

Review Article

REVIEW ARTIKEL: PERAN DAN FLEKSIBILITAS KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI DALAM ANALISIS SENYAWA METABOLIT SEKUNDER PADA BERAGAM SAMPEL

ARTICLE REVIEW: THE ROLE AND FLEXIBILITY OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) IN ANALYZING SECONDARY METABOLITES FROM VARIOUS SAMPLES

Tesalonica Maria Supit^{1}, Hamka George Marly Hairil Opur¹, Muhamad Farrel Julianto¹, Azkia Nurul Fajriah¹, Steanly Molano¹, Intan Rahmadani Saputri¹, Ariyanto¹*

¹Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, Jakarta Utara, Indonesia, 14350

**E-mail: tesalonica.ms@gmail.com*

Abstrak

Metabolit sekunder adalah senyawa bioaktif krusial dalam berbagai industri yang memerlukan analisis mutu terstandar. Kompleksitas struktural senyawa ini menjadikan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) sebagai metode standar emas untuk penetapan kualitatif dan kuantitatif. Namun hasil HPLC sangat bergantung pada optimasi kondisi instrumen dan matriks sampel. Tinjauan literatur ini bertujuan untuk membandingkan implementasi KCKT dalam analisis menyeluruh golongan metabolit sekunder. Kajian dilakukan secara sistematis terhadap jurnal ilmiah nasional dan internasional dalam 10 tahun terakhir (2015-2025). Hasil pengamatan menunjukkan KCKT terbukti efektif untuk menganalisis beragam senyawa metabolit sekunder pada matriks sampel yang luas, mulai dari ekstrak tumbuhan hingga produk komersial. Ditemukan variasi signifikan pada kondisi seperti pemilihan kolom C18, komposisi fase gerak, dan panjang detektor gelombang yang menegaskan perlunya optimasi metode yang spesifik untuk setiap analit. Tinjauan ini menyimpulkan bahwa KCKT adalah metode yang ampuh dan serbaguna, serta berfungsi sebagai panduan ilmiah bagi peneliti dalam menentukan kondisi analisis yang optimal.

Kata kunci: Metabolit Sekunder; HPLC; Metode Analisis

Abstract

Secondary metabolites are crucial bioactive compounds across various industries that require standardized quality analysis. The structural complexity of these compounds establishes High Performance Liquid Chromatography (HPLC) as the gold standard method for qualitative and quantitative determination. However, HPLC results are highly dependent on the optimization of instrument conditions and the sample matrix. This literature review aims to comparatively examine the implementation of HPLC in the comprehensive analysis of secondary metabolite groups. The study was conducted through a systematic review of national and international scientific journals published within the last 10 years (2015-2025). The review results show that HPLC is proven effective for analyzing diverse secondary metabolite compounds in a wide range of sample matrices, from plant extracts to commercial products. Significant variations were found in analytical conditions such as the selection of C18 columns, mobile phase composition, and detector wavelength ranges emphasizing the necessity for specific method optimization for each analyte. This review concludes that HPLC is a powerful and versatile method and serves as a scientific guide for researchers in determining optimal analytical conditions.

Keywords: Secondary Metabolites; HPLC; Analysis Method

PENDAHULUAN

Alkaloid, fenolik, saponin dan triterpenoid merupakan senyawa - senyawa dalam jumlah kecil yang merupakan hasil dari metabolit primer sehingga dinamakan metabolit sekunder. Metabolit sekunder dihasilkan dengan tujuan sebagai atraktan, agen penghasil bau, warna dan rasa, bahkan sebagai perlindungan diri bagi tanaman [1]. Khasiat dari senyawa-senyawa tersebut beragam sehingga penggunaan senyawa ini sering dijadikan pilihan sebagai bahan baku pangan, kosmetik, bahkan obat-obatan. Hal ini menjadikan analisis senyawa-senyawa tersebut merupakan suatu hal yang sangat penting untuk memahami mutu bahan baku, standarisasi ataupun aktivitas farmakologi dari senyawa-senyawa tersebut.

Kandungan senyawa-senyawa metabolit sekunder bisa dianalisis dengan berbagai macam metode. Salah satu metode yang sering digunakan adalah *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) yang dapat menghasilkan data baik kualitatif maupun kuantitatif. Prinsip kerja alat ini adalah melakukan pemisahan dengan teknik pemisahan kromatografi dimana analit akan bergerak melewati kolom lalu terjadi interaksi antar sampel dengan kolom mengakibatkan terjadinya pemisahan berdasarkan tingkat polaritasnya [2]. Selain karena kemampuannya untuk memisahkan sampel, HPLC dinilai memiliki keunggulan lain seperti waktu analisis yang lebih singkat, penggunaan sampel yang lebih minim, serta kolom yang bersifat *reusable* [3]. Sehingga penggunaan alat ini merupakan pilihan yang sering kali

Penggunaan metode HPLC dalam berbagai penelitian seringkali menunjukkan hasil yang bervariasi karena dipengaruhi oleh jenis senyawa yang dianalisis, karakteristik sampel, serta kondisi instrumen seperti fase gerak, waktu analisis, jenis kolom, dan detektor. Variasi tersebut dapat mempengaruhi kualitas pemisahan, akurasi, serta konsistensi hasil analisis. Oleh karena itu, kajian komparatif mengenai penggunaan metode HPLC untuk menganalisis golongan senyawa metabolit sekunder diperlukan untuk memberikan gambaran kondisi dan alat dalam melakukan suatu analisis.

Peninjauan artikel ini bertujuan melakukan analisis komparatif terhadap penggunaan HPLC dalam analisis senyawa metabolit sekunder. Fokus pembahasan mencakup perbandingan sampel, kondisi analisis, hasil analisis, serta keunggulan dan kelemahan masing-masing metode. Tinjauan ini diharapkan memberikan gambaran dan referensi ilmiah untuk memilih metode analisis yang tepat guna pengembangan senyawa metabolit sekunder sebagai bahan baku pangan, kosmetik, atau obat-obatan.

METODE

Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan berupa jurnal penelitian berskala nasional dan internasional. Jurnal didapatkan dari basis data elektronik seperti *Google Scholar*, *Pubmed*, *ScienceDirect* dengan menggunakan kata kunci seperti: analisis metabolit sekunder, analisis flavonoid, analisis triterpenoid, analisis alkaloid, HPLC, dan KCKT. Jurnal yang digunakan dibatasi pada publikasi selama 10 tahun terakhir (2015-2025), berbahasa Indonesia atau Inggris. Kriteria inklusi yang digunakan mencakup artikel yang menyajikan data hasil analisis kualitatif dan kuantitatif

menggunakan KCKT serta kriteria eksklusi berupa jurnal yang tidak relevan dengan judul dan waktu publikasi lebih dari 10 tahun terakhir.

Prosedur Kerja

Pemilihan literatur dilakukan dengan menelusuri basis data yang telah ditentukan menggunakan keyword. Hasil pencarian dari basis data akan dikumpulkan untuk dilakukan seleksi berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditentukan. Artikel yang sesuai dengan kriteria kemudian ditinjau untuk dibahas dan dianalisis dalam pembahasan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan seleksi artikel dari berbagai basis data elektronik dengan menggunakan kriteria inklusi dan eksklusi, sejumlah penelitian yang sesuai berhasil diperoleh. Setiap artikel tersebut memuat informasi mengenai analisis senyawa metabolit sekunder menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Informasi tersebut kemudian dirangkum dan disajikan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil *review* artikel

No	Nama Peneliti, Tahun, Judul Penelitian	Sampel	Golongan Metabolit	Kondisi HPLC	Hasil Penelitian
1	[4]	Ekstrak Kulit Buah Delima Putih	Tanin	Kolom C-18 (250 x 4,6 mm), fase gerak asam fosfat 0,55% (v/v), kecepatan alir 1,5 mL/menit, volume injeksi 20 µL, elusi isokratik.	Analisis senyawa tanin diperoleh dengan waktu retensi 16,518 menit yang identik dengan standar tanin. Linearitas menghasilkan persamaan garis $y = 645,6x$ dan koefisien korelasi (r) 0,999 dan nilai linier yang tinggi. Kadar tanin yang diperoleh dari ekstrak etanol kulit delima putih adalah 2,01%; simpangan baku (SD) 0,001; koefisien variasi (CV) 3,53%.
2	[5]	Ekstrak Etanol Herba Binara	Flavonoid	Kolom C-18 75 x 4,6 mm, fase gerak 25% asetonitril dalam buffer KH_2PO_4 0,025 M, laju alir 0,9 mL/min, panjang gelombang 360 nm	Fraksi etil asetat ekstrak etanol herba binara menghasilkan 5 puncak sedangkan fraksi butanol herba binara menghasilkan 7 puncak. Hasil perbandingan dengan waktu retensi dari senyawa pembanding memperlihatkan bahwa beberapa puncak yang dihasilkan ekstrak binara mendekati waktu retensi untuk senyawa rutin, isokuersetin dan kuersetin.
3.	[6]	Ekstrak Etanol Andaliman	Flavonoid	Fase gerak air: asetonitril (60:40), panjang	Analisis HPLC menunjukkan bahwa ekstrak etanol andaliman mengandung flavonoid kuersetin

		(<i>Zanthoxylum Acanthopodium</i> Dc.)		gelombang 370 nm, volume injeksi 10 µl, laju alir 0,5 ml/min dan suhu 30°C	dengan kadar tertinggi 1134,10 µg/mL.
4.	[7]	Ekstrak alga <i>Amphiroa anceps</i>	Fenolik dan Flavonoid	Kolom C-18 100mm x 4,6 mm, suhu 30°C, volume injeksi 20 µL, panjang gelombang 284 nm dan 273 nm, laju alir 0,7 ml/min, fase gerak gradien dari campuran air dan H ₃ PO ₄ 0,2 %, metanol dan asetoniitril (fenolik) dan fase gerak metanol: air dengan H ₃ PO ₄ 0,5% (50:50).	Hasil menunjukkan ekstrak alga <i>Amphiroa anceps</i> menghasilkan 8 senyawa golongan fenolik dengan konsentrasi tertinggi 19,05 µg/mL yaitu asam ellagic sedangkan senyawa flavonoid yang didapatkan berjumlah 5 senyawa dengan konsentrasi tertinggi 11,0 µg/mL yaitu katekin.
5.	[8]	8 Varietas Sorgum (<i>Arrabesk, Armorik, Arsky, Ggolden, Huggo, Icebergg, Kalatur, dan PR88Y92</i>)	Asam Fenolik dan Flavonoid	Kolom C18 100mm x 3 mm, suhu 50°C, laju alir 0,7 ml/ min, waktu analisis 35 menit (asam fenolik) dan 45 menit (flavonoid), panjang gelombang 280; 340; 480 nm, fase gerak gradien 0,025% asam trifluoroasetat (TFA): 0,025% TFA yang diatur secara spesifik.	Hasil menyatakan bahwa varietas <i>Huggo, Armorik dan Arsky</i> punya luteolinidin tertinggi dengan nilai berkisar antara 18,69 - 32,69 µg/g. Variasi kandungan fenolik dan flavonoid antar varietas cukup signifikan dengan jumlah total fenolik berkisar 1,10 mg FA/g - 2,24 mg FA/g. Hasil identifikasi yaitu sebanyak 4 puncak utama dan terdapat banyak puncak lain yang belum diidentifikasi secara pasti.
6.	[9]	Ekstrak kulit apel (<i>Malus domestica</i>) dari	Asam Triterpenoid	Kolom C18 4,6 x 150 mm, volume injeksi 20µL, laju alir 0,5 mL/min, suhu 30°C, panjang	Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga asam triterpenoid terdeteksi di semua sampel yang dianalisis dengan total kandungan berkisar dari 2,01 - 36,27 mg/g berat kering dengan konsentrasi

		berbagai varietas		gelombang 207 nm, fase gerak 85% metanol; 15% air; 0,1 % asam asetat	tertinggi yang dimiliki varietas <i>Virginia Gold</i>
7.	[10]	Kulit batang <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	Senyawa fenolik dan flavonoid (<i>Gallic acid</i> , <i>Catechin</i> , <i>Caffeic acid</i> , <i>Rutin</i> , <i>Ellagic acid</i> , <i>Quercetin</i> , <i>Kaempferol</i>)	Kolom: C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm), fase gerak: metanol: air (0,1% asam format) dengan sistem gradien, laju alir: 1,0 mL/menit, panjang gelombang deteksi: 280 nm, volume injeksi: 20 µL, suhu kolom: 30°C.	Ekstrak etanol kulit batang <i>Syzygium cumini</i> mengandung tujuh senyawa bioaktif utama, dengan <i>ellagic acid</i> (5,12 mg/g), <i>quercetine</i> (4,63 mg/g), dan <i>gallic acid</i> (3,85 mg/g) sebagai komponen dominan.
8.	[11]	Kopi Bubuk	Alkaloid	Kolom C-18 250 x 4,6 mm, panjang gelombang 278 nm, laju alir 1 ml/min, suhu ruang, volume sampel 20 µL, fase gerak metanol: air suling ganda (95:5)	Hasil analisis menunjukkan kadar kafein pada sampel berkisar antara 35,6027–58,0218 mg/L, dengan konsentrasi tertinggi pada sampel 4.
9.	[12]	Ekstrak dari 3 varian daun kratom (<i>Mitragyna speciosa</i> Korth)	<i>Mitragynine</i>	Fase gerak metanol: asam format pH 8 (60:40), laju alir 1mL/min, kolom C8 4,6 x 150 mm, panjang gelombang 266 nm, volume injeksi 20 µl	Hasil analisis rata-rata kadar pada daun kratom varian hijau dengan metode sonikasi, refluks, dan sokletasi adalah 22,21 ± 0,57; 15,40 ± 1,23; 19,63 ± 0,62 mg/g. Pada varian merah dengan metode sonikasi, refluks, sokletasi yaitu 26, 29 ± 1,68; 29,15 ± 0,77; 18,76 ± 1,73 sedangkan pada varian putih dengan metode sonikasi, refluks dan sokletasi adalah 18,07 ± 0,87; 19,33 ± 1,08 ; 24, 62 ± 0, 61.
10	[13]	Ekstrak Alga <i>Sargassum polycystum</i>	Fenolik	Kolom ODS-3, fase gerak air: metanol: asam asetat (69:28:3), laju alir 1 mL/min,	Analisis dengan metode <i>spiking</i> menyatakan bahwa sampel tidak mengandung floroglusinol dibuktikan dengan kromatogram yang dihasilkan menunjukkan

				panjang gelombang 290 nm	penurunan luas area dan pembentukan puncak baru pada saat ditambahkan standar. Sampel dinyatakan mengandung fenol dan asam galat berdasarkan kromatogram yang dihasilkan memiliki waktu retensi dan puncak yang serupa dengan standar yang dianalisis.
11	[14]	Ekstrak Daun Teh Hijau dan Teh Putih dari tumbuhan <i>Camellia sinensis</i> (L.)	Alkaloid	Fase diam yang digunakan berupa silika oktadesi C18, sedangkan fase gerak terdiri dari metanol: aquadest (50:50); laju alir 1 mL/menit; detektor UV dengan panjang gelombang 272 nm	Hasil analisis HPLC menunjukkan waktu retensi kafein pada teh hijau dan teh putih sebesar 3,4 menit dengan persamaan linearitas $y = 49,668x - 16,536$ ($r = 0,9968$). Kadar kafein yang diperoleh yaitu 98,43 mg/g pada teh hijau dan 136,13 mg/g pada teh putih.
12	[15]	Enam produk komersial daun loquat (<i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.) terdiri dari empat jenis teh, satu granul, dan satu sirup.	Triterpenoid, seskuiterpen glikosida, dan senyawa fenolik total	HPLC–UV, kolom <i>Sphere Clone</i> ODS (2) ukuran 4,6 × 250 mm, ukuran partikel 5 µm pada suhu 35 °C, fase gerak air yang mengandung 0,1% asam fosfat dan asetonitril, gradien elusi dari 5% hingga 95% fase B selama 70 menit, detektor 210 nm, dengan laju alir 0,75 mL/menit dan volume injeksi 25 µL	HPLC–UV berhasil mengidentifikasi dan mengkuantifikasi delapan senyawa terpenoid. Kandungan totalnya bervariasi, dari yang terendah 0,8 µg/mL pada sirup hingga tertinggi 14,8 mg/g pada teh loquat murni (Tea B). <i>Ursolic acid</i> dan <i>oleanolic acid</i> merupakan senyawa dominan, sementara <i>sesquiterpene glycoside</i> A dan C lebih melimpah dalam produk teh dan granul. Variasi ini mengindikasikan bahwa jenis bahan baku dan proses manufaktur berpengaruh signifikan terhadap kadar senyawa terpenoid.
13	[16]	Ekstrak daun soursop (<i>Annona muricata</i> L.)	Alkaloid	Kolom <i>Poroshell</i> C-18, fase gerak optimal asetonitril: metanol: aqua bidestilata (80:5:15), laju alir	Analisis dilakukan dengan menggunakan metode yang telah divalidasi dengan parameter yang sesuai dengan kadar alkaloid total pada sampel adalah sekitar $0.0862 \pm 0.004\%$ (w/w)

				1,0 mL/min, panjang gelombang 272 nm	
14	[17]	Daun, batang, akar, dan bunga <i>Ocimum gratissimum</i> L.	Senyawa fenolik dan flavonoid	Kolom <i>Acclaim</i> C18 (5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm), metanol (A) dan 0.5% asam asetat dalam air (B), 10–70% A selama 105 menit, laju alir 1.0–0.3 mL/menit (bervariasi sesuai tahap elusi), 20 μ L, deteksi DAD pada 280 nm, suhu kolom: 25 °C	Akar memiliki kandungan fenolik tertinggi (323.93 $\pm$ 2.06 μ g/mg GAE) dan aktivitas reduksi tertinggi (150.57 $\pm$ 1.76 μ g/mg AAE), flavonoid tertinggi (72.09 $\pm$ 1.27 μ g/mg RE), antioksidan tertinggi (DPPH 68.12%, ABTS 93.01%), HPLC mengidentifikasi 21 senyawa fenolik dan flavonoid, antara lain asam galat, asam ferulat, asam p-kumarat, rutin, naringin, kuersetin, apigenin, dan kaempferol.
15	[18]	<i>Sonchus arvensis</i> dan <i>Oenanthe linearis</i>	Asam fenolat, flavonoid, serta asam askorbat	Kolom C18 (5 μ m, 250 $\times$ 4.6 mm), <i>Dionex Ultimate</i> 3000 dengan detektor <i>diode array</i> (DAD), asetonitril dan 1% asam asetat aquadest (gradien elusi), laju alir 0,7 mL/menit, suhu 28°C, volume 20 μ L, panjang gelombang 272, 280, dan 310 nm.	Hasil analisis menunjukkan kandungan tertinggi asam askorbat pada <i>S. arvensis</i> sebesar 12,11 mg/g dan pada <i>O. linearis</i> sebesar 15,39 mg/g, serta <i>gallic acid</i> masing-masing 0,281 mg/g dan 0,628 mg/g askorbat, asam fenolat, dan flavonoid, serta direkomendasikan untuk aplikasi farmasi dan nutraseutikal.
16	[19]	Lima jenis sampel produk <i>Areca catechu</i> .	Alkaloid	Kolom X <i>Bridge</i> C18 250 $\times$ 4,6 mm, fase gerak gradien, laju alir 0,4 mL/menit, suhu ruangan, volume injeksi 20 μ L, dan deteksi UV 215 nm.	Ketiga alkaloid berhasil dipisahkan dan terdeteksi dengan baik. Waktu retensi masing-masing: <i>guvacine</i> 7, 45 menit, <i>arecaidine</i> 12, 45 menit, dan <i>arecoline</i> 18,65 menit. Metode menunjukkan linearitas tinggi ($R^2 \geq 0,994$), LOD 0,03–0,11 μ g/mL, LOQ 0,01–0,37 μ g/mL, dan RSD <4%. Kadar alkaloid tertinggi terdapat pada buah areca hijau, diikuti kulit segar, sedangkan kadar

					terendah pada cairan herbal simotang.
17	[20]	Ekstrak Etanol Buah Leunca (<i>Solanum nigrum L.</i>)	Kuersetin	Fase gerak aquadest: metanol (41: 59 v/v) dan fase diam kolom C18 (LiChroCART) (125 x 4 mm), laju alir 1 mL/menit.	Ekstrak etanol buah leunca mengandung senyawa kuersetin dengan didapatkan hasil linearitas $Y = 56863,57x + 92231,67$ nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,99954; LOD dan LOQ masing-masing adalah 0,355 μg dan 1,185 μg ; persen recovery 100,102% hingga 100,150%; penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak etanol buah leunca 0,0086% dengan nilai SD 0,0005 dan RSD 0,698%
18	[21]	Daun <i>Chaenomeles speciosa</i>	Triterpenoid	Kolom C18, fase gerak gradien (asetonitril dan 0.1% asam format), SIM mode pada ion $[M-H]^-$ (m/z 455.4 dan 471.3), HPLC–QQQ–MS, mode negatif, linearitas: $R^2 > 0.99$, presisi (RSD < 5%)	Setelah dilakukan pengayaan dengan metode adsorptif, kandungan triterpenoid dalam ekstrak meningkat dari $18,46 \pm 0,78\%$ menjadi $73,27 \pm 0,84\%$, dengan jumlah total sebesar $36,77 \pm 0,40$ mg/g ekstrak.
19	[22]	Daun Miana (<i>Plectranthus scutellarioides</i> (L.) R.Br.)	Flavonoid (Kuersetin)	Kolom C18, fase gerak gradien (asetonitril dan 0.1% asam format), SIM mode pada ion $[M-H]^-$ (m/z 455.4 dan 471.3), instrumen HPLC–QQQ–MS, mode negatif, fase gerak metanol : akuabides (59:41), laju alir: 1 mL/menit, panjang gelombang deteksi: 369,11 nm, volume injeksi 60 μL , suhu ruang	Ekstrak etanol daun miana mengandung senyawa kuersetin dengan waktu retensi 4,563 menit (sama dengan standar kuersetin 4,183 menit). Kandungan rata-rata kuersetin dalam ekstrak etanol daun miana sebesar 3,122 mg/g atau 0,312%.

20	[23]	Serbuk kering <i>Ephedrae</i> Herba	Alkaloid	Sistem HPLC <i>Waters Alliance</i> 2695 kolom <i>perfluorooctyl</i> (FC8) (150 × 4.6 mm, 3.5 µm), fase gerak asetonitril dan 15 mM amonium trifluoroasetat (pH 5) (95:5), laju alir 1,0 mL/min, suhu kolom 30°C, volume injeksi 10 µL, dan deteksi PDA pada 210 nm.	Metode HPLC menggunakan kolom FC8 mampu memisahkan kelima alkaloid dengan waktu analisis cepat (<15 menit) dan puncak yang tajam tanpa <i>tailing</i> . Hasil kuantifikasi menunjukkan variasi kadar antar sampel dari tiga perusahaan, di mana <i>ephedrine</i> memiliki kadar tertinggi dan <i>norephedrine</i> paling rendah. Validasi menunjukkan linearitas $R^2 > 0,999$, LOD 5,35–5,76 µg/mL, LOQ 20 µg/mL, dan nilai pemulihan 93,87–110,99%
21	[24]	Tanaman kelor (<i>Moringa pterygosperma</i>), songga (<i>Strychnos ligustrina</i>), tawoa (<i>Curcuma heyneana</i> Val.) dan kayu sapa (<i>Cassia sappan</i>)	Alkaloid dan Steroid	Waktu analisis 15-45 menit	Hasil analisis jumlah senyawa yang dilihat berdasarkan jumlah peak adalah 11 senyawa untuk tanaman songga, 25 senyawa untuk tanaman tawoa, 48 senyawa pada tanaman kelor dan 13 senyawa pada tanaman kayu sapa. Kelimpahan senyawa kimia yang dilihat dari waktu retensi sampel menghasilkan 4 waktu retensi yang sama dengan persentase kelimpahan senyawa kimia yang bervariasi tergantung pada waktu retensinya.
22	[25]	Daun <i>Avicennia marina</i> , <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> , <i>Sonneratia alba</i>	Flavonoid, Terpenoid, Alkaloid	Kolom RP-C18, 250 × 4.6 mm, 5 µm. Fase gerak gradien metanol: air (10–90% MeOH dalam 30 menit), laju alir: 1.0 mL/min, detektor UV $\lambda = 280$ nm, suhu kolom: 30 °C, volume injeksi: 10 µL	Profil HPLC menunjukkan tiap spesies memiliki puncak berbeda <i>B. gymnorrhiza</i> menunjukkan intensitas puncak tertinggi dengan kandungan fenolik dan flavonoid dominan. Aktivitas antioksidan tertinggi (IC50 ≈ 35 µg/mL) ditemukan pada spesies ini. Hasil menunjukkan hubungan antara kadar fenolik-flavonoid dari aktivitas antioksidan.
23	[26]	Ekstrak tenggiang	Flavonoid	Fase gerak air: asetonitril (60:40),	Kromatogram menghasilkan waktu retensi ekstrak etanol 5, 332 menit

				panjang gelombang 370 nm, volume injeksi 10 µL, laju alir 0,5 mL/min, suhu 30°C	yang relatif sama dengan standar kuersetin yaitu 5, 405 menit. Kadar yang terkandung pada 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 µg/ml sebesar 178,5; 335,48; 594,25; 1213,66; dan 2521,54 µg/ml.
24	[27]	Ekstrak daun belimbing manis (<i>Averrhoa carambola</i> L.)	Flavonoid	Kolom Sun Fire C-18 4,6 x 150 mm, laju alir 1,0 mL/min, volume injeksi 20 µL, detektor PDA pada panjang gelombang 273 nm, fase gerak asetonitril: air: asam asetat (10:90:0,2 v/v) untuk kuersetin dan asetonitril: air (45:55 v/v) untuk apigenin	Kuersetin terdapat pada ekstrak etanol (0,83%) dan fraksi etil asetat (4,49%) dengan waktu retensi 6,116 menit, sedangkan apigenin terdapat pada fraksi air (0,02%), fraksi etil asetat (6,37%), dan ekstrak etanol (0,48%) dengan waktu retensi 4,055 menit.
25	[28]	Buah segar, jus buah, wine buah.	Flavonoid	Kolom <i>Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18</i> (250 × 4,6 mm, 5 µm), fase gerak air dengan 0,1% asam format dan asetonitril gradien 0–10 menit (20–40% B), 10–25 menit (40–70% B), 25–30 menit (70–80% B), laju alir 1,0 mL/min, suhu kolom 30°C, volume injeksi 10 µL, dan deteksi pada 280 nm	Keenam alkaloid berhasil terpisah dengan baik dalam waktu 30 menit. Kandungan alkaloid tertinggi adalah <i>protopine</i> dan <i>chelerythrine</i> . Validasi metode menunjukkan linearitas $R^2 > 0,999$, LOD 0,05–0,1 µg/mL, dan RSD <3%.
26	[29]	Fitofarmaka yang mengandung ekstrak buah Cabe Jawa	Alkaloid	Kolom <i>X-Bridge C18</i> 250 x 4,6 mm, detektor DAD, <i>autosampler system</i> , suhu 40°C, laju alir 1 mL/menit	Sistem analisis optimum dengan kondisi panjang gelombang 250 nm dan fase gerak asetonitril: asam asetat glasial (48: 52) dan laju alir 1 mL/min menghasilkan metode yang valid berdasarkan parameter

					spesifisitas, linearitas, presisi, LOD dan LOQ, akurasi dan <i>robustness</i> serta rerata kadar yang terkandung adalah 0,187 mg.
27	[30]	Sampel berupa ekstrak total flavonoid dari Herba <i>Desmodii Styracifolii</i> , disiapkan menggunakan resin adsorpsi makropori DMSO untuk pemurnian, kemudian dilarutkan dalam etanol 50% dan disaring sebelum dianalisis.	Flavonoid dan asam fenolat.	Analisis menggunakan HPLC-DAD dengan kolom <i>Poroshell</i> 120 SB-C18 (100 × 4,6 mm; 2,7 µm). Fase gerak: (A) air + 10% asam format (pH 1,3) dan (B) asetonitril, dengan gradien 0–10 menit (2–35% B), suhu kolom 25°C, laju alir 1,4 mL/menit, volume injeksi 10 µL, deteksi pada 520 nm.	Semua antosianin berhasil dipisahkan dalam waktu <10 menit dengan total durasi analisis 19 menit (termasuk pembersihan kolom). Metode menunjukkan linearitas tinggi ($r > 0,9999$), presisi <2%, dan akurasi 98,6–104,4%. Kandungan CY3 dan CY35 terdeteksi di hampir semua sampel, sementara pelargonidin bebas tidak terdeteksi. Metode ini dinilai cepat, stabil, dan cocok untuk analisis rutin antosianin pada berbagai produk buah.
28	[31]	Kayu <i>Rhus verniciflua</i> Stokes.	Flavonoid	Kolom C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), fase gerak metanol dan air yang mengandung 0,5% asam asetat (v/v) dengan program gradien, laju alir 0,5 mL/menit, suhu kolom 30°C, volume injeksi 20 µL, panjang gelombang 225–310 nm	Keenam flavonoid berhasil dipisahkan dengan baik dan menunjukkan linearitas tinggi ($R^2 > 0,999$). Nilai LOD berkisar 0,16–0,50 µg/mL dan LOQ 0,80–2,00 µg/mL. Metode MSPD-HPLC ini menghasilkan ekstraksi yang lebih efisien dibanding metode refluks dan ultrasonik, dengan konsumsi pelarut dan waktu analisis yang lebih sedikit. Kandungan sulfuretin tertinggi (22,83 mg/g) dan <i>quercetine</i> terendah (0,30 mg/g).
29	[32]	Kulit akar tanaman <i>Hippocratea excelsa</i>	Triterpen quinon-metida (Quinone-Methide)	Kolom Zorbax <i>Eclipse Plus</i> C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm), sistem gradien air	Hasil menunjukkan profil kromatogram antara akar liar dan komersial hampir identik ($p \geq 0,05$) dengan puncak utama untuk <i>tingenone</i> , <i>netzahualcoyene</i> , dan

		liar dan akar <i>Cancerina</i>	Triterpene s, QMTs), termasuk <i>tingenone</i> , <i>pristimerin</i> , dan <i>netzahualcoyene</i> .	(mengandung 1% H ₃ PO ₄): metanol, dan tetrahydrofuran (THF), laju alir 1,5 mL/menit, waktu analisis 40 menit, UV-DAD pada panjang gelombang 254 nm dan 420 nm, volume injeksi 20 µL	<i>pristimerin</i> . Variasi waktu retensi <3,5 %. Ekstraksi terbaik diperoleh menggunakan n-heksana. Metode ini cepat, presisi tinggi, dan cocok untuk kontrol kualitas herbal <i>Cancerina</i> yang digunakan dalam pengobatan tradisional Meksiko.
30	[33].	Krim Malam	Fenolik	Kolom ODS C-18, fase gerak metanol: air (55:45), panjang gelombang 294 nm, laju alir 1mL/min, volume injeksi µL	Hasil analisis terhadap kelima sampel krim diketahui mengandung hidrokuinon yang ditandai dengan puncak (<i>peak</i>) khas hidrokuinon dengan waktu retensi berkisar 1-2 menit. Hasil perhitungan menunjukkan kadar hidrokuinon pada sampel A, B, C, D, E secara berturut-turut adalah 5,073%; 3,776%; 1,735%; 12,896%; dan 3,684% yang didapatkan berdasarkan persamaan regresi yang dihasilkan.

Berdasarkan kajian komprehensif terhadap literatur yang digunakan, metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) terbukti memiliki peran yang sangat luas dan fleksibel dalam analisis senyawa metabolit sekunder, meliputi alkaloid, flavonoid, senyawa fenolik, triterpenoid, serta tanin. Metode ini diaplikasikan pada berbagai jenis sampel, mulai dari tanaman obat, buah, daun, alga, hingga produk pangan dan minuman. HPLC mampu menghasilkan data analisis yang akurat dan presisi tinggi, baik secara kualitatif maupun kuantitatif, ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi (R^2) di atas 0,99 [4, 14, 16, 19, 20, 23, 28, 30, 31] serta tingkat *recovery* antara 96 hingga 103% [20, 23], yang mengindikasikan keandalan metode dalam penentuan kadar senyawa aktif.

Keunggulan lain dari HPLC terletak pada fleksibilitas dalam penggunaan berbagai jenis detektor seperti UV-Vis [9, 14, 15, 19, 25, 33], DAD (*Diode Array Detector*) [17, 18, 29], QqQ-MS [21, 22], dan Q-TOF-MS [10], yang dapat disesuaikan dengan karakteristik senyawa yang dianalisis. Penelitian yang dilakukan Hou *et al.* (2024) menggunakan metode HPLC-QQQ-MS untuk identifikasi triterpenoid dengan presisi tinggi (RSD < 5%). Pada penelitian Sari *et al.* (2021), HPLC-UV diterapkan dalam analisis alkaloid dengan hasil linearitas yang tinggi ($r = 0,9994$).

Variasi dalam kondisi analisis seperti pemilihan kolom kromatografi, komposisi fase gerak, laju alir, serta suhu analisis memungkinkan penyesuaian metode dengan sifat kimia senyawa target. Kolom C18 merupakan pilihan yang paling umum karena kemampuannya dalam memisahkan senyawa dengan polaritas beragam secara efektif. Dengan akurasi yang tinggi, kecepatan analisis yang optimal, serta kemampuan pemisahan yang baik, HPLC menjadi instrumen utama dalam penelitian fitokimia, standarisasi bahan alam, serta pengembangan obat herbal dan produk pangan fungsional.

KESIMPULAN

Metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) terbukti sebagai teknik analisis yang banyak digunakan dalam identifikasi senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, senyawa fenolik, dan triterpenoid. HPLC menunjukkan fleksibilitas tinggi dengan variasi dalam pemilihan kolom, komposisi fase gerak, serta beragam detektor seperti UV, *Diode Array Detector* (DAD), dan detektor massa (MS) yang digunakan sesuai karakteristik sampel. Selain itu, HPLC mampu memberikan hasil analisis dengan tingkat akurasi, sensitivitas, dan presisi yang tinggi, sehingga menjadi metode utama dalam riset fitokimia, standarisasi bahan alam, serta pengembangan produk obat herbal dan pangan fungsional.

DAFTAR RUJUKAN

1. Ramadhani, J., Nurfitriyanti, Y., Salsabilla, M., Aryani, N., & Hajid, R. (2024). Analisis Metabolit Sekunder dalam Bahan Alam Menggunakan Spektrofotometri. *Ilmu Kesehatan*, 9(5), 25–31. <https://doi.org/10.5455/mnj.v1i2.644xa>
2. Abriyani, E., Zulfa, A. N., Nurjanah, A., Nurlelah, N., & Septanti, R. (2016). Tinjauan Aplikasi High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dalam Analis Farmasi. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 10(13), 185–197.
3. Rosydiati. (2019). Karakterisasi puncak kromatogram dalam High Performance Liquid Chromatography (HPLC) terhadap perbedaan fase gerak, laju alir, dan penambahan asam dalam analisis Indole Acetic Acid (IAA). *Kandaga*, 1(2), 65–73.
4. Wahid, R. A. H. (2020). Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Tanin Ekstrak Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*) Menggunakan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 3(2), 11–21.
5. Purba, N., Patar, J., Romauli, S., Teresia, A., Liquid, P., & Hplc, C. (2019). Uji Senyawa Flavonoid Total dari Ekstrak Etanol Herba Binara (*Artemisia Annua*) Menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Tahun 2019. *Jurnal Kebidanan Kestra*, 2(1).
6. Siska, F., Romauli Anna Teresia Marbun, & Anisa Maharani. (2023). Andaliman Quercetin (*Zanthoxylum Acanthopodium Dc.*) Using High Performance Liquid Chromatography (Hplc) Method and Its Antifungal Activity Against *Pityrosporum Ovale*. *Jurnal Farmasimed (Jfm)*, 6(1), 33–40. <https://doi.org/10.35451/jfm.v6i1.1857>

7. El-Bilawy, E. H., Al-Mansori, A. N. A., Soliman, S. A., Alotibi, F. O., Al-Askar, A. A., Arishi, A. A., Sabry, A. E. N., Elsharkawy, M. M., Heflish, A. A., Behiry, S. I., & Abdelkhalek, A. (2022). Antifungal, Antiviral, and HPLC Analysis of Phenolic and Flavonoid Compounds of *Amphiroa anceps* Extract. *Sustainability (Switzerland)*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/su141912253>
8. Speranza, S., Knechtel, R., Witlaczel, R., & Schönlechner, R. (2021). Reversed-Phase HPLC Characterization and Quantification and Antioxidant Capacity of the Phenolic Acids and Flavonoids Extracted From Eight Varieties of Sorghum Grown in Austria. *Frontiers in Plant Science*, 12(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.769151>
9. Root, M., Petroski, W., Bechtold, K., McCullen, L., Lambiase, S., Wilson, B., & Joyner, R. (2022). A simplified HPLC-UV method for the analysis of triterpenoid acids from heritage apples (*Malus domestica*) from western North Carolina, USA. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 5(4), 84–92. <https://doi.org/10.31989/bchd.v5i4.914>
10. Zhao, Y., Zhang, X., Lv, C., Yu, Y., Zhang, Y., & Lu, J. (2018). Quantitative and qualitative analyses of cytotoxic triterpenoids in the rhizomes of *Anemone raddeana* using HPLC and HPLC-ESI-Q/TOF-MS. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 1113–1121. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.011>
11. Nuryanti, S. D., Solikah, W. Y., Sari, F. D., & Listianto, A. P. (2025). Penentuan Kadar Kafein Dalam Kopi Bubuk Kemasan Sachet Berbagai Merek Menggunakan Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Jurnal Redoks : Jurnal Pendidikan Kimia Dan Ilmu Kimia*, 8(2), 71–79. <https://doi.org/10.33627/re.v8i2.3500>
12. Mutiara, S. N. I., Masriani, M., Muharini, R., Sapar, A., & Rasmawan, R. (2023). Comparison of Extraction Variations on Mitragynine Level of Three Variants of Kratom Leaves (*Mitragyna speciosa* Korth). *EduChemia (Jurnal Kimia Dan Pendidikan)*, 8(1), 113. <https://doi.org/10.30870/educhemia.v8i1.21184>
13. Lailatussifa, R., & Pereira, M. M. (2022). Analisis Kandungan Senyawa Fenolik Ekstrak Alga *Sargassum polycystum* Dari Pantai Selatan, Gunungkidul, Yogyakarta. *Chanos Chanos*, 20(1), 215. <https://doi.org/10.15578/chanos.v20i1.10532>
14. Selfia Lestari, Muhammad Amin Nasution, Ridwanto, Haris Munandar Nasution (2023). Penetapan Kadar Kafein Ekstrak Daun Teh Hijau Dan Putih *Camellia sinensis* (L.) Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 6(3), 1407-1415
15. Lü, H., Lee, R. P., Huang, J., Chen, J., Go, V. L. W., Li, Z., & Lu, Q. Y. (2020). A new HPLC–UV method for the quantification of terpenoids and antioxidant activity of commercial loquat leaf tea and preparation. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(2), 1085–1091. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00358-3>
16. Setyaningrum, L., Purwaningtyas, D., Puspaningtyas, A. R., Wigati, D., Usman, M. R., & Latifah, M. S. (2022). Development and Validation of RP-HPLC Analysis Method for Determination of Total Alkaloid Content of Soursop (*Annona muricata* L.) Leaf Extract. *Eksakta: Berkala Ilmiah Bidang MIPA*, 23(03), 175–187. <https://doi.org/10.24036/eksakta/vol23-iss03/325>
17. Ganguly, S., Kumar, J., & Seal, T. (2021). Characterization of secondary metabolites in different parts of *Ocimum gratissimum* L. by in vitro antioxidant activity and high-performance liquid chromatography–diode-array detector analysis. *Pharmacognosy Magazine*, 17(74), 209–215. https://doi.org/10.4103/pm.pm_550_20
18. Seal, T. (2016). Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis* of

- North-Eastern region in India. Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(02), 157–166.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60225>
19. Lu, Y., Yu, J., Liu, W., Jing, G., Li, W., & Liu, W. (2022). Quantitative determination of major alkaloids in areca nut products by high-performance liquid chromatography coupled with ion mobility spectrometry. *Journal of Separation Science*, 1(9), 1–9.
<https://doi.org/10.1002/jssc.202200361>
 20. Husnia, F., & Budiarti, A. (2021). Pengembangan Metode Analisis Kuersetin dalam Ekstrak Etanol Buah Leunca (*Solanum nigrum* L.) Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Media Farmasi*, 17(2), 108–115. <https://doi.org/10.32382/mf.v17i2.2209>
 21. Hou, M., Shi, J., Lin, C., Zhu, L., & Bian, Z. (2024). Ultrasound-assisted extraction of triterpenoids from *Chaenomeles speciosa* leaves: Process optimization, adsorptive enrichment, chemical profiling, and protection against ulcerative colitis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 111(October), 107136. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.107136>
 22. Sukmawati, S., Widiastuti, H., & Miftahuljanna, M. (2019). Analisis kadar kuersetin pada ekstrak etanol daun miana (*Plectranthus scutellarioides*) secara HPLC. *Jurnal Ilmiah As-Syifaa*, 11(1), 38–44.
 23. Song, C., Yu, D., Jin, G., Ding, J., Zhou, H., Guo, Z., & Liang, X. (2022). High-performance liquid chromatography quantitative analysis of ephedrine alkaloids in *Ephedrae Herba* on a perfluorooctyl stationary phase. *Journal of Separation Science*, 45(5), 1051–1058.
<https://doi.org/10.1002/jssc.202100645>
 24. Suhada, A. (2015). Profil Komponen Kimia Tanaman Obat Yang Berkhasiat Mengobati Penyakit Kuning. *Jurnal Penelitian Dan Kajian Ilmiah Kesehatan*, 1(2), 55–63. www.lppm-mfh.com
 25. Rozirwan, R., Hananda, H., Nugroho, R. Y., Apri, R., Khotimah, N. N., Fauziyah, F., Putri, W. A. E., & Aryawati, R. (2023). Antioxidant Activity, Total Phenolic, Phytochemical Content, and HPLC Profile of Selected Mangrove Species from Tanjung Api-Api Port Area, South Sumatra, Indonesia. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 7(7), 3482–3489.
<https://doi.org/10.26538/tjnpr/v7i7.29>
 26. Turnip, N. U. M. B., Ratih Anggraeni, Sihombing, Y. R., & Suci Wulandari. (2025). Test to Determine The Quercetin Content of Tenggiang (*Polystichum setiferum*) Using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method and Its Antifungal Activity Against *Pityrosporum ovale*. *Jurnal Farmasimed (Jfm)*, 7(2), 135–142.
<https://doi.org/10.35451/jfm.v7i2.2361>
 27. Yunarto, N., & Sulistyaningrum, N. (2017). Quantitative Analysis of Bioactive Compounds In Extract and Fraction of Star Fruit (*Averrhoa carambola* L.) Leaves Using High Performance Liquid Chromatography. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 7(1), 26–33.
<https://doi.org/10.22435/jki.v7i1.5605.26-33>
 28. Yıldırım, S., Kadioğlu, A., Sağlam, A., Yaşar, A., & Sellitepe, H. E. (2016). Fast determination of anthocyanins and free pelargonidin in fruits, fruit juices, and fruit wines by high-performance liquid chromatography using a core-shell column. *Journal of separation science*, 39(20), 3927–3935.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201600661>
 29. Galih, W., Permana, B., & Damayanti, S. (2025). Development and Validation of Analytical Method for Piperine in Phytopharmaceutical Product Containing Cabe Jawa Fructus by HPLC. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 12(1), 36–42.
<https://doi.org/10.24198/ijpst.v12i1.46348>

30. Guo, P., Yan, W., Han, Q., Wang, C., & Zhang, Z. (2015). Simultaneous quantification of 25 active constituents in the total flavonoids extract from *Herba Desmodii Styracifolii* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of separation science*, 38(7), 1156–1163. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401360>
31. Chen, H., Zhou, H., Tao, R., Li, W., & Wang, C. Z. (2020). Simultaneous quantification of six flavonoids of *Rhus verniciflua* Stokes using matrix solid-phase dispersion via high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detector. *Journal of separation science*, 43(23), 4281–4288. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000749>
32. Araujo Leon, J. A., Ruiz Ciau, D. V., Coral Martinez, T. I., & Cantillo Ciau, Z. O. (2015). Comparative fingerprint analyses of extracts from the root bark of wild *Hippocratea excelsa* and "Cancerina" by high-performance liquid chromatography. *Journal of separation science*, 38(22), 3870–3875. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401480>
33. Sri Rejeki, D., & Oktariani Pramiastuti. (2022). Analisis Hidrokuinon pada Lima Merk Produk Krim Malam Menggunakan Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kesehatan*, 13(2), 2022–2023. <http://ojs.stikesbhamadaslawi.ac.id/index.php/jik>