

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Ginggiyang (*Leea aequata*. L)

Leea aequata adalah jenis tanaman yang termasuk dalam keluarga Vitaceae. Ini adalah tanaman yang biasanya dapat ditemukan di beberapa wilayah tropis dan subtropis. Tanaman *Leea aequata* yang awamnya terlihat serupa tumbuhan semak, nyatanya merupakan famili Vitaceae yang dapat ditemukan di berbagai Negara – seperti: Bangladesh, Bhutan, Kamboja, Cina, India, Malaysia, Myanmar, Nepal, Filipina, Thailand, Vietnam, dan Indonesia (Tun et al., 2019)'

Genus *Leea* termasuk dalam famili Vitaceae. Spesies *Leea* tersebar dari Afrika hingga Asia, bagian timur laut Australia, New Guinea dan kepulauan Pasifik (Fiji, Kepulauan Solomon, Kepulauan Caroline). Beberapa spesies digunakan sebagai obat tradisional. *Leea aequata* biasanya berupa semak, lebih jarang berupa pohon kecil, tersebar di Bangladesh, Bhutan, Kamboja, Cina, India, Malaysia, Myanmar, Nepal, Filipina, Thailand, dan Vietnam. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa biji, batang, dan akar *L. aequata* memiliki aktivitas antibakteri. Namun, tidak ada pengetahuan yang tersedia mengenai kandungan kimia spesies ini. Di Mandalay, Myanmar, secara lokal dikenal sebagai Kya-petthein (naga-mauk). Daun segar tanaman ini dihaluskan dan digunakan secara eksternal untuk mengobati luka dan penyakit kulit oleh masyarakat Bamar (Islam, 2017)

Di Indonesia sendiri *Leea aequata* memiliki berbagai nama lokal seperti Jiran (Madura) dan Kayu Aje Perempuan (Melayu). Mali- Mali (Makassar), Uka (Maluku) dan dalam bahasa sunda sendiri lebih dikenal dengan nama ginggiyang dan merupakan salah satu tanaman obat yang memiliki banyak manfaat. Kulit kayu dan akarnya digunakan sebagai zat dan obat melawan serangga, gangguan pencernaan, penyakit kuning, demam kronis, dan bahkan malaria. Sedangkan daun dan rantingnya digunakan sebagai antiseptik dan obat (Bulbul et al., 2022)

Kandungan yang terdapat dalam Ginggiyang seperti flavonoid, diketahui memiliki aktivitas biologis dan farmakologis yang telah teruji secara in vitro sebagai anti alergi, anti inflamasi, antioksidan, antibakteri, anti kanker dan anti diare (Suwarso et al., 2018). Salah satu senyawa yang ada didalam tanaman

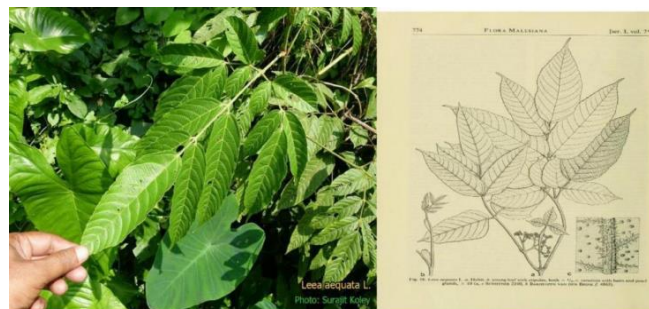
ginggiyang memiliki aktifitas anti bakteri. Sehubungan dengan aktivitas biologis dan farmakologis tumbuhan ginggiyang yang teruji secara in vitro sebagai anti bakteri maka urgensi dari penelitian ini penulis rasa sangatlah di butuhkan karna ada harapan tumbuhan ginggiyang dapat menjadi alternatif antiseptik (Islam, 2017).

2.1.1 Morfologi

Daun-daun *Leea aequata* bersifat majemuk dan biasanya genap. Struktur daunnya berbentuk panjang dan terdiri dari sejumlah daun daun *Leea aequata* memiliki berbentuk telur atau lonjong, dengan tepi bergerigi atau berlekuk, dan dapat memiliki permukaan yang licin, atau diatur secara berseling pada batangnya. Semak setinggi 1,2-3 meter, *Leea aequata* biasanya ditemukan pada ketinggian rendah hingga menengah, tetapi spesifik lokasi geografisnya dapat bervariasi tergantung pada distribusi geografis spesies tersebut. Tanaman ini juga biasanya tumbuh di tanah yang lembap dan kaya nutrisi dan beberapa spesies *Leea*, panjang 6-25 cm, lebar 3-8 cm, berambut, hijau. (Cav, n.d.)

2.1.2 Klasifikasi Taksonomis Ginggiyang

Daun ginggiyang biasanya memiliki ujung meruncing dan pangkal daun yang tumpul dapat di lihat pada gambar 2.1



Gambar 2. 1: Daun Ginggiyang *Leea Aequata* L
(Islam, 2017)

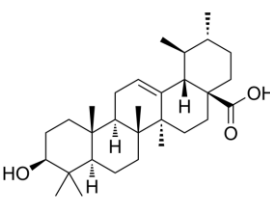
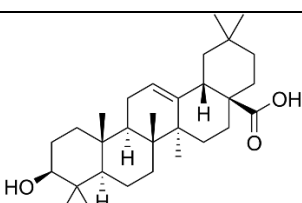
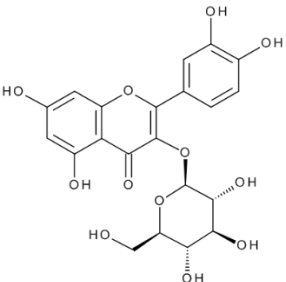
Kingdom	: Plantae
Division	: Tracheophyta
Class	: Mangoliopsida
Ordo	: Vitales

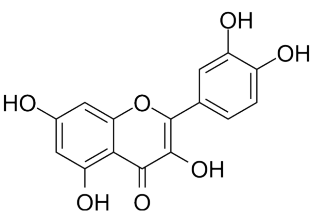
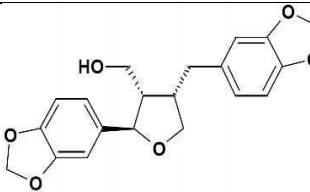
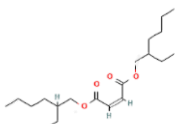
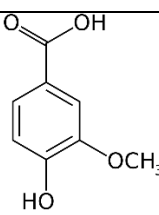
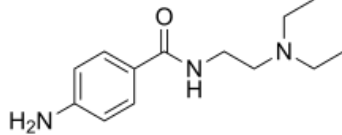
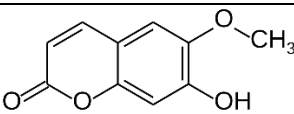
Family : Vitaceae
 Genus : Leea
 Spesies : *Leea aequata* L.
 Sinonim : *Leea ancoloa*; *Leea hirsute*; *Leea hirta*; *Leea hispida* dan *Leea kurzii* (Islam, 2017)

2.1.3 Kandungan kimia dalam tumbuhan ginggiyang

Tanaman ginggiyang mengandung sejumlah senyawa kimia, hasil skrining fitokimia dari tumbuhan Ginggiyang menunjukkan keberadaan beberapa kelompok senyawa bioaktif utama seperti Steroid, terpenoid, flavonoid, glikosida, tanin, alkaloid, saponin, protein, dan karbohidrat (Penelitian et al., 2018). Kandungan kimia dalam daun ginggiyang telah banyak yang di isolasi, berikut adalah beberapa senyawa kimia yang telah di isolasi dapat di lihat pada table 2.1.

Table 2.1 Kandungan kimia dalam tumbuhan ginggiyang

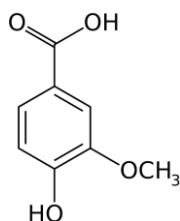
No	Kandungan kimia	Stuktur	Referensi
1	Asam ursolat		(Hossain et al., 2021)
2	Asam oleanolik		(Hossain et al., 2021)
3	Isokuersetin		(Hossain et al., 2021)

4	Quercetin		(Hossain et al., 2021)
5	Dihydrosesamin		(Hossain et al., 2021)
6	Bis(2-ethylhexyl) maleate		(Hossain et al., 2021)
7	Vanillic acid		(Hossain et al., 2021)
8	prokainamid		(Hossain et al., 2021)
9	Skopoletin		(Hossain et al., 2021)

2.2 Asam Vanilat

Asam vanilat adalah senyawa aldehida aromatik dengan rumus molekul $C_8H_8O_4$. Berdasarkan struktur kimianya, asam vanilat merupakan senyawa fenolik yang memiliki gugus metoksi pada posisi orto dan gugus aldehida pada posisi para, sehingga termasuk dalam golongan senyawa antioksidan dan juga memiliki efek antibakteri (Kadchumsang et al., 2014). Asam vanilat adalah asam monohidroksibenzoat yang tersubstitusi dengan gugus metoksi, dikenal sebagai

asam 4-hidroksibenzoat, dan berfungsi sebagai metabolit tumbuhan. Struktur kimia asam vanilat mengandung gugus hidroksil dan metoksil pada cincin benzena, seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.2.



Gambar 2. 2: Struktur Asam Vanilat

Rumus Molekul : $C_8H_8O_4$

Nama Kimia/IUPAC : asam 4-hidroksi-3-metoksibenzoat

Berat Molekul : 168,15 gram/mol

Titik leleh : 211,5 °C

Kelarutan : sedikit larut dalam air ; larut dalam pelarut organik ; larut dalam etanol

Beberapa metode analisis yang dapat di gunakan untuk analisis asam vanilat adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), Kromatografi Gas-Spektrometri Massa (GC-MS), Kromatografi Lapis Tipis, Spektrofotometri UV-Vis, Elektroforesis Kapiler

2.3 KCKT

Alat yang digunakan untuk analisis dalam penelitian adalah KCKT, atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, yang dikenal dalam bahasa Inggris sebagai High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), adalah teknik analitik yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur komponen dalam campuran cair. Teknik ini memanfaatkan interaksi antara komponen sampel dan fase diam dalam kolom kromatografi untuk pemisahan. Instrumen KCKT bekerja dengan memisahkan komponen dari sampel yang biasanya berupa larutan, dan memberikan informasi mengenai konsentrasi masing-masing komponen yang terpisah. Sistem KCKT biasanya terdiri dari beberapa komponen utama: sistem penyedia pelarut (termasuk wadah pelarut dan degasser), sistem pemompaan

(seperti pompa bertekanan tinggi dan perangkat gradien), sistem pengambilan sampel (auto-sampler atau jarum suntik manual), sistem pemisahan (kolom kromatografi), sistem deteksi (berbagai jenis detektor), dan sistem pengolahan data (“Book Reviews,” 1990).

Kromatografi adalah metode melarutkan dan memisahkan zat secara efektif. Zat terlarut melewati cairan dan dipisahkan oleh perubahan laju elusi. Distribusi zat menentukan pemisahan zat terlarut dalam kolom kromatografi. Selama proses pemisahan, zat dilarutkan dalam fase gerak dan fase diam (Studi et al., 2022). Campuran ini kemudian dikenai kromatografi cair. Kombinasi yang baik dari keduanya diperlukan agar berhasil menyelesaikan suatu masalah tertentu. Berbagai faktor operasi seperti tipe kolom, fase gerak, dan panjang dapat mempunyai dampak signifikan terhadap kondisi keseluruhan. Variabel seperti diameter kolom, laju aliran fase gerak, suhu kolom, dan ukuran sampel semuanya memainkan peran penting dalam eksperimen Anda. Penentuan kondisi kromatografi yang optimal memerlukan proses seleksi yang cermat. Memahami konsep ini memerlukan pemahaman dasar tentang berbagai faktor yang mempengaruhinya. Kromatografi cair memisahkan zat (Studi et al., 2022).

Pemisahan dalam kromatografi partisi didasarkan pada perbedaan partisi analit antara fase gerak dan fase diam cair yang tidak saling bercampur dan terikat pada penyangga kolom (Aulia et al., 2016). Terdapat dua jenis teknik kromatografi partisi:

1. Kromatografi Fase Balik: Teknik ini menggunakan fase gerak yang bersifat polar dan fase diam yang bersifat non-polar atau kurang polar. Pada teknik ini, analit dengan kepolaran lebih tinggi akan terelusi lebih awal karena mereka lebih larut dalam fase gerak yang polar.
2. Kromatografi Fase Normal: Teknik ini menggunakan fase gerak yang bersifat kurang polar atau non-polar dan fase diam yang lebih polar. Dalam teknik ini, analit dengan kepolaran lebih rendah akan terelusi lebih awal karena mereka lebih larut dalam fase gerak yang non-polar.

2.3.1 Kolom

Pemisahan sampel dari komponen lainnya terjadi di dalam kolom, sehingga kolom memainkan peran yang sangat penting dalam KCKT. Spesifikasi kolom yang biasa digunakan untuk pemisahan analitik adalah yang berdiameter 2-4 mm. Ada dua jenis kolom:

1. Kolom Analitik: Kolom dengan diameter 2-6 mm dan panjang yang tergantung pada material pengisi kolom. Panjang kolom untuk kemasan pellicular adalah 50-100 cm, sedangkan untuk kemasan poros mikropartikulat adalah 10-30 cm.
2. Kolom Preparatif: Kolom dengan diameter 6 mm atau lebih besar dan panjang 25-100 cm. Kemasan kolom yang banyak digunakan dalam kromatografi fase balik adalah jenis oktadesil silana (C18) dan oktil silana (C8). Kolom dalam fase normal yang sering digunakan adalah alkilnitril dan alkilamina. Penggunaan kolom dapat diperpanjang dengan memasang pelindung atau prakolom antara katup pemasukan dan kolom utama.

2.3.2 Fase Diam

Beberapa fase diam yang sering digunakan dalam KCKT termasuk divinil benzena, polimer stiren, dan silika yang dimodifikasi maupun tidak. Modifikasi silika dilakukan dengan menambahkan reagen klorosilan yang bereaksi dengan gugus silanol. Gugus silanol (Si-OH) pada silika menyebabkan sifat sedikit asam dan permukaan yang polar. Fase diam jenis C18 atau ODS (Octa Desil Silica) mampu memisahkan senyawa dengan tingkat kepolaran tinggi, sedang, dan rendah. Rantai alkil yang lebih pendek pada fase diam sesuai untuk senyawa polar. Silika yang tidak dimodifikasi menyebabkan waktu retensi yang bervariasi karena adanya kandungan air (Aulia et al., 2016).

2.3.3 Fase Gerak

Fase gerak dalam sistem KCKT sangat mempengaruhi hasil pemisahan zat. Pemisahan pada KCKT dipengaruhi oleh komposisi pelarut atau fase gerak yang mengelusi sampel. Beberapa syarat pelarut adalah:

- Tidak terdapat cemaran
- Inert atau tidak bereaksi dengan kemasan
- Dapat melarutkan cuplikan
- Viskositas rendah
- Kompatibel dengan detektor
- Memungkinkan untuk memperoleh kembali sampel dengan mudah

Pemilihan fase gerak sering dilakukan melalui eksperimen trial and error hingga didapatkan kromatogram yang diinginkan. Pada kromatografi fase terbalik, fase gerak bersifat polar dan akan terelusi lebih dulu. Sedangkan pada fase normal, fase gerak bersifat kurang polar dan akan terelusi lebih dulu (Aulia et al., 2016). Beberapa penelitian menggunakan kombinasi fase gerak yang terdiri dari fase organik dan buffer. Fase organik seperti asetonitril dan metanol sering digunakan dalam sistem KCKT. Buffer yang sering digunakan termasuk buffer asetat, buffer fosfat, dan tetrahidrofur (THF). Komposisi fase gerak menentukan pemisahan zat; komposisi yang tidak tepat dapat memberikan hasil yang buruk meskipun kombinasi fase gerak yang digunakan sudah benar (Aulia et al., 2016).

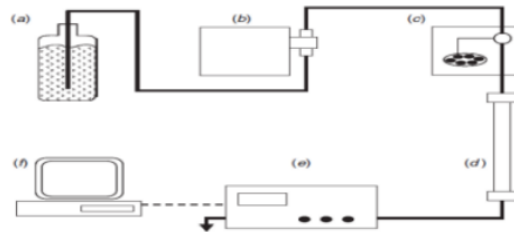
2.3.4 Panjang Gelombang dan Waktu Retensi

Panjang gelombang simvastatin menurut British Pharmacopoeia adalah 238 nm, tetapi panjang gelombangnya bisa berbeda dalam kondisi yang berbeda. Waktu retensi adalah durasi yang diperlukan untuk menganalisis sampel. Dalam kromatografi fase terbalik, zat yang lebih polar akan terelusi lebih cepat dan memiliki waktu retensi yang lebih pendek dibandingkan zat non-polar. (Studi et al., 2022).

2.3.5 Bagian bagian KCKT

Instumen KCKT terdiri dari beberapa komponen, diagram sistem KCKT dapat dilihat pada gambar 2.3.3

Gambar 2. 3: Diagram sistem KCKT



Instrument KCKT pada dasarnya terdiri dari beberapa komponen utama:

1. Wadah Fase Gerak: Wadah yang digunakan untuk menampung fase gerak harus bersih dan inert. Biasanya berupa bejana pelarut kosong atau labu laboratorium dengan kapasitas sekitar 1 hingga 2 liter.
2. Pompa: Pompa dalam KCKT harus inert terhadap fase gerak, sama seperti wadah larutan. Bahan yang umum digunakan termasuk gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam. Pompa harus mampu menghasilkan tekanan hingga 5000 psi dan mengalirkan fase gerak dengan laju 3 mL/menit. Untuk aplikasi tertentu, laju alir fase gerak bisa mencapai 20 mL/menit.
3. Tempat Injeksi Sampel: Sampel cair dan larutan diinjeksikan langsung ke dalam fase gerak yang mengalir menuju kolom di bawah tekanan menggunakan injektor yang terbuat dari bahan tembaga tahan karat dengan tutup teflon. Injektor ini dilengkapi dengan loop sampel internal atau eksternal.
4. Kolom: Terdapat dua jenis kolom dalam KCKT, yaitu kolom mikrobor dan kolom konvensional. Kolom ini adalah bagian dari KCKT yang memiliki fase diam sebagai tempat terjadinya proses pemisahan zat terlarut dan analit. Kolom mikrobor memiliki tiga keuntungan utama dibandingkan kolom konvensional:
 - Penggunaan fase gerak dalam kolom mikrobor hanya sekitar 80% atau kurang dibandingkan dengan kolom konvensional karena laju alir fase gerak yang lebih lambat (10-100 $\mu\text{L}/\text{min}$).

- Aliran fase gerak yang lebih lambat membuat kolom mikrobor lebih akurat jika dikombinasikan dengan spektrofotometri massa.
 - Sensitivitas kolom mikrobor meningkat ketika zat terlarut lebih pekat, sehingga kolom ini sangat berguna ketika jumlah sampel terbatas, seperti sampel klinis.
5. Detektor: Dalam KCKT, detektor terbagi menjadi dua kelompok, yaitu detektor universal dan detektor spesifik. Detektor ideal harus memiliki karakteristik berikut:
- Merespons zat terlarut dengan cepat dan berulang.
 - Memiliki sensitivitas yang baik dan mampu mendeteksi zat terlarut dalam jumlah yang sangat kecil.
 - Stabil dalam penggunaan.
 - Memiliki volume kecil untuk mengurangi penyebaran pita.
 - Menghasilkan sinyal dalam rentang yang luas (rentang linier) dan sebanding dengan konsentrasi zat terlarut.
 - Tidak terpengaruh oleh suhu serta kecepatan alir fase gerak.
6. Komputer, Integrator, atau Rekorder: Perangkat akuisisi data seperti komputer, integrator, atau rekorder terhubung ke detektor. Alat ini mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor dan merekamnya sebagai kromatogram yang kemudian dapat dievaluasi oleh analis. (Studi et al., 2022).

2.3.6 Validasi Metode analisis

Validasi metode adalah proses untuk memastikan bahwa suatu metode analitis sesuai untuk tujuan penggunaannya. Ini mencakup serangkaian pengujian dan evaluasi yang dirancang untuk membuktikan bahwa metode tersebut menghasilkan data yang akurat, tepat, dan andal sesuai dengan spesifikasi yang telah ditentukan (Studi et al., 2022). Metode analitik harus divalidasi untuk memastikan bahwa parameter kinerjanya cukup memadai untuk menyelesaikan masalah analitik. Oleh karena itu, metode tersebut harus divalidasi ketika:

1. Metode baru dikembangkan untuk memecahkan masalah analitis tertentu.

2. Metode standar direvisi karena perkembangan atau terjadinya suatu masalah yang menginstruksikan untuk memeriksa metode default.
3. Jaminan kualitas menunjukkan bahwa metode standar telah berubah dari waktu ke waktu.
4. Metode standar digunakan di laboratorium yang berbeda, dilakukan oleh analis yang berbeda, atau dengan peralatan yang berbeda.
5. Menunjukkan persamaan antara dua metode, misalnya antara metode baru dan metode standar.

Semua metode analisis harus dicirikan dengan baik, divalidasi secara lengkap, dan didokumentasikan. Metode analisis harus memenuhi persyaratan yang ditentukan untuk selektivitas, akurasi, batas deteksi, linearitas, dan presisi (Widyati, 2011).

2.3.7 Parameter Validasi Metode analisis

Validasi metode mencakup berbagai parameter seperti akurasi, presisi, spesifisitas, linearitas, batas deteksi (BD), batas kuantifikasi (BK) (Studi et al., 2022).

1. Selektifitas

Selektivitas adalah kemampuan metode untuk mendeteksi dan menganalisis analit dalam matriks tanpa gangguan dari komponen lain yang ada dalam matriks tersebut. Untuk mencapai deteksi yang spesifik, karakteristik unik analit seperti spektrum (panjang gelombang UV, fluoresens), massa molekul, atau fragmentasi molekul dapat digunakan. Selain itu, spesifisitas dapat diperoleh melalui teknik preparasi sampel seperti derivatisasi, ekstraksi, presipitasi, atau adsorpsi (Widyati, 2011). Selektivitas metode dievaluasi dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung polutan, produk degradasi, atau zat lain dengan sampel tanpa zat tersebut, mengidentifikasi penyimpangan jika ada perbedaan hasil (Harmita, 2004). Selektivitas terbukti dengan pemisahan yang baik antara analit dan komponen lain dalam sampel (Gandjar dan Rohman, 2014).

2. Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode analisis untuk memberikan respon yang proporsional terhadap konsentrasi analit, baik secara langsung atau setelah transformasi matematik (Harmita, 2004). Linieritas biasanya dievaluasi dengan membuat kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan antara respon dan konsentrasi analit dalam beberapa konsentrasi baku. Kurva ini digunakan untuk menentukan regresi linear dalam bentuk persamaan $y=bx+a$, di mana x adalah konsentrasi, y adalah respon, a adalah intersep, dan b adalah kemiringan. Tujuan dari regresi ini adalah untuk mengestimasi slope dan intersep yang terbaik, mengurangi residual error antara hasil percobaan dan nilai yang diprediksi oleh persamaan regresi (Widyati, 2011). Koefisien korelasi r digunakan untuk menunjukkan adanya hubungan linear, dengan nilai ideal $b=0$ dan $r=+1$ atau -1 (Harmita, 2004).

3. Akurasi

Akurasi mengukur kedekatan antara nilai yang diperoleh dari metode analisis dan nilai sebenarnya. Ini ditentukan dengan menghitung persentase pemulihan (recovery) yang biasanya diuji pada minimal tiga konsentrasi yang berbeda dan dilakukan dalam tiga replikasi. Akurasi dapat ditentukan dengan metode simulasi (spiked placebo recovery) atau metode penambahan baku (standard addition method). Dalam metode simulasi, analit murni ditambahkan ke plasebo, dianalisis, dan dibandingkan dengan kadar analit yang sebenarnya. Dalam metode penambahan baku, analit ditambahkan ke sampel, dianalisis lagi, dan hasilnya dibandingkan dengan kadar yang diharapkan. Persentase pemulihan dihitung sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dan hasil yang diharapkan (Widyati, 2011).

4. Presisi

Presisi mengukur konsistensi antara hasil tes individu dan dihitung sebagai deviasi hasil dari rata-rata saat metode diterapkan berulang kali pada sampel homogen. Presisi dapat diukur dengan simpangan baku atau koefisien variasi. Presisi dapat berupa keterulangan (repeatability), yaitu akurasi metode dalam

kondisi yang sama dan dalam waktu yang singkat, atau ketertiruan (reproducibility), yaitu akurasi metode dalam kondisi yang berbeda, seperti dengan analis, peralatan, atau laboratorium yang berbeda. (Studi et al., 2022).

5. Sensitivitas

Sensitivitas metode analitis merujuk pada kemampuan metode untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi rendah analit dalam sampel. Parameter sensitivitas yang penting adalah batas deteksi (BD) dan batas kuantifikasi (BK), serta pengaruh perubahan kecil dalam kondisi eksperimen. BD adalah konsentrasi terendah analit yang dapat dideteksi tetapi tidak dapat diukur dengan akurasi, dihitung dengan rumus $BD = 3 * (SD/S)$, di mana SD adalah simpangan baku dan S adalah kemiringan kurva standar. BK adalah konsentrasi terendah yang dapat diukur dengan akurasi dan presisi memadai, dihitung dengan rumus $BK = 10 * (SD/S)$ (Studi et al., 2022).

6. Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem (UKS) digunakan untuk menilai efektivitas sistem analisis. Sistem dianggap layak jika memenuhi kriteria waktu retensi, faktor kapasitas, efisiensi kolom, dan resolusi:

- Waktu Retensi: Waktu yang dibutuhkan setelah penyuntikan sampel untuk munculnya puncak analit dari detektor. Puncak kecil di sebelah kiri menunjukkan waktu mati (endtime).
- Faktor Kapasitas: Parameter yang menjelaskan laju migrasi analit dalam kolom. Nilai k' antara 2-8 menunjukkan pemisahan yang baik.
- Efisiensi Kolom: Jumlah lempeng (*plate number*, N) yang mencerminkan efisiensi kolom, dengan nilai $N > 2500$ dianggap baik. Faktor yang mempengaruhi N termasuk lebar pita, ukuran butir, distribusi ukuran partikel, dan sifat butiran.
- Resolusi: Perbedaan antara dua waktu retensi puncak tetangga, dengan nilai resolusi ideal 1,5 atau lebih untuk pemisahan puncak yang baik (*base line resolution*) (Studi et al., 2022)