
VALIDASI METODE PENGUJIAN SENYAWA 1,8-SINEOL DALAM MINYAK ATSIRI MELALUI STUDI KOLABORASI ANTAR LABORATORIUM

Method Validation of 1,8-Cineole Determination in Essential Oil Through Interlaboratory Comparison

Raden Tina Rosmalina, Een Sri Endah, dan Yohanes Susanto Ridwan

Loka Penelitian Teknologi Bersih, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Komplek LIPI, Jl. Cistur-Sangkuriang, Bandung, Jawa Barat, Indonesia 40135
e-mail: tinarosmalina@yahoo.com

Diterima: 4 Maret 2019, Direvisi: 10 April 2019, Disetujui: 6 Maret 2020

Abstrak

1,8-Sineol merupakan suatu senyawa terpenoid yang banyak dikandung pada minyak atsiri serta berbagai rempah-rempah. Senyawa 1,8-Sineol memiliki karakteristik segar dan aroma menyengat juga rasa tajam yang memiliki bioaktivitas yang banyak manfaatnya, yaitu penurunan aktivitas lokomotor (antikejang), anti-kanker dan anti-tumor, antifungi, antiinflamasi, antioksidan, sebagai insektisida atau repelan, dan dapat mengurangi resiko penyakit kardiovaskular. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan memvalidasi metode penetapan kadar senyawa 1,8-Sineol menggunakan kromatografi gas yang dilengkapi dengan detektor nyala (FID) melalui studi kolaborasi antar laboratorium. Validasi metode meliputi uji linieritas, nilai perolehan kembali, presisi, akurasi, konfirmasi identitas, dan estimasi ketidakpastian pengukuran. Kandungan Sineol ditetapkan dengan GC-FID menggunakan kolom HP-5 (30 m x 0,32 mm i.d, 0,25 μ m). Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode yang diusulkan memenuhi persyaratan kesesuaian sistem dengan kurva kalibrasi memberikan hasil yang linier dalam rentang konsentrasi 1 – 20 μ g/mL dengan koefisien korelasi 0,999. Uji presisi dari minyak atsiri untuk 1,8-Sineol diperoleh 1,81% dan rata-rata nilai uji perolehan kembali dalam rentang 89,77-106,10%. Uji metode dilakukan juga dengan studi kolaborasi melibatkan tiga laboratorium dengan hasil seluruhnya linier. Dengan demikian, metode yang diusulkan dapat digunakan untuk menetapkan kandungan 1,8-Sineol dalam minyak atsiri.

Kata kunci : 1,8-Sineol, GC-FID, studi kolaborasi, validasi metode

Abstract

1,8-Cineole is a terpenoid compound that is widely contained in essential oils and various spices. 1,8-Cineole compounds have fresh characteristics and pungent aroma and strong taste having many bioactivity benefits, such as decreased locomotor (anticonvulsant), anti-cancer and anti-tumor activity, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant, insecticide or repellent, and can reduce the risk of cardiovascular disease. This study aims to develop and validate the method determination of 1,8-Cineole compound using gas chromatography equipped with a flame detector (FID) through collaboration study. Method validation includes linearity test, recovery value, precision, accuracy, identity confirmation, and estimation of uncertainty measurement. Sineole content was determined by GC-FID using HP-5 column (30 m x 0.32 mm i.d, 0.25 μ m). The results showed that the proposed method met the requirements of a good system and the calibration curve provides linear results in the concentration range of 1 to 20 μ g/mL with a correlation coefficient of 0.9992. The precision test of essential oils for 1,8-Cineole was obtained 1.81% and the average recovery was in the range of 89.77 to 106.10%. Accuracy of the test method was also examined through a collaborative study involving three laboratories and the results were satisfactory. Thus, the proposed method can be used to determine the content of 1,8-Cineole in essential oils.

Keyword: 1,8-Cineole, collaboration study, GC-FID, method validation

1. PENDAHULUAN

Berbagai jenis tumbuhan telah dimanfaatkan sejak berabad-abad yang lalu, seperti misalnya untuk obat-obatan, rempah-rempah, zat aromatik, zat warna, racun, dan lain-lain (Arbain, 1999). Dewasa ini minat masyarakat untuk kembali pada

pengobatan tradisional semakin meningkat. Pengobatan dengan ramuan tradisional dirasakan lebih murah dari pada obat kimiawi sintetis. Prosedur pembuatannya pun mudah bahkan dalam keadaan mendesak. Peluang untuk mendapatkan ramuan mujarab dan mudah diperoleh masih terbuka lebar (Thomas, 2000). Salah satu

tumbuhan yang banyak dimanfaatkan oleh manusia adalah jenis tumbuhan yang menghasilkan minyak atsiri (Kirana, 2016).

Minyak atsiri minyak yang mudah menguap atau minyak terbang berwujud cairan kental pada suhu ruang yang memiliki komposisi maupun titik didih yang beragam, Minyak atsiri dapat diperoleh dari bagian tanaman meliputi akar, kulit, batang, daun, buah, biji maupun dari bunga (Sastrohamidjojo, 2004).

Komponen utama dari minyak atsiri adalah monoterpena 1,8-Sineol (60-85%) (Blumenthal, 1998). Juga dilaporkan adanya konstituen lain seperti α -pinene, β -pinene, limonene, terpinen-4-ol, antara lain, bervariasi sesuai dengan asal bahan tanaman yang digunakan untuk mendapatkan minyak (Kumar, 2012; Silvestre, Cavaleiro, Delmond, Filliatre, & Bourgeois, 1997).

Senyawa 1,8-Sineol merupakan salah satu senyawa yang biasanya terkandung dalam minyak atsiri, bahkan ada beberapa tumbuhan yang memiliki kandungan utamanya adalah senyawa 1,8-Sineol, diantaranya kayu putih, kardamomi, lavender, jahe (Cahyono, 2017), rosemary, dan daun sage (Zhao & Harrington, 2017). Senyawa 1,8-Sineol merupakan persenyawaan yang masuk dalam golongan hidrokarbon teroksigenasi. Senyawa 1,8-Sineol memiliki karakteristik segar dan aroma menyengat dan rasa tajam yang memiliki banyak manfaat, seperti digunakan untuk obat-obat penggunaan luar, semprot hidung, *disinfectant*, analgesik, atau penyedap makanan, juga untuk kosmetik. Selanjutnya, dilaporkan juga bahwa 1,8-Sineol digunakan untuk mengobati batuk, nyeri otot, neurosis, rematik, asma, dan batu kemih (Geremia, 1955; Margret, 1999).

Beberapa literatur menjelaskan mengenai beberapa metode yang bisa dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa 1,8-Sineol seperti kromatografi gas. Dalam kimia analitik, penelitian berkembang untuk menyederhanakan preparasi sampel, waktu yang dibutuhkan, dan larutan organik yang digunakan untuk ekstraksi. Tujuan dari penulisan ini adalah untuk mengembangkan metode analisis yang cepat, sederhana, akurat, spesifik yang mampu mengidentifikasi senyawa 1,8-Sineol dengan GC-FID.

Metode yang akan digunakan pada penelitian ini merupakan pengembangan dari metode SNI 06-3954-2006 yang mana dalam metode SNI tidak menjelaskan mengenai preparasi sampel secara detail, menggunakan kolom kapiler *carbowax* 20 M, dan memerlukan waktu tambat yang cukup lama

yaitu 55 menit. Dalam penelitian ini, diusulkan suatu proses preparasi sampel yang praktis, menggunakan kolom kapiler yang lain yaitu HP-5 sehingga memberikan alternatif jenis kolom kapiler yang dapat digunakan untuk pengujian senyawa 1,8-Sineol, dan diusulkan juga kondisi pengukuran dengan waktu tambat yang cukup singkat yaitu 16 menit yang lebih cepat daripada metode SNI 06-3954-2006. Oleh karena itu, metode yang digunakan dalam penelitian ini perlu divalidasi karena mengalami beberapa perubahan parameter. Parameter uji validasi yang akan dilakukan diantaranya uji linieritas, uji presisi, uji perolehan kembali (*recovery*), uji akurasi, konfirmasi identitas, estimasi ketidakpastian pengukuran, serta validasi melalui studi kolaborasi antar laboratorium. Instrumentasi yang digunakan adalah kromatografi gas dengan detektor ionisasi nyala (GC-FID) yang diaplikasikan untuk analisis kuantitatif 1,8-Sineol dalam minyak atsiri.

2. TINJAUAN PUSTAKA

Minyak atsiri dikenal sebagai minyak eteris, minyak terbang atau minyak mudah menguap tersusun dari banyak komponen senyawa kimia yang berwujud cairan atau padatan dengan komposisi dan titik didih beragam (Sastrohamidjojo, 2004).

Minyak atsiri pada tanaman mempunyai 3 fungsi yaitu membantu proses penyerbukan dengan menarik beberapa jenis serangga atau hewan, mencegah kerusakan tanaman oleh serangga atau hewan lain dan sebagai cadangan makanan dalam tanaman. Minyak atsiri merupakan salah satu hasil sisa proses metabolisme dalam tanaman, yang terbentuk karena reaksi antara berbagai persenyawaan kimia dalam tanaman. Minyak tersebut disintesa dalam sel kelenjar pada jaringan tanaman dan ada juga yang terbentuk dalam pembuluh resin (Ketaren, 1985).

Minyak atsiri umumnya terdiri dari berbagai campuran persenyawaan kimia yang terbentuk dari unsur karbon (C), hidrogen (H), dan oksigen (O) serta beberapa persenyawaan kimia yang mengandung unsur nitrogen (N) dan belerang (S). Pada umumnya sebagian besar minyak atsiri terdiri dari campuran persenyawaan golongan hidrokarbon dan hidrokarbon teroksigenasi (Ketaren, 1985).

1,8-Sineol merupakan eter siklik dengan rumus empiris $C_{10}H_{18}O$ dan nama sistematis 1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo [2.2.2] octane yang termasuk ke dalam kelompok komponen

hidrokarbon teroksigenasi monoterpen. 1,8-Sineol dalam perdagangan komersial disebut sebagai "eucalyptol". Sifat kimia dan fisika senyawa 1,8-Sineol dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini (Irvan & Sasmitra, 2015) dan Struktur dari senyawa 1,8-Sineol dapat dilihat pada Gambar 1.

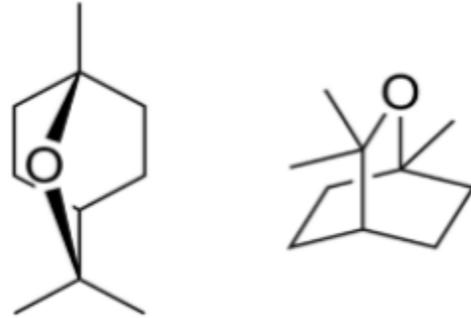
Tabel 1 Sifat kimia dan fisika 1,8-Sineol (Irvan & Sasmitra, 2015).

Rumus Kimia	C ₁₀ H ₁₈ O
Kelarutan dalam Air	3,5 g/l (21 oC)
Titik Leleh	1,5 oC
Massa Molar	154,25 g/mol
Densitas	0,925 g/cm ³ (20 oC)
Titik Didih	174-177 oC
Titik Nyala	49 oC

Senyawa 1,8-Sineol memiliki karakteristik segar dan aroma menyengat dan rasa tajam yang memiliki bioaktivitas yang memiliki banyak manfaat, yaitu penurunan aktivitas lokomotor (antikejang), anti-kanker dan anti-tumor, antibakteri, antifungi, antiinflamasi, antioksidan, insektisida dan repelan, dan dapat mengurangi resiko penyakit kardiovaskular (Kirana, 2016). Meskipun dapat digunakan sebagai penyedap makanan dan bahan obat, sineol dapat mengakibatkan keracunan jika tertelan melebihi dosis normal (ScienceLab, 2009). Senyawa 1,8-Sineol memiliki kemampuan sebagai fumigan pada kutu beras (*Sitophilus oryzae*) dengan tingkat mortalitas 100% pada dosis penggunaan sebanyak 150 µL/L dan waktu paparan selama 45 jam (Sari dan Edy, 2016). Penelitian terdahulu mengenai 1,8-Sineol menunjukkan aktivitas antimikroba *E.coli* dan *Bacillus subtilis* (Sihombing, 2014). Menurut Jantan, Ahmad, F., & Ahmad, A.S. (2004) sejumlah bahan aktif termasuk 1,8-Sineol menunjukkan aktivitas antifungal terhadap beberapa jamur pada konsentrasi yang relatif sangat rendah. Selain itu senyawa 1,8-Sineol dalam daun dan batang kayu putih memiliki aktivitas sebagai antimikroba pada *S. aureus*, *S. epidermidis*, dan *B. cereus* (Nazeh at al., 2015).

Pada literatur ditemukan informasi bahwa pengujian senyawa 1,8-Sineol dapat juga dilakukan dengan instrumen GC-MS dengan nilai recovery yang cukup baik yaitu 99,94 % (Aboul-Enein, Eldee & Etman, 2012). Selain itu ditemukan juga bahwa pengujian senyawa 1,8-Sineol dapat dianalisis menggunakan kromatografi gas (GC-FID) (SNI, 2006), kromatografi cair (Munari, Dugo, and Cotroneo, 1990), GC-FT-IR (Compton and Stout,

1991), dan GC multidimensi dengan MS atau FT - Deteksi IR (Gordon *et al*, 1988), namun informasi nilai *recovery* metode tidak ditemukan.



Gambar 1 Struktur molekul 1,8 Sineol (Z. Alfian, 2018).

Validasi metode merupakan syarat penting dalam praktik analisis kimia (Magnusson, 2004). Berdasarkan ISO/ICE 17025:2017 klausul 7.2 mengenai seleksi, verifikasi dan validasi metode bahwa laboratorium harus memvalidasi metode non-standar, metode yang dikembangkan oleh laboratorium dan metode standar yang digunakan di luar lingkup yang dimaksudkan atau dimodifikasi. Metode yang akan digunakan pada penelitian ini merupakan pengembangan dari metode SNI 06-3954-2006 yang mana dalam metode SNI tidak menjelaskan mengenai preparasi sampel secara detail, menggunakan kolom kapiler *carbowax* 20 M, dan memerlukan waktu tambat yang cukup lama yaitu 55 menit.

Dalam penelitian ini, diusulkan suatu proses preparasi sampel yang praktis, menggunakan kolom kapiler yang lain yaitu HP-5 sehingga memberikan alternatif jenis kolom kapiler yang dapat digunakan untuk pengujian senyawa 1,8-Sineol, dan diusulkan juga kondisi pengukuran dengan waktu tambat yang cukup singkat yaitu 16 menit yang lebih cepat daripada metode SNI 06-3954-2006. Oleh karena itu, metode yang digunakan dalam penelitian ini perlu divalidasi karena mengalami beberapa perubahan parameter. Parameter uji validasi yang akan dilakukan diantaranya uji linieritas, uji presisi, uji perolehan kembali (*recovery*), uji akurasi, konfirmasi identitas, estimasi ketidakpastian pengukuran, serta validasi melalui studi kolaborasi antar laboratorium. Instrumen yang digunakan adalah kromatografi gas dengan detektor ionisasi nyala (GC-FID) yang diaplikasikan untuk analisis kuantitatif 1,8-Sineol dalam minyak atsiri.

3. METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya seperangkat kromatografi gas FID Agilent Technologies 7890B dengan kolom HP-5 Agilent Technologies (30 m x 0,32 mm i.d, 0,25 μ m) dan Helium UHP (kemurnian 99,999%) dari Alpha Gas digunakan sebagai gas pembawa dengan laju aliran 1 mL / menit. Suhu port injektor diatur pada 250 °C, dan suhu detektor adalah 300 °C. Injektor dioperasikan dalam mode split 1:1 dan volume injeksi 1 μ L. Suhu oven diatur menggunakan program sebagai berikut: temperatur awal, 80 °C (tahan selama 2 menit), kenaikan temperatur pada 10 °C / menit hingga 220 °C. Standar dan sampel pengujian dikemas dalam ampul amber supelco untuk studi kolaborasi antar laboratorium, mikropipet Grand 1000 uL, dan homogenisasi menggunakan shaker IKA vortex Genius 3.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah standar 1,8-Sineol *Primary Reference Standard HWI Group*, Etanol p.a dari Merck, dan sampel minyak atsiri yang digunakan adalah minyak kayu putih cap Gading.

3.2 Prosedur

Linieritas dan kurva kalibrasi

Linieritas dilakukan dengan menyiapkan enam larutan standar 1,8-Sineol dalam etanol dengan rentang konsentrasi antara 1 sampai 20 μ g/mL. Setiap larutan standar disiapkan dengan proses pengenceran serial dari satu stok dan diinjeksikan secara duplo ke dalam kromatografi gas kemudian dilakukan analisis regresi linier.

Presisi

Presisi metode dilakukan dengan menguji senyawa 1,8-Sineol dalam sampel minyak kayu putih sebanyak 7 kali, hal ini dilakukan agar jumlah data yang diperlukan cukup mewakili populasi data untuk pengolahan uji statistik. Konsentrasi sampel dihitung berdasarkan luas puncak yang diplot terhadap kurva kalibrasi, lalu dihitung RSD dan dibandingkan dengan CV Horwitz (%).

Uji perolehan kembali (*recovery*)

Uji *recovery* dilakukan dengan menambahkan larutan standar 1,8-Sineol ke dalam sampel lalu diinjeksikan ke dalam kromatografi gas, hal ini dilakukan tujuh kali pengulangan. Kemudian masing-masing pengulangan dihitung % *recovery*

dan rata-rata nilai *recovery* dibandingkan terhadap rentang yang diperbolehkan.

Konfirmasi Identitas

Konfirmasi identitas dilakukan dengan menguji nilai isyarat relatif detektor (NIRD) yaitu dengan menginjeksikan standar dan sampel ke dalam kromatografi gas menggunakan detektor yang sama tetapi kolom yang berbeda, lalu dihitung rasio perbandingan antara kolom yang satu dengan yang lainnya.

Estimasi Ketidakpastian Pengukuran

Estimasi ketidakpastian pengukuran dihitung dengan menggabungkan semua faktor yang dapat menyumbangkan sumber kesalahan terhadap pengukuran.

Preparasi Sampel Minyak Kayu Putih

Sampel minyak kayu putih diencerkan sebanyak 250.000 kali dengan pelarut etanol sampai sinyalnya berada dalam rentang konsentrasi kurva kalibrasi.

Uji Homogenitas untuk sampel studi kolaborasi antar laboratorium

Sebelum dibagikan kepada peserta studi kolaborasi, sampel dikemas dalam ampul tertutup rapat kedap udara, lalu dilakukan uji homogenitas terlebih dahulu dengan mengambil 10 ampul secara random kemudian dianalisis secara simultan.

Uji homogenitas yang dilakukan berdasarkan ISO 13528:2008. Sampel yang digunakan untuk studi kolaborasi dimasukkan ke dalam ampul amber. Kemudian diambil 10 ampul secara random. Analisis dilakukan secara duplo. Data hasil analisis dihitung secara statistik sebagai berikut :

- 1) Dihitung rata-rata hasil uji siplo dan duplo (X_t) dengan rumus:

$$X_t = (X_{t,1} + X_{t,2})/2 \quad (1)$$
 dimana:
 $X_{t,1}$ = hasil uji ke-1
 $X_{t,2}$ = hasil uji ke-2
- 2) Dihitung selisih absolut (W_t) dari hasil dari hasil siplo dan duplo dengan rumus:

$$W_t = |X_{t,1} - X_{t,2}| \quad (2)$$
- 3) Dihitung rata-rata umum (*general average*) atau diberi kode X_r dengan rumus: $X_r = \sum X_i / g$, dimana g adalah jumlah subsampel yang digunakan.
- 4) Dihitung standar deviasi dari rata-rata subsampel (S_x) dengan rumus:

$$S_x = \sqrt{\sum (X_{t_i} - X_{r_i})^2 / (g - 1)} \quad (3)$$

Keterangan :

S_x = Standar deviasi rata-rata subsampel

X_t = Nilai rata-rata hasil uji simplo dan duplo

X_r = Nilai rata-rata umum

g = Jumlah subsampel

5) Dihitung standar deviasi *within samples* (S_w) dengan rumus:

$$S_w = \sqrt{\sum w_i^2 / (2g)} \quad (4)$$

Keterangan :

S_w = Standar deviasi *within samples*

W_t = Nilai selisih simplo dan duplo

g = Jumlah subsampel

6) Dihitung standar deviasi *between samples* (S_s) dengan rumus:

$$S_s = \sqrt{S_x^2 - (S_w^2 / 2)} \quad (5)$$

Keterangan :

S_s = Standar deviasi *between samples*

S_x = Standar deviasi rata-rata subsampel

S_w = Standar deviasi *within samples*

7) Sampel dinyatakan homogen, jika $S_s < 0,3 \sigma$, dimana :

σ = standar deviasi untuk asesmen profisiensi (SDPA), σ dapat ditetapkan melalui $CV_{Horwitz}$.

8) $CV_{Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log C)}$ (6)

Keterangan :

C = fraksi konsentrasi

Uji stabilitas untuk sampel studi kolaborasi laboratorium

Metode uji stabilitas dilakukan berdasarkan ISO 13528: 2008. Setelah penyimpanan selama waktu tertentu (1 minggu) dilakukan analisis kembali secara duplo sebagai berikut :

- 1) Uji stabilitas dilakukan di laboratorium yang sama dengan pelaksanaan uji homogenitas.
- 2) Metode uji stabilitas dilakukan dengan metode analisis yang sama dengan senyawa analit

yang sama sesuai dengan uji kadar analit pada uji homogenitas.

- 3) Dipilih sejumlah g kemasan subsample secara random, dimana $g \geq 3$
- 4) Dari g kemasan subsampel terpilih, setiap kemasan subsampel dibagi 2 untuk keperluan analisis duplo.
- 5) Setiap subsampel dianalisis dengan menggunakan GC-FID.
- 6) Dihitung rata-rata kadar 1,8-Sineol pengujian pertama ($Y_{r,1}$) dan pengujian kedua ($Y_{r,2}$) dari data uji stabilisasi.
- 7) Dihitung selisih rata-rata hasil pengujian yang diperoleh pada uji homogenitas (X_r) dengan rata-rata hasil yang diperoleh pada uji stabilitas (Y_r).
- 8) Sampel dikatakan stabil apabila $|X_r - Y_r| \leq 0,3 \sigma$.

Pengolahan data statistik studi kolaborasi antar laboratorium

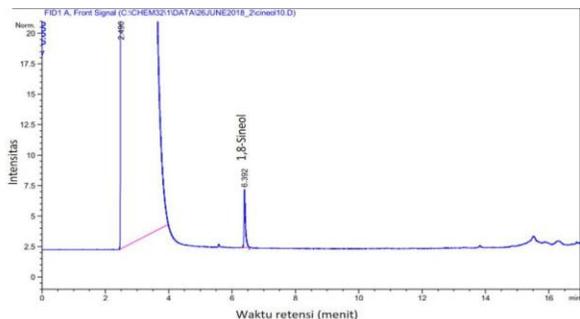
Pengolahan data statistik studi kolaborasi antar laboratorium bertujuan untuk menilai kinerja metode uji apabila diterapkan di beberapa laboratorium yang berbeda (personel, instrumen, dan kondisi lingkungan yang berbeda-beda). Kinerja dari metode uji dievaluasi melalui perhitungan nilai relatif standar deviasi (RSD) reproduibilitas dibandingkan dengan RSD Horwitz sebagai acuan pembandingan. Metode yang akan digunakan pada penelitian ini merupakan pengembangan dari metode SNI 06-3954-2006 yang mana dalam metode SNI tidak menjelaskan mengenai preparasi sampel secara detail, menggunakan kolom kapiler *carb Wax* 20 M, dan memerlukan waktuambat yang cukup lama yaitu 55 menit.

Dalam penelitian ini, diusulkan suatu proses preparasi sampel yang praktis, menggunakan kolom kapiler yang lain yaitu HP-5 sehingga memberikan alternatif jenis kolom kapiler yang dapat digunakan untuk pengujian senyawa 1,8-Sineol, dan diusulkan juga kondisi pengukuran dengan waktuambat yang cukup singkat yaitu 14 menit yang lebih cepat daripada metode SNI 06-3954-2006. Oleh karena itu, metode yang digunakan dalam penelitian ini perlu divalidasi karena mengalami beberapa perubahan parameter. Parameter uji validasi yang akan dilakukan diantaranya uji linieritas, uji presisi, uji perolehan kembali (*recovery*), uji akurasi, konfirmasi identitas, estimasi ketidakpastian pengukuran, serta validasi melalui studi kolaborasi antar laboratorium. Instrumentasi yang digunakan adalah kromatografi

gas dengan detektor ionisasi nyala (GC-FID) yang diaplikasikan untuk analisis kuantitatif 1,8-Sineol dalam minyak atsiri.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada metode SNI 06-3954-2006 tidak menjelaskan mengenai preparasi sampel secara detail, menggunakan kolom kapiler carbowax 20 M, dengan kondisi pengukuran sebagai berikut: suhu oven mulai dari 50 °C dipertahankan 5 menit, lalu dinaikan sampai 200 °C dengan kecepatan 3 °C per menit sehingga total waktu tambat cukup lama yaitu 55 menit. Dalam penelitian ini, diusulkan suatu proses preparasi sampel yang praktis, menggunakan kolom kapiler yang lain yaitu HP-5 sehingga memberikan alternatif jenis kolom kapiler yang dapat digunakan untuk pengujian senyawa 1,8-Sineol, dan diperoleh kondisi pengukuran yang terpilih sebagai berikut : suhu kolom mulai dari 80 °C dipertahankan 2 menit, lalu dinaikkan sampai 220 °C dengan kecepatan 10 °C per menit sehingga total waktu tambat lebih cepat daripada metode SNI 06-3954-2006 yaitu 16 menit.

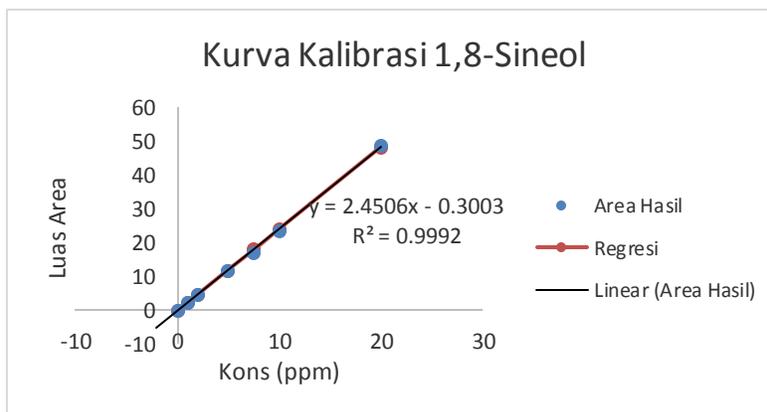


Gambar 2 Kromatogram standar 1,8-Sineol 10 µg/mL.

Untuk memastikan kinerja dari metode dalam penelitian ini maka dilakukan validasi metode yang meliputi uji linieritas, uji presisi, uji perolehan kembali (*recovery*), uji akurasi, konfirmasi identitas, estimasi ketidakpastian pengukuran, serta validasi melalui studi kolaborasi antar laboratorium. Instrumentasi yang digunakan adalah kromatografi gas dengan detektor ionisasi nyala (GC-FID) yang diaplikasikan untuk analisis kuantitatif 1,8-Sineol dalam minyak atsiri.

Kromatogram senyawa 1,8-Sineol dapat dilihat pada Gambar 2, terdeteksi pada waktu retensi 6,392 menit dan menunjukkan puncak dengan selektivitas yang cukup tinggi. Etanol sebagai pelarut terdeteksi pada waktu retensi 2,49 menit. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa 1,8-Sineol dapat dianalisis dengan baik dengan GC-FID menggunakan kolom HP-5.

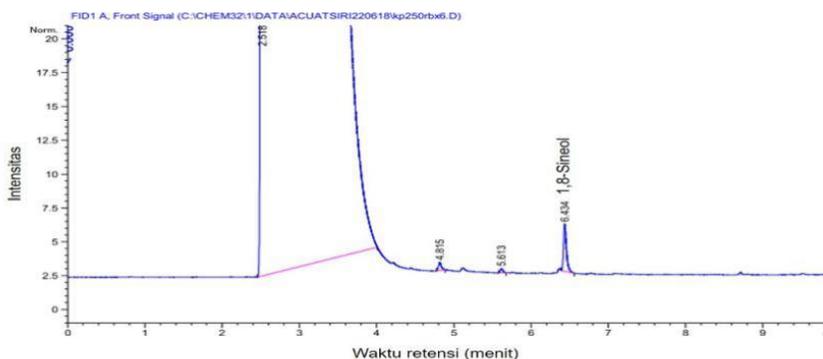
Beberapa tingkat larutan standar (dari 1 hingga 20 µg/mL) dalam etanol dianalisis secara langsung dengan menggunakan GC-FID. Kurva kalibrasi dan koefisien korelasi untuk 1,8-Sineol dalam minyak kayu putih diperoleh dengan pengukuran hasil analitik GC-FID dengan hasil yang linier dalam rentang konsentrasi 1 sampai 20 µg/mL. Rentang konsentrasi yang diperlukan dirasa cukup karena konsentrasi 1,8-Sineol dalam sampel minyak kayu putih berada dalam level konsentrasi yang cukup tinggi sehingga tidak memerlukan konsentrasi yang lebih rendah dari 1 µg/mL pada kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi untuk kuantifikasi 1,8-Sineol adalah: $y = 2,4506x - 0,3003$ dengan koefisien korelasi 0,9992 ($Y =$ area puncak 1,8-Sineol; $X =$ konsentrasi 1,8-Sineol, µg/mL). Dari Gambar 3 dapat dilihat bahwa metode ini memberikan linieritas yang sangat baik dilihat dari nilai R^2 lebih dari 0,999 dan slope menunjukkan respon yang proporsional antara input dan output.



Gambar 3 Kurva kalibrasi senyawa 1,8-Sineol.

Dari Gambar 3 dapat dilihat bahwa senyawa 1,8-Sineol dalam sampel minyak kayu putih dapat terpisah juga memberikan selektivitas dan resolusi yang baik. Presisi metode dinyatakan oleh nilai RSD dari 7 kali pengulangan pengujian sampel minyak kayu putih. Nilai RSD yang diperoleh untuk senyawa 1,8-Sineol adalah 1,81%. Nilai presisi ini bila dibandingkan dengan CV Horwitz (2,11%) menunjukkan nilai RSD yang lebih kecil daripada CV Horwitz. Hal ini menunjukkan bahwa metode memiliki presisi sangat baik.

Uji perolehan kembali (*recovery*) diperoleh dengan menambahkan standar 1,8-Sineol yang telah diketahui konsentrasinya dengan pasti ke dalam sampel minyak kayu putih (*spike*) dengan 2 µg/mL, selanjutnya dianalisis secara kuantitatif dan dihitung konsentrasi sebagai nilai hasil analisis yang ditemukan. Dari hasil analisis, *recovery* metode yang diperoleh sebesar 98,81% (Tabel 2) dan hasil ini masih berada dalam rentang yang diperbolehkan menurut AOAC (2016).



Gambar 4 Kromatogram sampel minyak kayu putih.

Pada validasi metode ini, parameter limit deteksi dan limit kuantifikasi pengujian dapat diabaikan karena kandungan senyawa 1,8-Sineol dalam sampel minyak kayu putih sangat tinggi sehingga sampel harus diencerkan 250.000 kali. Kandungan senyawa 1,8-Sineol dalam minyak kayu putih diperoleh sebesar 70,69%.

Konfirmasi identitas dilakukan untuk meyakinkan bahwa signal atau isyarat yang dihasilkan pada proses pengukuran hanya berasal dari analit, bukan berasal dari senyawa lain atau campuran analit dan senyawa lain yang memiliki

sifat fisika dan kimia yang sama dengan analit yang akan dianalisis. Konfirmasi identitas yang dilakukan pada penelitian ini adalah Nilai Isyarat Relatif Detektor (NIRD) dengan menguji standar dan sampel ada detektor yang sama GC-FID tetapi menggunakan kolom yang berbeda. Hasil yang diperoleh dari NIRD standar adalah $1,25 \pm 0,06$; sedangkan NIRD sampel sebesar $1,19 \pm 0,07$; sehingga dapat dipastikan bahwa signal atau isyarat yang dihasilkan pada proses pengukuran adalah benar-benar berasal dari analit yang dianalisis.

Tabel 2 Presisi dan nilai perolehan kembali (*recovery*).

Target Analit	R ²	Presisi* (%)	Nilai Recovery* (%)
1,8-Sineol	0,9992	1,81	98,81

*Dilakukan tujuh kali pengulangan.

Perhitungan estimasi ketidakpastian pengujian (*uncertainty*) dilakukan dengan menggunakan pendekatan *bottom-up* untuk menghitung satu per satu semua aspek yang dapat memberikan sumbangan kesalahan pada saat pengukuran atau pengujian dilakukan. Nilai estimasi ketidakpastian dapat digunakan untuk mengetahui rentang konsentrasi yang dapat diterima. Adapun besarnya nilai ketidakpastian

metoda pengujian yang diperoleh dalam penelitian ini adalah sekitar $\pm 8-9\%$ untuk senyawa target yang dianalisis yaitu 1,8-Sineol. Uji ketangguhan metode (*robustness*) dilakukan melalui studi kolaborasi antar laboratorium yang diselenggarakan oleh Loka Penelitian Teknologi Bersih – LIPI Bandung dan diikuti oleh laboratorium pemerintah dan laboratorium perguruan tinggi. Sampel studi kolaborasi adalah sampel formulasi

yang telah diperkaya dengan analit pada tingkat konsentrasi tertentu. Pengolahan data hasil uji homogenitas dan stabilitas dilakukan dengan

mengacu pada pedoman ISO 13528. Hasil uji homogenitas dapat dilihat pada Tabel 3

Tabel 3 Hasil uji homogenitas.

No	Data-1 (mg/L)	Data-2 (mg/L)	Xt,,	Xt,, - Xr,,,	(Xt,, - Xr,,,) ²	w _t	w _t ²
MA-09	23,41	25,37	24,39	-0,60	0,36	1,96	3,85
MA-16	23,64	22,92	23,28	-1,71	2,93	0,72	0,51
MA-17	25,28	23,76	24,52	-0,47	0,22	1,53	2,34
MA-15	25,21	26,61	25,91	0,92	0,85	1,40	1,95
MA-06	28,23	25,51	26,87	1,88	3,54	2,72	7,38
MA-11	26,32	23,85	25,08	0,09	0,01	2,47	6,09
MA-19	23,62	23,31	23,47	-1,52	2,32	0,31	0,10
MA-03	25,26	24,59	24,92	-0,07	0,00	0,67	0,45
MA-22	24,93	25,58	25,25	0,27	0,07	0,64	0,41
MA-07	25,05	27,33	26,19	1,20	1,44	2,28	5,19

Evaluasi data uji homogenasi kandungan 1,8-Sineol dalam sampel minyak kayu putih berdasarkan ISO 13528 (Tabel 3) bahwa sampel dinyatakan homogen apabila nilai $S_s \leq 0,3 \sigma$. Nilai σ (SDPA) untuk pengujian 1,8-Sineol sama dengan nilai $S_{horwitz}$ yang diperoleh melalui $CV_{Horwitz}$. $CV_{Horwitz}$ dihitung dengan rumus $CV_{Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log C)}$. Cadalah konsentrasi 1,8-Sineol yang diukur yaitu 24,99 $\mu\text{g/mL}$ sehingga diperoleh nilai $CV_{Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log (24,99 * 10^{-6}))} = 9,86\%$. $S_{horwitz}$ diperoleh dengan mengalikan $CV_{Horwitz}$ dan nilai konsentrasi rata-rata 1,8-Sineol yaitu sebesar 2,4631. Nilai $0,3 \sigma = 0,3 \times 2,4631 = 0,7389$.

Pada Tabel 3 hasil evaluasi data uji homogenitas kandungan 1,8-Sineol diperoleh nilai S_s sebesar 0,7736, sampel dinyatakan tidak homogen karena $S_s > 0,3 \sigma$ yaitu $0,7736 > 0,7389$. Dalam ISO 13528, jika sampel tidak homogen, maka faktor heterogenitas antar sampel harus dimasukkan ke dalam standar deviasi target sehingga formula σ (SDPA) heterogenitas menjadi $\sigma' = \sqrt{\sigma^2 + S_s^2}$. Dengan demikian σ' menjadi 2,5818. Hal ini akan menjamin bahwa pengaruh inhomogenitas sampel uji tidak berpengaruh pada hasil studi kolaborasi.

Uji stabilitas dilakukan dalam selang waktu satu minggu dari uji homogenitas. Pada uji stabilitas diambil 3 ampul sampel secara random, lalu dianalisis secara simultan. Evaluasi data uji

stabilitas kandungan 1,8-Sineol dalam minyak kayu putih berdasarkan ISO 13528 dapat dilihat pada Tabel 4. Seperti disebutkan di atas bahwa sampel dinyatakan stabil apabila nilai $[X_r - Y_r] < 0,3 \sigma'$, dimana X_r merupakan grand mean dari nilai uji homogenitas dan Y_r merupakan grand mean dari nilai uji stabilitas. SDPA (σ') yang digunakan adalah σ' yang sudah memasukkan nilai heterogenitas sampel. Nilai $[X_r - Y_r]$ bersifat absolut dan diperoleh hasil sebesar 0,6730. Nilai $0,3 \sigma'$ diperoleh 0,7389, sehingga dapat dinyatakan sampel stabil karena $[X_r - Y_r] < 0,3 \sigma'$.

Tabel 4 Hasil uji stabilitas.

No	Data-1 (mg/L)	Data-2 (mg/L)	Y _t
1	25,70	26,40	26,05
2	25,71	25,68	25,69
3	25,11	25,37	25,24
		Y _r	25,662

Kinerja dari metode uji dievaluasi dengan membandingkan RSD reproduibilitas yang diperoleh dari 3 laboratorium yang berbeda dengan RSD Horwitz. Hasil studi kolaborasi menunjukkan RSD reproduibilitas sebesar 0,69 % yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan RSD Horwitz (9,81 %). Hal ini menunjukkan bahwa metode yang diusulkan memiliki ketangguhan (*robustness*) yang baik.

Tabel 5 Hasil studi kolaborasi antar laboratorium.

No	Nama Lab	Nilai
1	Lab-01	25,70
2	Lab-02	25,68
3	Lab-03	26,00

5. KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil memperjelas beberapa aspek yang berbeda atau tidak dijelaskan pada metode SNI 06-3954-2006 diantaranya tidak menjelaskan proses preparasi sampel secara detail, penggunaan kolom kapiler yang berbeda sehingga memberikan alternatif jenis kolom kapiler yang dapat digunakan untuk menguji kandungan senyawa 1,8-Sineol, dan kondisi pengukuran yang berbeda menggunakan instrumen GC-FID. Metode hasil pengembangan telah divalidasi dengan hasil sebagai berikut : proses preparasi sampel yang praktis, menggunakan kolom kapiler yang lain yaitu HP-5 sehingga memberikan alternatif jenis kolom kapiler yang dapat digunakan untuk pengujian senyawa 1,8-Sineol, dan diperoleh kondisi pengukuran yang terpilih sebagai berikut : suhu kolom mulai dari 80 °C dipertahankan 2 menit, lalu dinaikkan sampai 220 °C dengan kecepatan 10 °C per menit sehingga total waktu tambat lebih cepat daripada metode SNI 06-3954-2006 yaitu 16 menit. Uji ketangguhan metode (*robustness*) yang dilakukan melalui studi kolaborasi telah menunjukkan bahwa metode ini cukup tangguh untuk diterapkan di laboratorium yang berbeda – beda.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Loka Penelitian Teknologi Bersih, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia yang telah memberikan dukungan dana penelitian dan sarana prasarana agar penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

Aboul-Enein, Y., Eldeen, E., & Etman, M. (2012). Validation of Rapid Gas Chromatographic Method for Determination of Seven Volatile Compounds in a Urinary Tract Antiseptic Soft Gelatin Capsules. *Gazi University Journal of Science*, 25(3), 623-629.

Apel, M. A., Rodrigues, R. A., Soares, L. A. L., & Henriques, A. T. (2017). Quantification of the components in commercial essential oil of

Eucalyptus Globulus Labil by gas chromatography-GC-FID and GC-MS. *Drug Analytical Research*, 1(2), 9-14.

AOAC Official Methods of aAnalysis. (2016). *Guidelines for standard method performance requirements appendix F*, p. 9.

Arbain, D. (1999). Hutan tropis indonesia, dari sumber daya alam tradisional ke sumber daya ilmu pengetahuan, teknologi, dan ekonomi : studi kasus hutan sumatra. *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, Jurusan Kimia FMIPA –ITS, Surabaya.

Alfian, Z., Taufik, M., Marpaung, H., Sibarani, I.J. (2018). Analysis of Composition and Sineol Determination of Eucalyptus Oil (*Eucalyptus Robusta*) from PT. Toba Pulp Lestari Used Gc- Ms Method. *International Journal of Applied Chemistry*, 14(3).

Blumenthal, E., & Complete German Commission. (1998). Monographs: therapeutic guide to herbal medicines. *Austin: The American Botanical Council*.

Cahyono, R. (2017). *Simplisia Apa yang Mengandung Minyak Atsiri*
Retrieved from <https://www.dictio.id/t/simplisia-apa-yang-mengandung-minyak-atsiri/13045/2> (di akses 8 April).

Compton, S.V., and Stout, P. (1991). *Application of headspace GC/FT-IR: analysis of flavor oils*. Application note F T S 7, Bio-Rad, Cambridge, M. A.

Geremia, B. (1955). *Rassengna internazionale di clinica e therapie*. Urban and Fisher Co., Verlag, Germany. 35, 577-592.

Gordon, B.M.M., Uhrig, S., Borgerding, M.F., Chung, H.L., Coleman, W.M.III., ... and White, E.L. (1988). *Analysis of flue-cured tobacco essential oil by hyphenated analytical techniques*. *J. Chromatogr. Sci.* 26:174-80.

Helfiansah, R., & Sastrohamidjojo, H. (2012). Isolasi, identifikasi dan pemurnian senyawa 1, 8 sineol minyak kayu putih (*Malaleuca leucadendron*). *ASEAN Journal of Systems Engineering*, 1(1).

Irvan, P.B.M., & Sasmitra, J. (2015). Ekstraksi 1,8-cineole dari minyak daun eucalyptus urophylla dengan metode soxhletasi. *Jurnal Teknik Kimia Usu*. 4(3), 53-57.

Jantan, I., Ahmad, F., & Ahmad, A.S. (2004). Constituents of the rhizome and seed oils of greater galangal *alpinia galangan* (L) willd. From Malaysia. *Journal of Essential Oil Research*, 16(3): 174-176.

- Ketaren, Ir. S. (1985). *Pengantar teknologi minyak atsiri*. Jakarta. PN Balai Pustaka.
- Kirana, G. (2016). *Bioaktivitas senyawa 1,8-sineol pada minyak atsiri*. Surakarta. Seminar Nasional Pendidikan dan Saintek 2016 (ISSN: 2557-533X).
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., Satya, S. (2012). *Compositional analysis and insecticidal activity of Eucalyptus globulus (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (Musca domestica)*. Acta Trop. 122(2):212–218.
- Magnusson, B., and Örnemark, U (eds.) (2014). *Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods – laboratory guide to method validation and related topics*. (2nd ed.). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.
- Margret, W. (1999). *Die wichtigsten arzeneipflanzen von A-Z in phytotherapie*. Urban and Fisher Co., Germany.
- Munari, F.G., Dugo., and Cotroneo, A. (1990). *Automated on-line HPLC-HR GC with gradient elution and multiple GC transfer applied to the characterization of citrus essential oils*. HRC & CC, 13: 56-51.
- Muyassaroh, M. (2016). Distilasi daun kayu putih dengan variasi tekanan operasi dan kekeringan bahan untuk mengoptimalkan kadar sineol dalam minyak kayu putih. *Jurnal Teknik Kimia*, 10(2).
- Nazeh, M. Al-Abd., Zurainee, M.N., Marzida, M., Fadzly, A., Mohammed, S.H., dan Mustafa, K. (2015). Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of Melaluca cajuputi extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(385): 1-13.
- Sari, D.K., dan Edy, C. (2016). *Isolasi 1,8-sineol dari minyak kayu putih dan uji aktivitasnya sebagai Fumigan Sitophilus Oryzae*. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 5(1): 1-5.
- Sastrohamidjojo, H. (2004). *Kimia minyak atsiri*. Yogyakarta: Penerbit Gajah Mada University Press.
- ScienceLab, (2009). *Material safety data sheet – cineol MSDS*. Retrieved from www.cerkamed.pl/uk/download/eucalyptol_m_sds.pdf?. Diunduh tanggal 22 Januari 2014.
- Sihombing, D.Y.S. (2014). *Isolasi 1,8-sineol dari minyak kayu putih dan uji Aktivitasnya sebagai Bacillus subtilis*. Skripsi, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Semarang, Semarang.
- Silvestre, A. J., Cavaleiro, J. S., Delmond, B., Filliatre, C., & Bourgeois, G. (1997). Analysis of the variation of the essential oil composition of Eucalyptus globulus Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. *Industrial Crops and Products*, 6(1), 27-33.
- Standar Nasional Indonesia (SNI ISO/IEC 17025:2017). (2017). *Persyaratan umum kompetensi laboratorium pengujian dan laboratorium kalibrasi*. Jakarta : Badan Standardisasi Nasional.
- Standar Nasional Indonesia (SNI) 06-3954-2006. (2006). *Minyak kayu putih*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Thomas, A.N.S. (2000). *Tanaman obat tradisional I*. Edisi ke—13. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Zhao, X., & Harrington, P. D. B. (2017). Determination of 1,8 Cineole in Fresh Rosemary and Sage Leaves by Solid-phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Research Analytica*, 3(3).