

## Development and Validation of Infrared Spectroscopy Methods for Rutin Compound Analysis

Nydia Ashfi Auha<sup>✉</sup>, Mohammad Alauhdin

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang  
Gedung D6 Kampus, Sekaran, Gunungpati, Semarang, 50229, Indonesia

### Info Artikel

Diterima Juli 2021

Disetujui Agustus 2021

Dipublikasikan September 2021

#### Keywords:

Rutin

FTIR

Method Validation

### Abstrak

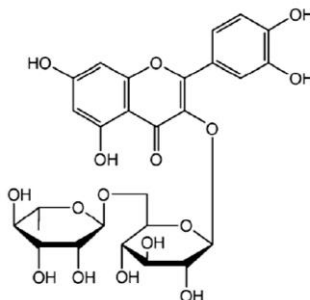
Rutin adalah glikosida hasil kondensasi aglikon kuersetin dengan gula rutinosa. Beberapa penelitian menunjukkan rutin dapat mengurangi hipertrofi jantung dan memperbaiki kesehatan jantung. Kadar yang tepat dapat mengoptimalkan kinerja rutin, maka perlu adanya pengembangan metode penetapan kadar rutin dan validasinya. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode analisis terhadap senyawa rutin dengan FTIR dan validitasnya. Metode FTIR memiliki beberapa kelebihan diantaranya preparasinya sederhana, pemindaianya cepat, resolusi tinggi, tidak memakan waktu lama, dan tanpa menggunakan reagen berbahaya serta dapat untuk analisis kualitatif dan kuantitatif sekaligus. Zat standar rutin dengan variasi massa (0,5-1,75 mg) dicampur secara homogen dengan KBr sehingga massa totalnya 16 mg. Campuran rutin dan KBr kemudian dibuat pellet dengan mesin hidrolis sehingga diperoleh pellet yang transparan. Pengukuran dilakukan pada bilangan gelombang 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  dengan 8 kali pengukuran. Validasi metode meliputi linearitas,  $LoD$ ,  $LoQ$ , dan uji presisi. Berdasarkan hasil analisis, puncak khas senyawa rutin terdapat pada rentang bilangan gelombang 900-690  $\text{cm}^{-1}$  yaitu serapan dari C-H aromatis. Analisis senyawa rutin dengan FTIR memiliki linearitas,  $LoD$ , dan  $LoQ$  masing-masing sebesar 0,8719; 0,7 mg; dan 2,5 mg; serta %RSD keterulangan 17,68 % dan % RSD ketertiruan 17,62 %.

### Abstract

Rutin is a glycoside resulting from the condensation of the aglycone quercetin with the sugar rutinose. Some study show that rutin can reduce cardiac hypertrophy and improve heart health. Appropriate levels can optimize rutin performance, it is necessary to develop methods for rutin assays and their validation. This study aims to develop an analytical method for rutin compound with FTIR and their validity. The FTIR methods has several advantages including simple preparation, fast scanning, high resolution, does not take long, and without the use of hazardous reagents and can be used for qualitative and quantitative analysis at the same time. The standard rutin with mass variation (0.5-1.75 mg) was mixed homogeneously with KBr so that the total mass was 16 mg. The mixture of rutin and KBr then made into pellets with a hydraulic machine so that transparent pellets were obtained. Measurement were carried out at wave number 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  with 8 scanning. Methods validation include linearity,  $LoD$ ,  $LoQ$ , and precision test. Based on the result of the analysis, the typical peak of rutin compounds is in the wave number range of 900-690  $\text{cm}^{-1}$  namely aromatic C-H. Rutin had linearity,  $LoD$ , and  $LoQ$  of 0.8719, 0.7 mg, and 2.5 mg, and %RSD repeatability 17.68 % and %RSD reproducibility 17.62 %.

## Pendahuluan

Rutin merupakan glikosida kuersetin dengan disakarida yang terdiri dari glukosa dan rhamnosa (Kar, 2014). Rutin berupa serbuk halus berwarna kuning pucat dan mengandung tidak kurang dari 95% dan tidak lebih dari 100,5%  $C_{27}H_{30}O_{16}$  dihitung terhadap zat anhidrat. Rutin tidak berbau, kristal rutin mengikat tiga molekul air yang meleleh pada temperatur 185 °C dan 192 °C dan mengurai pada temperatur 211 °C dan 215 °C. Pengeringan pada suhu 95–97 °C akan menghilangkan satu molekul  $H_2O$ , jika pemanasan dilakukan pada suhu 100 °C selama 12 jam dan tekanan 10 mmHg baru didapatkan rutin anhidrat (Yusuf *et al.*, 2005).



Gambar 1. Struktur Senyawa Rutin (Han, 2009)

Kelarutan rutin adalah 1 gram per 1 liter air, 200 ml air mendidih, atau 7 ml alkohol mendidih. Rutin juga larut dalam piridin, formamide, dan larutan alkali. Sementara itu rutin sukar larut dalam alkohol, aseton, dan etil asetat, serta tidak larut dalam kloroform, eter, benzene, dan petroleum eter. Isolasi rutin dapat dilakukan menggunakan etanol 95% panas (Riyanto, 1990). Rutin menunjukkan kelarutan yang lebih tinggi dalam air daripada kuersetin karena hidrofilisitas gula, tetapi aktivitas antioksidannya lebih lemah. Beberapa penelitian menunjukkan rutin dapat mengurangi hipertrofi jantung dan memperbaiki kesehatan jantung (Chu *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2017; & Imam *et al.*, 2017).

Hidrolisis rutin menghasilkan kuersetin dan rutinosa yang dikatalisis oleh glukosidase (Shen *et al.*, 2002). Keberadaan senyawa kuersetin biasanya bersamaan dengan senyawa rutin (Chen *et al.*, 2000), hal ini dijelaskan dengan oksidasi kuersetin menghasilkan asam 3,4-dihidroksibenzoat yang merupakan agen antijamur untuk tanaman.

Tatke *et al.*, (2014) melakukan penelitian tentang isolasi rutin dari *Azadirachta indica*. Hasil analisis FTIR menunjukkan adanya puncak pada bilangan gelombang  $3200,29\text{ cm}^{-1}$  dan  $1660,41\text{ cm}^{-1}$  yang terkonfirmasi sebagai puncak regangan O-H dan C=O. Sementara itu, analisis dengan HPLC menunjukkan kemurnian rutin 98,23 %. Selain itu, Azizah *et al.*, (2020) juga melakukan penelitian untuk menetapkan kadar rutin pada daun *Manihot esculenta crants* menggunakan spektrofotometer UV-Vis, hasilnya menunjukkan kadar rutin pada isolat sebanyak 4,987 %. Kadar yang tepat dapat mengoptimalkan rutin dalam aktivitas biologisnya, maka perlu adanya pengembangan metode penetapan kadar rutin dan validasinya.

Penelitian ini mengembangkan metode analisis terhadap rutin dengan FTIR secara kualitatif dan kuantitatif. Metode FTIR memiliki beberapa kelebihan diantaranya preparasinya sederhana, pemindaianya cepat, resolusi tinggi, tidak memakan waktu lama, dan tanpa menggunakan reagen berbahaya serta dapat untuk analisis kualitatif dan kuantitatif sekaligus.

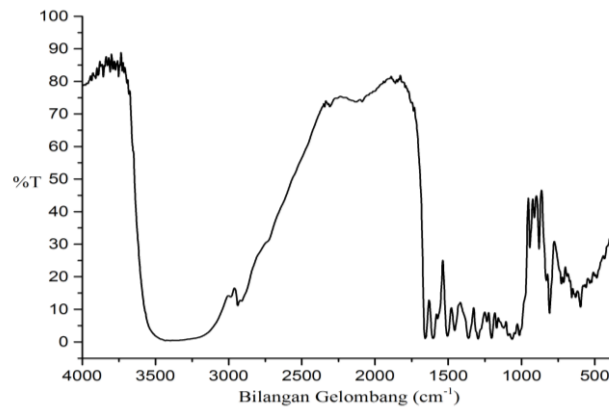
## Metode

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Instrumen yang digunakan yaitu FTIR (Perkin Elmer). Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu rutin standar, etanol p.a. dan KBr.

Zat standar rutin dengan variasi massa (0,5-1,75 mg) dicampur secara homogen dengan KBr sehingga massa totalnya 16 mg. Campuran rutin dan KBr kemudian dibuat pellet dengan mesin hidrolik sehingga diperoleh pellet yang transparan (Kristianingrum, 2016). Pengukuran dilakukan pada bilangan gelombang  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  dengan 8 kali pengukuran. Pengukuran ini menghasilkan data puncak khas rutin dan kurva standar. Validasi metode meliputi linearitas,  $LoD$ ,  $LoQ$ , dan uji presisi.

## Hasil dan Pembahasan

Spektra IR zat standar rutin hasil pengukuran (Gambar 1) menunjukkan adanya puncak O-H pada  $3430,25\text{ cm}^{-1}$ , C-H alkana pada  $2938,5\text{ cm}^{-1}$  dan  $1426,25\text{ cm}^{-1}$ , C=O pada  $1658,25\text{ cm}^{-1}$ , C=C aromatis pada  $1556\text{ cm}^{-1}$ , C-O pada  $1131,75\text{ cm}^{-1}$ , serta C-H aromatis pada  $828,5\text{ cm}^{-1}$  dan  $710,25\text{ cm}^{-1}$ . Hasil pengukuran ini sesuai dengan penelitian Yusuf *et al.*, (2005) dan Tatke *et al.*, (2014).



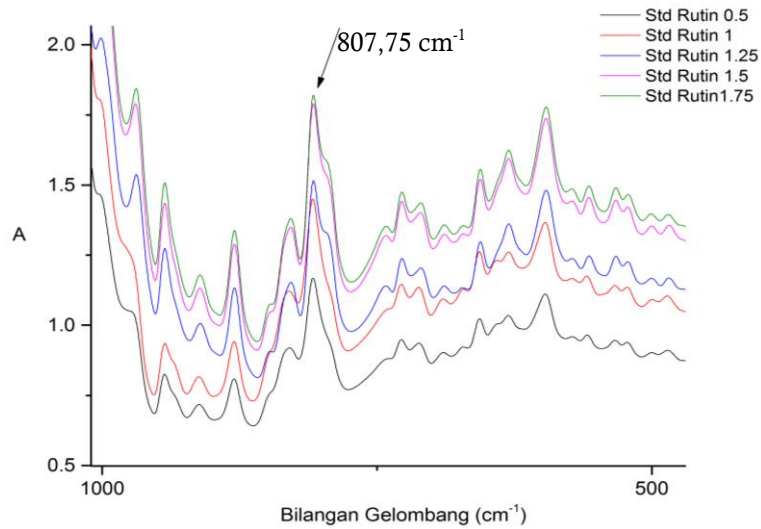
**Gambar 2.** Spektra IR Standar Rutin pada Bilangan Gelombang 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

**Tabel 1.** Hasil Pengukuran Standar Rutin.

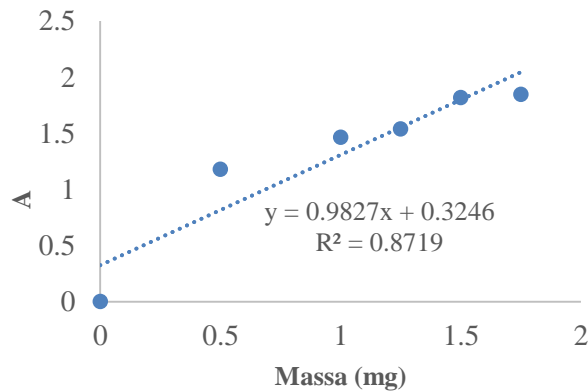
Gugus Fungsi	Pelet KBr ( $\text{cm}^{-1}$ )	Literatur (Yusuf <i>et al.</i> , 2005) ( $\text{cm}^{-1}$ )
O-H	3430,25	3417
C-H	2938,5	1293,3
(alkana)	1426,25	1063,4
C=O	1658,25	1651,5
C=C	1556	1651,5
(aromatis)		1502,6
C-O	1131,75	1203,6
C-H	828,5	804,1
(alkena)	710,25	

Puncak khas rutin difokuskan dalam rentang 900-690  $\text{cm}^{-1}$  yang merupakan puncak dari C-H aromatis. Hal ini berdasarkan pada struktur senyawa rutin yang mana memiliki bentuk aromatis. Puncak khas ini digunakan untuk dasar analisis selanjutnya yaitu validasi metode. Absorbansi maksimum pada rentang bilangan gelombang tersebut terdapat pada bilangan gelombang 807,75  $\text{cm}^{-1}$ . Spektra standar senyawa rutin secara spesifik dapat dilihat pada Gambar 2. Kurva standar rutin memiliki persamaan linier  $y = 0,9827x + 0,3246$  dengan nilai  $r^2$  sebesar 0,8719. Nilai  $r^2$  ini menunjukkan respon instrumen terhadap sampel kurang baik. Kurva standar rutin menunjukkan absorbansi berbanding lurus dengan massa rutin. Semakin besar massa rutin semakin besar pula absorbansinya.

Berdasarkan kurva standar rutin, selain linearitas juga dapat menunjukkan nilai  $LoD$  dan  $LoQ$  yang masing-masing sebesar 0,7 mg dan 2,5 mg. Ini berarti jumlah analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan memberikan respon signifikan sebesar 0,7 mg, sedangkan jumlah analit dalam sampel yang dapat dikuantifikasi sebesar 2,5 mg. Hasil penelitian ini memberikan linearitas dan sensitivitas pengukuran yang lebih rendah dibandingkan hasil pengukuran menggunakan HPLC (Landim *et al.*, 2013, Kicel *et al.*, 2015). Pengukuran dengan HPLC memberikan  $r^2$  lebih besar dari 0,9900 dengan  $LoD$  dan  $LoQ$  masing-masing 0,09  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dan 0,29  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Landim *et al.*, 2013). HPLC memang masih menjadi metode pilihan yang sensitif dalam analisis senyawa-senyawa aktif obat.



**Gambar 3.** Perbandingan Puncak Serapan Khas Rutin ( $807,75 \text{ cm}^{-1}$ ) pada Berbagai Konsentrasi.



**Gambar 4.** Kurva Standar Rutin (Absorbansi diperoleh pada bilangan gelombang  $807,75 \text{ cm}^{-1}$ )

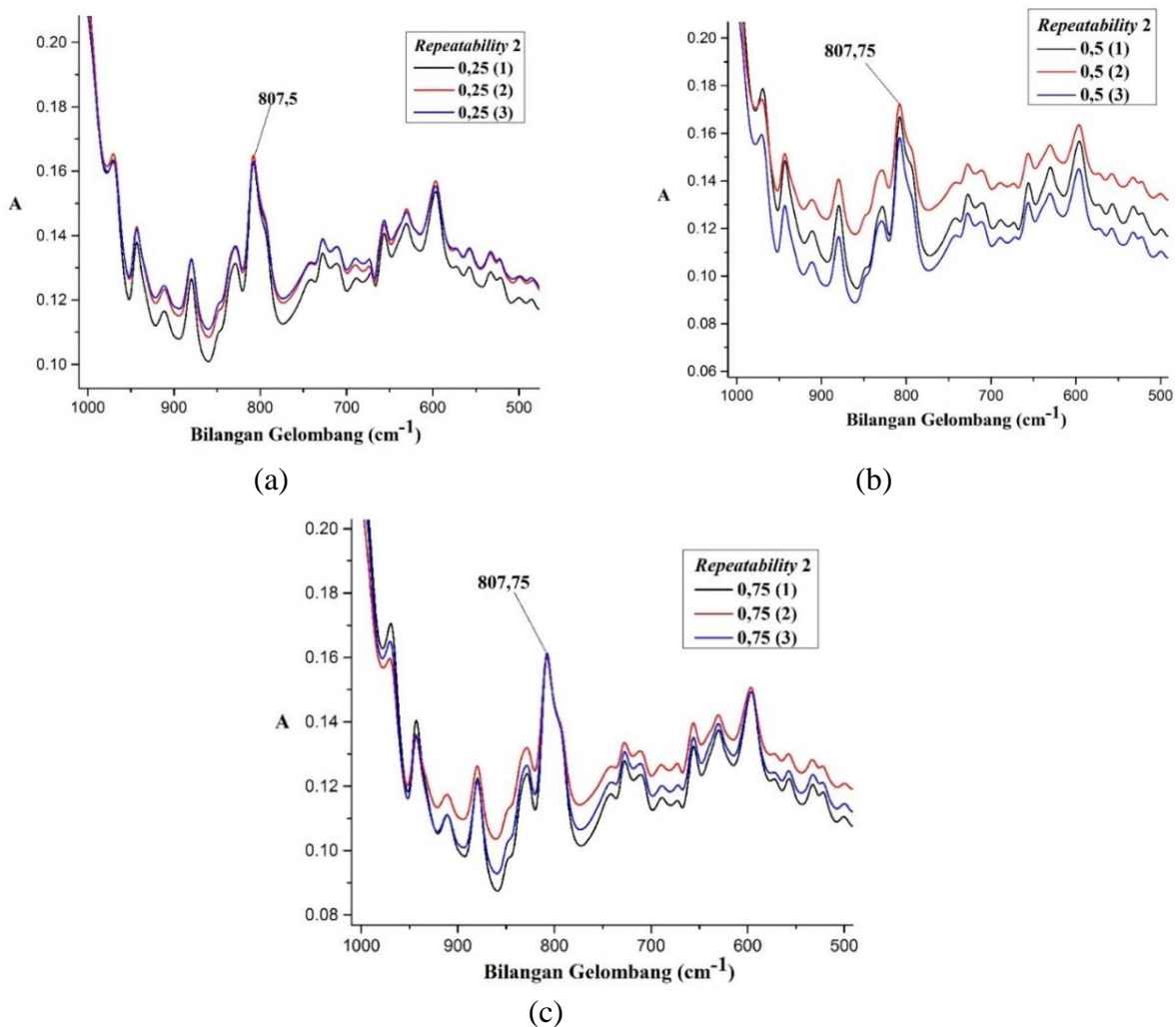
**Tabel 2.** Data Puncak Terisolasi, linearitas, *LoD* dan *LoQ* Senyawa Rutin.

Parameter	Rutin
Koefisien determinasi ( $r^2$ )	0,8719
<i>LoD</i> (mg)	0,7 mg
<i>LoQ</i> (mg)	2,5 mg
Rentang puncak terisolasi ( $\text{cm}^{-1}$ )	900-690

Uji presisi pada metode ini dilakukan secara keterulangan (*repeatability*) dan ketertiruan (*reproducibility*). Uji keterulangan dilakukan di hari yang sama dengan tiga kali pengukuran pada setiap konsentrasi standar rutin. Uji ketertiruan dilakukan tiga hari berturut-turut pada setiap konsentrasi rutin standar. Spektra FTIR uji presisi dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil perhitungan data penelitian menunjukkan nilai %RSD keterulangan sebesar 17,68% dan nilai %RSD ketertiruan sebesar 17,62%. Uji keterulangan hari pertama dan kedua menunjukkan presisi yang lebih baik dengan %RSD 9,90% dibandingkan uji keterulangan hari ketiga (%RSD 17,68%). Uji ketertiruan juga tidak presisi karena menghasilkan nilai RSD besar, yaitu 17,62%. Penelitian lain dilakukan Landim *et al.*, (2013) menggunakan HPLC menunjukkan nilai %RSD keterulangan 0,551% dan ketertiruan 0,668%. Selain itu, Wang *et al.*, (2011) juga melakukan penelitian terhadap senyawa rutin dengan HPLC, hasilnya menunjukkan nilai %RSD keterulangan sebesar 1,77% dan ketertiruan 2,53%. Menurut Riyanto (2014) uji presisi dikatakan baik apabila memiliki nilai %RSD  $\leq 5\%$ . Hal ini menunjukkan nilai presisi keterulangan pada 0,25 mg lebih presisi dari Landim dan Wang, tetapi nilai presisi ketertiruan tidak lebih presisi dari Landim dan Wang. Metode HPLC dinilai memiliki sensitivitas yang lebih baik dibanding dengan FTIR untuk analisis. Penelitian dengan FTIR perlu dilakukan lebih lanjut dengan memperkecil massa zat standar yang diukur.

**Tabel 3.** Uji Presisi Rutin.

Massa (mg)	Keterulangan, n = 3 (mg±RSD)			Ketertiruan n = 9 (mg±RSD)
	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	
0,25	0,4888 ± 0,0191	0,4853 ± 0,0023	0,4999 ± 0,0078	0,4913 ± 0,0169
0,50	0,4733 ± 0,0990	0,4875 ± 0,0143	0,9458 ± 0,0371	0,5139 ± 0,1112
0,75	0,4689 ± 0,0545	0,4826 ± 0,0011	1,1411 ± 0,1768	0,5509 ± 0,1762

**Gambar 5.** Spektra FTIR Uji Presisi Rutin Keterulangan Hari-2 a) 0,25 mg ;b) 0,5 mg; dan c) 0,75 mg

### Simpulan

Berdasarkan hasil analisis terhadap spektrum IR, puncak serapan khas senyawa rutin terdapat pada rentang bilangan gelombang 900-690 cm<sup>-1</sup> yaitu serapan oleh C-H aromatis. Analisis senyawa rutin dengan FTIR memiliki linearitas, LoD, dan LoQ sebesar 0,8719; 0,7 mg; dan 2,5 mg serta %RSD keterulangan 17,68 % dan %RSD ketertiruan 17,62 %.

### Daftar Referensi

- Azizah, Z., F. Elvis, Zulharmita, S. Misfadhila, B. Chandra, & R.D. Yetti. 2020. Penetapan Kadar Flavonoid Rutin pada Daun Ubi Kayu (*Manihot esculenta crantz*) secara Spektroskopi Sinar Tampak. *Jurnal Farmasi Higea*, 12(1): 90-98.
- Chen, G., H. Zhang, & J. Ye. 2000. Determination of Rutin and Quercetin in Plants by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *Anal. Chim. Acta*, 423: 69-76

- Chu, J.X., G.M. Li, X J. Gao, J.X. Wang, & S.Y. Han. 2014. Buckwheat Rutin Inhibits Ang II-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy via Blockade of CaN-Dependent Signal Pathway. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(4): 1347–1355.
- Han, Y. 2009. Rutin Has Therapeutic Effect on Septic Arthritis Caused by *Candida Albicans*. *International Immunopharmacology*, 9: 207-211.
- Huang, R., Z. Shi, L. Chen, Y. Zhang, J. Li, & Y. An. 2017. Rutin Alleviates Diabetic Cardiomyopathy and Improves Cardiac Function in Diabetic ApoE Knockout Mice. *European Journal of Pharmacology*, 814: 151–160 .
- Imam, F., N.O. Al-Harbi, M.M. Al-Harbia, H.M Korashy, M.A. Ansari, & M.M. Sayed-Ahmed. 2017. Rutin Attenuates Carfilzomib-Induced Cardiotoxicity Through Inhibition of NF- $\kappa$ B, Hypertrophic Gene Expression and Oxidative Stress. *Cardiovascular Toxicology*, 17(1): 58–66.
- Kar, A. 2014. Farmakognosi & Farmakobioteknologi Volume 1 Edisi 2. Jakarta : Kedokteran EGC.
- Kicel, A., A. Owczarek, P. Michel, K. Skalicka-Wozniak, A.K. Kriss, & M.A. Olszewska. 2015. Application of HPLC, UHPLC-PDA-ESI-MS<sup>3</sup> and HPLC-PDA Methods for Rapid, One-Step Preparative Separation and Quantification of Rutin in Forsythia Flowers. *Elsevier*, 86-94.
- Kristianingrum, S. 2016. Handout Spektroskopi Infra Merah. Yogyakarta: Univeritas Negeri Yogyakarta.
- Landim, L.P., G.S. Feitoza, & J.G.M. da Costa. 2013. Development and Validation of a HPLC Method for the Quantification of Three Flavonoids in a Crude Extract of *Dimorphandra gardneriana*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(1).
- Riyanto, P.D., 2014. *Validasi & Verifikasi Metode Uji: Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi* (1<sup>st</sup> ed.). Yogyakarta: Deepublish.
- Riyanto, S. 1990. *Analisis Metabolit Sekunder : Flavonoid*. Yogyakarta : UGM.
- Shen, S.C., W.R. Lee, H.Y. Lin, H.C. Huang, C.H. Ko, L.L. Yang, & Y.C. Chen. 2002. In Vitro and In Vivo Inhibitory Activities of Rutin, Wogonin, and Quercetin on Lipopolysaccharide Induced Nitric oxide and Prostaglandin E2 Production. *Eur. J. Pharmacol*, 446(1-3): 187–194.
- Tatke, P., S. Desai, & S.Y. Gabhe. 2014. Isolation of Quercetin-3-O- $\beta$ -D-Glucoside from *Azadirachta indica*. *American Journal od Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(7): 870-876.
- Wang, C., Y. Wang, & H. Liu. 2011. Validation and Application by HPLC for simultaneous determination of Vitexin-2''-O-glucoside, Vitexin-2''-O-rhamnoside, Rutin, Vitexin, and Hyperoside. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 1(4): 291-296.
- Yusuf, S. & B. Untari. 2005. Kuersetin-3-O-Glikosida (Rutin) dari Daun Ubi Karet (*Manihot Glaziovii.M.A*). *Jurnal Pendidikan Sains*, 18: 1-8.