaftaran (*pre-market evaluation*). Pada saat registrasi, pelaku usaha wajib melampirkan persyaratan keamanan dan mutu baik untuk bahan obat bahan alam maupun produk jadinya. Dalam hal produk fitofarmaka, pelaku usaha harus melakukan pengujian terhadap kadar senyawa penanda pada bahan obat bahan alam dan produk jadinya (BPOM RI, 2019).

Pengujian mutu produk fitofarmaka dalam rangka *post-market evaluation* dilakukan berdasarkan ketentuan yang tercantum pada Formularium Fitofarmaka (FF). Dalam formularium tersebut, terdapat lima kelas terapi produk fitofarmaka, yaitu sistem kardiovaskular, sistem metabolik, sistem pencernaan, sistem imun, dan nutrisi. Kelas terapi sistem kardiovaskular menjadi obyek penelitian karena telah masuk sebagai prioritas pengawasan sebagaimana tercantum dalam Pedoman Sampling dan Pengujian BPOM. Produk fitofarmaka kelas terapi kardiovaskular mempunyai komposisi ekstrak herba seledri (*Apii graveolentis herba*) dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphonis staminei folium*). Data standardisasi produk yang tercantum dalam FF merupakan data standardisasi bahan baku melalui penetapan kadar senyawa penanda apigenin dalam ekstrak herba seledri dan sinensetin dalam ekstrak daun kumis kucing (Kementerian Kesehatan RI, 2022).

Kontrol kualitas produk fitofarmaka yang dilakukan pada saat *pre-market* dan *post-market* idealnya merupakan teknik yang selektif, akurat, dan andal sehingga pengujian yang dilakukan memberikan keberulangan hasil yang baik. Beberapa teknik analisis telah dikembangkan untuk pengujian sinensetin dan apigenin. Pengujian sinensetin dapat dilakukan secara Spektrofotometri UV, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan FTIR (Saidan et al., 2015), sedangkan untuk pengujian apigenin dapat menggunakan teknik spektroskopi maupun kromatografi seperti KCKT (Control & Medicines, 2022). Saat ini, pengujian yang dilakukan oleh laboratorium eksternal/industri terhadap kontrol kualitas kimia produk sebagai syarat pendaftaran produk menggunakan acuan pada Farmakope Herbal Indonesia (FHI). Acuan tersebut memuat metode dan persyaratan kualitas simplisia dan ekstrak tanaman, bukan metode dan persyaratan kualitas produk fitofarmaka.

Untuk mengatasi belum tersedianya metode analisis dalam pengawasan kualitas produk fitofarmaka kelas terapi sistem kardiovaskular, Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional melakukan pengembangan metode analisis yang dapat diterapkan oleh

laboratorium di lingkungan BPOM dalam rangka pengawasan maupun oleh laboratorium eksternal/industri untuk kontrol mutu produk yang dihasilkan.

2. Metodologi

Metode yang digunakan adalah kajian terhadap data primer yang dihasilkan melalui pengembangan metode analisis dan pengujian laboratorium terhadap kandungan senyawa penanda dalam produk fitofarmaka. Senyawa penanda yang dianalisis adalah sinensetin dan apigenin.

2.1. Bahan dan Reagen

Produk fitofarmaka kelas terapi sistem kardiovaskular yang digunakan adalah produk dengan komposisi ekstrak herba seledri (*Apii graveolentis herba*) dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphonis staminei folium*). Produk dipilih dengan nomor batch yang sama dan diperoleh dari wilayah yang berbeda untuk diuji kandungan senyawa penanda sinensetin dan apigenin.

Etanol absolut p.a., toluene p.a., etil asetat p.a., kloroform p.a., methanol p.a., asetonitril derajat KCKT, dan asam formiat diperoleh dari Merck (Jerman). Air deionisasi (18,2 MΩ-cm pada 25°C), dihasilkan dari Milli-Q (Millipore Sigma, Billerica, MA, USA).

Standar sinensetin dan ajmalicine diperoleh dari Sigma Aldrich (Jerman), standar apigenin diperoleh dari EMD Millipore Corp. (USA).

2.2. Peralatan dan Metode Analisis

2.2.1. Pengujian Sinensetin secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pengujian KLT meliputi proses aplikasi sampel, eluasi, visualisasi bercak, dan pemindaian bercak. Aplikasi sampel menggunakan CAMAG ATS 4, eluasi menggunakan CAMAG ADC 2, penampak bercak menggunakan CAMAG UV TLC Visualizer, pemindai bercak menggunakan CAMAG TLC Scanner 4 (CAMAG, Swiss). Eluasi dilakukan menggunakan fase gerak kloroform-etil asetat (60:40, v/v) dengan fase diam silika gel GF254 (Pramono, 2004) (Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional, 2023b).

Metode yang dikembangkan untuk penetapan kadar sinensetin ditetapkan validitasnya melalui pengujian selektivitas, linieritas, presisi, akurasi, dan batas kuantitasi sesuai dengan persyaratan yang berlaku, dengan melakukan penambahan standar Sinensetin ke dalam matriks sampel (Yuwono & Indrayanto, 2005). Pelarut yang digunakan untuk melarutkan sinensetin adalah etanol absolut dimana hasil penelitian menunjukkan sinensetin mempunyai kelarutan yang baik pada etanol absolut (Shakeel et al., 2017).

Sebelum dianalisis secara KLT, dilakukan preparasi dengan menimbang sejumlah 500 mg sampel yang telah homogen dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10-ml. Sejumlah 5 ml etanol absolut ditambahkan ke dalam labu kemudian larutan disonikasi pada suhu 35°C selama 30 menit. Setelah larutan dingin, kemudian ditambahkan etanol absolut hingga tanda. Larutan dipindahkan ke dalam tabung sentrifuga dan disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian diencerkan 2 (dua) kali dan dimasukkan ke dalam vial KCKT. Untuk penetapan kadar, disiapkan larutan standar

sinensetin dengan rentang kadar 5-30 µg/ml. Larutan sampel dan larutan standar sinensetin diaplikasikan pada fase diam sejumlah masing-masing 20 µl.

2.2.2. Pengujian Apigenin secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Tandem Spektrometri Massa (LC-MS/MS)

Sistem LC-MS/MS terdiri dari Shimadzu LC-20AD (Shimadzu, Jepang) yang digabungkan dengan spektrometer massa Sciex Triple Quad™ 3500 (Sciex, USA). Pengaturan dan pengolahan data menggunakan Analyst® software. Kolom yang digunakan adalah Zorbax Eclipse Plus C18 berdimensi 2,1 x 50 mm dengan ukuran partikel 5 µm (Agilent, USA). Fase gerak menggunakan asam formiat 0,1% (fase gerak A) dan asam formiat 0,1% dalam asetonitril (fase gerak B).

Kondisi analisis diawali dengan 90% fase gerak A selama 0.50 menit. Kemudian pada menit ke 1.00 konsentrasi turun menjadi 70% dan pada menit 4.00 konsentrasi turun menjadi 10%. Pada menit 4.25 konsentrasi kembali menjadi 90% dan ditahan sampai menit ke-10 untuk memberikan kondisi sama seperti awal penyuntikan sampel. Laju alir fase gerak adalah 0,3 ml/menit dengan suhu kolom dipertahankan pada 40°C selama analisis.

Ionisasi menggunakan ESI positif dengan ion apigenin pada 271.1, 153.0, 119.0, dan 145.0 (Karżniewicz-Łada et al., 2023). Sementara itu, ion pada ajmalicine sebagai baku internal adalah 321.1, 144.1, 210.1, dan 158.1 (Panchal & Shah, 2017) (Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional, 2023a). Penggunaan baku internal dalam pengujian LC-MS/MS berguna sebagai koreksi pengujian karena detektor MS tidak cukup stabil dibandingkan dengan jenis detektor yang lain. Selain itu sebagai koreksi jika terjadi supresi ion selama analisis (Wieling, 2002).

Validasi metode analisis penetapan kadar apigenin dilakukan dengan menetapkan selektivitas, linieritas, presisi, akurasi, dan batas kuantitasi melalui penambahan standar apigenin pada matriks sampel (Yuwono & Indrayanto, 2005).

Prosedur preparasi sampel dilakukan dengan menimbang sejumlah 500 mg sampel yang telah homogen ke dalam labu tentukur 25-ml dan ditambahkan 10 ml etanol absolut. Larutan sampel kemudian disonikasi selama 30 menit dan ditambahkan etanol absolut hingga tanda. Larutan kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifus dan disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dipipet sejumlah 500 µl ke dalam vial KCKT, ditambahkan 50 µl larutan baku internal ajmalicine konsentrasi 100 ng/ml, dan 450 µl larutan campuran asetonitril-air (1:1, v/v).

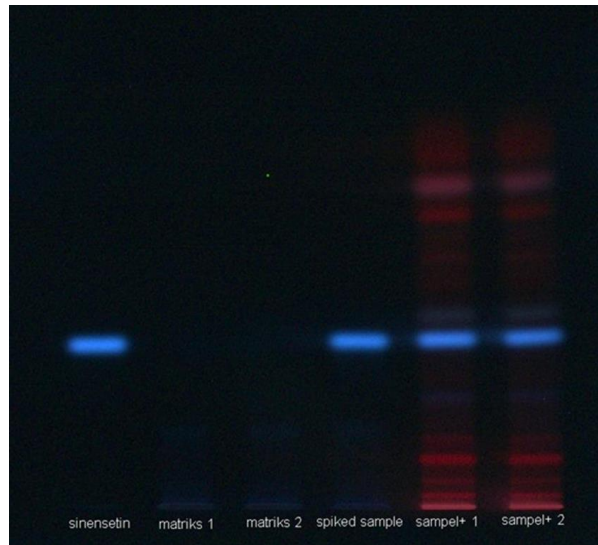
3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Hasil Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar Sinensetin

Validasi metode analisis bertujuan untuk membuktikan bahwa metode analisis yang dikembangkan bersifat selektif, akurat dan andal ketika digunakan untuk analisis. Dengan demikian, pengukuran senyawa target dapat dilakukan secara tepat (Yuwono & Indrayanto, 2005).

Selektivitas metode dibuktikan mengaplikasikan larutan standar sinensetin, matriks sampel yang tidak mengandung sinensetin, dan matriks sampel yang ditambahkan standar sinensetin. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui profil bercak sinensetin dan diharapkan bercak tidak terganggu oleh bercak lain dari matriks sampel. Hasil penetapan

selektivitas seperti terlihat pada Gambar 1 dimana bercak sinensetin terpisah secara nyata dengan bercak lain dari matriks sampel.



Gambar 1. Kromatogram lapis tipis pada penetapan selektivitas sinensetin menggunakan eluen kloroform-etil asetat (60:40, v/v) pada fase diam silika gel GF₂₅₄.

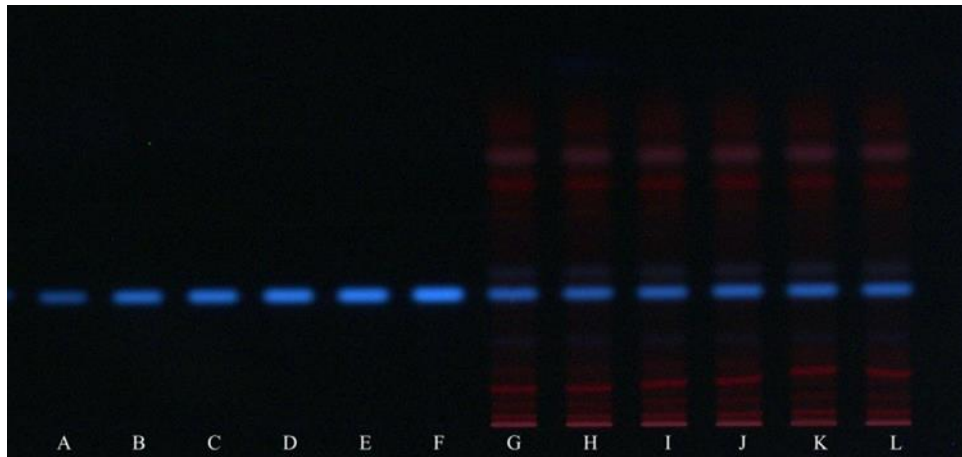
Linieritas pada konsentrasi sinensetin 5 - 30 µg/ml memberikan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9972 dan nilai deviasi residual (V_{x0}) 4,0%. Presisi metode pada konsentrasi sinensetin 91,83; 310,33; dan 586,68 µg/g berturut-turut adalah 1,11; 0,61; dan 1,50%. Akurasi metode pada konsentrasi sinensetin 100,24; 300,72; dan 601,44 µg/g berturut-turut adalah 90,8 - 92,7%; 102,5 - 103,7%; dan 96,5 - 99,2 %. Hasil penetapan linieritas, presisi, dan akurasi menunjukkan bahwa nilai yang diperoleh telah memenuhi kriteria keberterimaan seperti terlihat pada Tabel 1 (Miller & Crowther, 2000) (Yuwono & Indrayanto, 2005). Selain itu, metode bersifat sensitif dengan nilai batas kuantitasi metode analisis (LoQ) yang diperoleh sebesar 3,34 ng/g. Nilai tersebut jauh dibawah kandungan sinensetin pada data standardisasi bahan baku ekstrak daun kumis kucing seperti tercantum dalam FF, yaitu 0,136-0,204%, sehingga metode tersebut dapat digunakan untuk menentukan kadar sinensetin dalam produk.

Tabel 1. Hasil penetapan linieritas, presisi dan akurasi metode analisis penetapan kadar sinensetin secara KLT

| Parameter Validasi | Persyaratan | Hasil | Rentang Kadar |
|--------------------|---------------------|------------------|---------------|
| Linieritas | $r \geq 0.995$ | $r = 0,9972$ | 5-30 µg/ml |
| | $V_{x0} \leq 5.0\%$ | $V_{x0} = 4,0\%$ | |
| | $RSD < 7,3 \%$ | 1,11% | |
| Presisi | $RSD < 5,3\%$ | 0,61% | 91,83 µg/g |
| | $RSD < 5,3\%$ | 1,50% | 310,33 µg/g |
| | | 90,8 - 92,7% | 586,68 µg/g |
| Akurasi | 90 - 107 % | 102,5 - 103,7% | 100,24 µg/g |
| | | 96,5 - 99,2% | 300,72 µg/g |
| | | | 601,44 µg/g |

3.2. Hasil Penetapan Kadar Sinensetin

Penetapan kadar sinensetin dilakukan secara KLT pada panjang gelombang 366 nm dimana senyawa tersebut berfluoresensi pada panjang gelombang 366 nm dan memberikan bercak fluoresensi warna biru (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017) (Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional, 2023b) (Kartini et al., 2023) seperti terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kromatogram lapis tipis standar sinensetin dan sampel produk fitofarmaka kelas terapi sistem kardiovaskular dengan eluasi menggunakan eluen kloroform-etil asetat (60:40, v/v) pada fase diam silika gel GF254.

Keterangan gambar :

- A : standar sinensetin 5 µg/ml
- B : standar sinensetin 10 µg/ml
- C : standar sinensetin 15 µg/ml
- D : standar sinensetin 20 µg/ml
- E : standar sinensetin 25 µg/ml
- F : standar sinensetin 30 µg/ml
- G - I : bercak sinensetin sampel A
- J - L : bercak sinensetin sampel B

Dari hasil perhitungan kadar sinensetin dalam sampel terhadap standar sinensetin, diperoleh hasil seperti tercantum pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan kadar sinensetin dalam sampel produk fitofarmaka kelas terapi sistem kardiovaskular

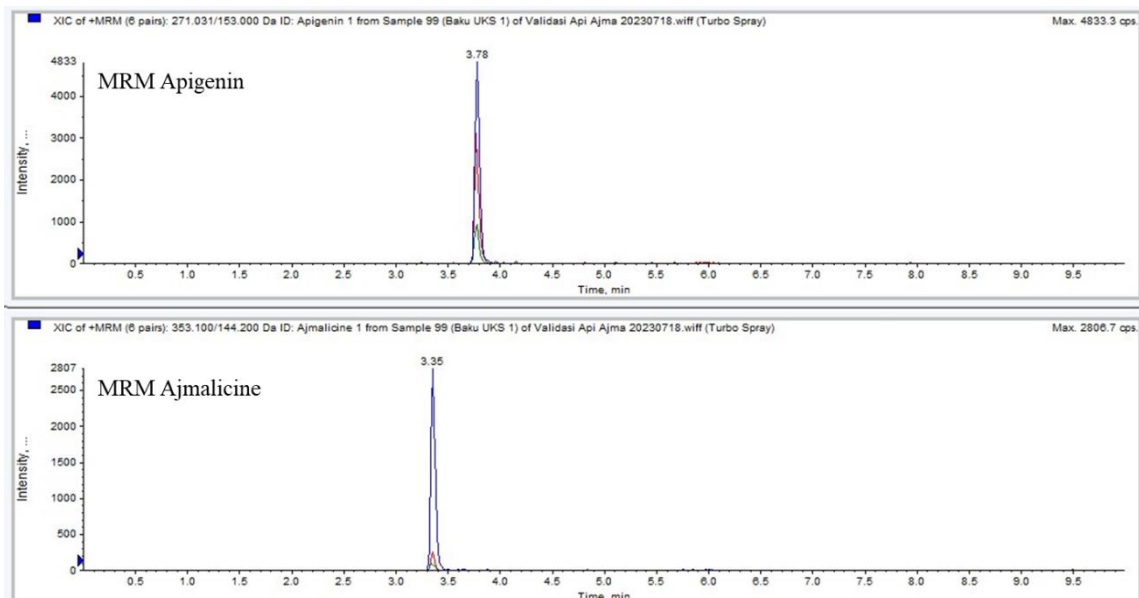
| No. | Nama sampel | Kadar sinensetin dalam sampel (%) | Rata-rata kadar sinensetin (%) | SD | RSD (%) |
|-----|-------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------|---------|
| 1. | Sampel A | 0,0210 | 0,0208 | 0,00043 | 2,08 |
| | | 0,0210 | | | |
| | | 0,0203 | | | |
| 2. | Sampel B | 0,0217 | 0,0207 | 0,00125 | 6,02 |
| | | 0,0210 | | | |
| | | 0,0193 | | | |

Kadar sinensetin dalam sampel A dan sampel B berturut-turut adalah 0,0208% dan 0,0207%. Perumusan kesimpulan terhadap hasil uji penetapan kadar sinensetin dalam produk fitofarmaka sampai saat ini masih menjadi pertanyaan, dimana sampai saat ini belum terdapat persyaratan kadar sinensetin dalam produk.

Pada FHI, persyaratan kadar sinensetin yang tercantum adalah persyaratan kadar sinensetin dalam daun kumis kucing dan dalam ekstrak kental daun kumis kucing, yaitu tidak kurang dari 0,10% dan tidak kurang dari 1,10% (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017). Sementara itu, persyaratan yang tercantum dalam FF merupakan data standarisasi bahan baku dimana daun kumis kucing mengandung sinensetin 0,136-0,204% (Kementerian Kesehatan RI, 2022). Kedua acuan tersebut tidak mewakili persyaratan kadar sinensetin dalam produk mengingat bentuk sediaan adalah kapsul yang berisi ekstrak kering daun kumis kucing, dimana dalam proses pembuatan ekstrak kering terdapat penambahan pengering pada ekstrak kental yang dihasilkan selama produksi. Dengan demikian, persyaratan kadar sinensetin dalam produk seharusnya mewakili persyaratan kadar sinensetin dalam ekstrak kering yang digunakan dalam komposisi produk fitofarmaka.

3.3. Hasil Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar Apigenin

Selektivitas metode analisis dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar ajmalicine sebagai baku internal dan apigenin. Baku internal digunakan untuk mengurangi dampak kehilangan analit dan variasi instrumental pada penetapan kadar suatu analit. Pemilihan analit sebagai baku internal harus mempertimbangkan sifat fisika dan kimia yang sama atau serupa dengan analit yang diuji (Xu & Madden, 2012). Ajmalicine dipilih sebagai baku internal karena mempunyai sifat yang sama sebagai anti hipertensi (Ambrin et al., 2020). Selain itu, senyawa tersebut mempunyai profil stabilitas yang memenuhi sebagai baku internal dalam penetapan kadar *myrtragynine* secara LC-MS/MS (Lu et al., 2009).



Gambar 3. Kromatogram ajmalicine sebagai baku internal dan apigenin pada pengujian LC-MS/MS menggunakan fase gerak asam formiat 0,1%-asam formiat 0,1% dalam asetonitril dengan sistem gradien.

Hasil analisis menunjukkan bahwa kedua senyawa tersebut terpisah dengan baik dan memberikan intensitas ion yang memadai. Waktu retensi dari ajmalicine dan apigenin berturut-turut adalah 3,35 dan 3,78 menit, seperti terlihat pada Gambar 3. Perbedaan waktu retensi pada pengujian secara LC-MS/MS tergantung dari sistem KCKT yang digunakan, baik peralatan, kolom, maupun kondisi fase gerak selama pengujian (Jewell et al., 2020).

Linieritas pada konsentrasi apigenin 50-250 µg/ml memberikan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9995 dan nilai deviasi residual (V_{x0}) 1,7%. Presisi metode pada konsentrasi apigenin 5; 15; dan 25 µg/g berturut-turut adalah 5,82; 4,36; dan 2,32%. Akurasi metode pada ketiga konsentrasi apigenin tersebut berturut-turut adalah 81,58 - 91,57%; 86,71 - 93,76%; dan 89,12 - 93,31 %. Hasil penetapan linieritas, presisi, dan akurasi menunjukkan bahwa nilai yang diperoleh telah memenuhi kriteria keberterimaan seperti terlihat pada Tabel 3 (Miller & Crowther, 2000) (Yuwono & Indrayanto, 2005). Metode analisis bersifat sensitif dengan nilai batas kuantitasi metode (LoQ) yang diperoleh sebesar 6,67 µg/g. Nilai tersebut jauh dibawah kandungan apigenin pada data standardisasi bahan baku ekstrak herba seledri seperti tercantum dalam FF, yaitu 0,043-0,099%, sehingga metode tersebut dapat digunakan untuk menentukan kadar apigenin dalam produk.

Tabel 3. Hasil penetapan linieritas, presisi dan akurasi metode analisis penetapan kadar apigenin secara LC-MS/MS

| Parameter Validasi | Persyaratan | Hasil | Kadar |
|--------------------|---------------------|------------------|--------------|
| Linieritas | $r \geq 0,995$ | $r = 0,9995$ | 50-250 µg/ml |
| | $V_{x0} \leq 5,0\%$ | $V_{x0} = 1,7\%$ | |
| Presisi | RSD < 11 % | 5,82% | 5 µg/g |
| | RSD < 7,3% | 4,36% | 10 µg/g |
| | RSD < 7,3% | 2,32% | 25 µg/g |
| Akurasi | 80 – 110 % | 81,58 – 91,57% | 5 µg/g |
| | | 86,71 – 93,76% | 10 µg/g |
| | | 89,12 – 93,31% | 25 µg/g |

3.4. Hasil Penetapan Kadar Apigenin dalam Sampel Produk Fitofarmaka Kelas Terapi Sistem Kardiovaskular

Penetapan kadar apigenin dalam sampel ditetapkan secara LC-MS/MS menggunakan baku internal ajmalicine konsentrasi 5 µg/ml. Dari hasil perhitungan kadar apigenin dalam sampel terhadap standar apigenin dengan baku internal ajmalicine, diperoleh hasil seperti tercantum pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil penetapan kadar apigenin dalam sampel produk fitofarmaka kelas terapi sistem kardiovaskular

| No. | Nama sampel | Kadar apigenin dalam sampel (%) | Rata-rata kadar apigenin (%) | SD | RSD (%) |
|-----|-------------|---------------------------------|------------------------------|---------|---------|
| 1. | Sampel A | 0,0015 0,0017 0,0015 | 0,0016 | 0,00012 | 7,60 |
| 2. | Sampel B | 0,0015 0,0017 0,0016 | 0,0016 | 0,00011 | 7,08 |

Penetapan kadar apigenin dalam sampel A dan sampel B memberikan persentase yang sama, yaitu 0,0016%. Sama halnya seperti pada sinensetin, perumusan kesimpulan terhadap hasil uji penetapan kadar apigenin dalam produk fitofarmaka belum terdapat persyaratan yang mewakili kadar apigenin dalam produk. Pada FHI, persyaratan kadar apigenin yang tercantum adalah persyaratan kadar apigenin dalam daun seledri dan dalam ekstrak kental daun seledri, yaitu tidak kurang dari 1,96% dan tidak kurang dari 11,76% (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017). Sementara itu, persyaratan yang tercantum dalam FF menyebutkan mengenai data standarisasi produk dimana yang tersedia adalah data standarisasi bahan baku, herba seledri mengandung apigenin 0,043-0,099% (Kementerian Kesehatan RI, 2022). Kedua acuan tersebut belum mencantumkan persyaratan apigenin dalam produk melainkan dalam simplisia, ekstrak kental, dan bahan baku.

Hasil penelitian di atas dapat dijadikan salah satu pertimbangan dalam pembahasan lebih lanjut terkait persyaratan kualitas produk fitofarmaka. Mengingat bahwa produk fitofarmaka merupakan produk berbasis bahan alam dengan komposisi zat aktif yang relatif murni, maka diusulkan agar pengawasan yang dilakukan BPOM menggunakan pendekatan pengujian senyawa penanda. Selain itu, perlu dilakukan peninjauan kembali terkait persyaratan kadar senyawa penanda yang tertera pada Formularium Fitofarmaka, sehingga kadar senyawa penanda tidak lagi dalam bahan baku, namun sudah sebagai kadar dalam produk jadi. Produk fitofarmaka kelas terapi sistem kardiovaskular mengandung komposisi ekstrak *Apii graveolentis herba* 92 mg dan ekstrak *Orthosiphonis staminei folium* 28 mg, sehingga kadar senyawa penanda dalam produk harus diperhitungkan terhadap berat ekstrak yang digunakan sesuai komposisi tersebut. Metode analisis yang diusulkan dapat digunakan sebagai acuan dalam pelaksanaan kontrol kualitas produk fitofarmaka kelas terapi sistem kardiovaskular baik oleh pihak regulator maupun industri.

4. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan terbukti bahwa metode analisis yang dikembangkan valid dan terpercaya untuk menganalisis kandungan sinensetin dan apigenin dalam produk fitofarmaka kelas terapi sistem kardiovaskular, yang dibuktikan dengan nilai linieritas, presisi, dan akurasi yang memenuhi syarat. Linieritas sinensetin dan apigenin memenuhi syarat dengan nilai koefisien korelasi berturut-turut adalah 0,9972 dan 0,9995, serta nilai deviasi residual (V_{x0}) yang memenuhi syarat maksimum 5,0%, yaitu 4,0% dan 1,7%. Presisi sinensetin pada konsentrasi 91,83; 310,33; dan 586,68 $\mu\text{g/g}$ berturut-turut adalah 1,11; 0,61; dan 1,50%, sedangkan presisi apigenin pada konsentrasi 5; 15; dan 25 $\mu\text{g/g}$ berturut-turut adalah 5,82; 4,36; dan 2,32%. Akurasi sinensetin pada konsentrasi 100,24; 300,72; dan 601,44 $\mu\text{g/g}$ berturut-turut adalah 90,8 - 92,7%; 102,5 - 103,7%; dan 96,5 - 99,2 %, sedangkan akurasi apigenin pada konsentrasi 5; 15; dan 25 $\mu\text{g/g}$ berturut-turut adalah 81,58 - 91,57%; 86,71 - 93,76%; dan 89,12 - 93,31 %. Kedua metode yang dikembangkan bersifat sensitif dengan nilai batas kuantitasi (LoQ) sinensetin adalah 3,34 ng/g dan apigenin 6,67 $\mu\text{g/g}$.

Metode hasil validasi telah terbukti dapat digunakan untuk menetapkan kadar sinensetin dan apigenin dalam produk fitofarmaka kelas terapi sistem kardiovaskular. Kedua metode tersebut dapat dijadikan sebagai metode alternatif dalam melakukan kontrol kualitas produk fitofarmaka sebelum dan selama produk beredar di pasaran.

Daftar Referensi

- Ambrin, G., Ali, H. M., & Ahmad, A. (2020). Metabolic regulation analysis of ajmalicine biosynthesis pathway in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don suspension culture using nanosensor. *Processes*, 8(5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/PR8050589>
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. (2020). Peraturan Badan Pengawas Obat Dan Makanan Nomor 9 Tahun 2020 Tentang Rencana Strategis Badan Pengawas Obat Dan Makanan Tahun 2020-2024. *Badan Pengawas Obat Dan Makanan*, 88, 1–155.
- B POM RI. (2004). *Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK. 00.05.4.2411 Tentang Ketentuan Pokok Pengelompokan dan Penandaan Obat Bahan Alam Indonesia*.
- B POM RI. (2019). Persyaratan Keamanan Dan Mutu Obat Tradisional. *Bpom RI*, 32, 37.
- Control, Q., & Medicines, H. (2022). *Validated Spectroscopic and Chromatographic Techniques for Quality*. 13(12), 4857–4864. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.13\(12\).4857-64](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.13(12).4857-64)
- Ismail. (2015). Faktor yang Mempengaruhi Keputusan Masyarakat Memilih Obat Tradisional di Gampong Lam Ujong. *Idea Nursing Journal*, VI(1), 7–14.
- Jewell, K. S., Kunkel, U., Ehlig, B., Thron, F., Schlüsener, M., Dietrich, C., Wick, A., & Ternes, T. A. (2020). Comparing mass, retention time and tandem mass spectra as criteria for the automated screening of small molecules in aqueous environmental samples analyzed by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 34(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/rcm.8541>
- Karazniewicz-Łada, M., Wójtowski, J. A., Główka, F., Danków, R., Pikul, J., Gryszczyńska, A., Foksowicz-Flaczyk, J., & Mikołajczak, P. Ł. (2023). Application of UPLC-MS/MS Method for Analysis of Apigenin, Apigenin 7-Glucoside and Chlorogenic Acid in Goat Serum. *Chromatographia*, 86(5), 401–411. <https://doi.org/10.1007/s10337-023-04250-7>
- Kartini, K., Putri, R. E., & Budiono, R. (2023). Quantification of sinensetin in *Orthosiphon stamineus* from various phytogeographical zones in Indonesia. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 13(3), 183–191. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2023.80035>
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia* (II).
- Kementerian Kesehatan RI. (2022). *Formularium Fitofarmaka*.
- Lu, S., Tran, B. N., Nelsen, J. L., & Aldous, K. M. (2009). Quantitative analysis of mitragynine in human urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(24), 2499–2505. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.024>
- Miller, J. M., & Crowther, J. B. (2000). *Analytical chemistry in a GMP environment: a practical guide*.
- Muhamad, S. (2023). *Kemenkes dorong penggunaan fitofarmaka ditanggung BPJS Kesehatan*. Antara. <https://www.antaranews.com/berita/3759291/kemenkes-dorong-penggunaan-fitofarmaka-ditanggung-bpjs-kesehatan>
- Nooreen, Z., Rai, V. K., & Yadav, N. P. (2018). Phytopharmaceuticals: A new class of drug in India. *Annals of Phytomedicine: An International Journal*, 7(1). <https://doi.org/10.21276/ap.2018.7.1.4>
- Panchal, H., & Shah, M. (2017). Development of Simultaneous LC – MS / MS Method for

- the Quantitation of Apigenin, Luteolin and Quercetin in Achillea millefolium Extract. *Der Pharmacia Lettre*, 9(12), 72–86.
- Pramono, E. S. (2004). *Isolasi identifikasi dan standarisasi sinensetin sebagai parameter pada ekstrak daun Kumis Kucing (Orthosiphon stamineus, Benth.)*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional. (2023a). *Identifikasi dan Penetapan Kadar Apigenin dalam Produk Fitofarmaka secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Tandem Spektrometri Massa*.
- Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional. (2023b). *Identifikasi dan Penetapan Kadar Sinensetin dalam Produk Fitofarmaka secara Kromatografi Lapis Tipis-Spektrofotodensitometri*.
- Saidan, N. H., Hamil, M. S. R., Memon, A. H., Abdelbari, M. M., Hamdan, M. R., Mohd, K. S., Majid, A. M. S. A., & Ismail, Z. (2015). Selected metabolites profiling of *Orthosiphon stamineus* Benth leaves extracts combined with chemometrics analysis and correlation with biological activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0884-0>
- Shakeel, F., Alshehri, S., Ibrahim, M. A., Elzayat, E. M., Altamimi, M. A., Mohsin, K., Alanazi, F. K., & Alsarra, I. A. (2017). Solubility and thermodynamic parameters of apigenin in different neat solvents at different temperatures. *Journal of Molecular Liquids*, 234, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.03.057>
- Wieling, J. (2002). LC-MS-MS experiences with internal standards. *Chromatographia*, 55(SUPPL.). <https://doi.org/10.1007/bf02493365>
- Xu, Q. A., & Madden, T. L. (2012). LC-MS in drug bioanalysis. In *LC-MS in Drug Bioanalysis* (Vol. 9781461438). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3828-1>
- Yuwono, M., & Indrayanto, G. (2005). Validation of Chromatographic Methods of Analysis. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 32(05), 241–260. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(05\)32009-0](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(05)32009-0)