

FINGERPRINT ANALYSIS OF *Stevia rebaudiana* USING HIERACHIAL CLUSTER ANALYSIS (HCA) AND PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA)

ANALISIS SIDIK JARI KROMATOGRAM *Stevia rebaudiana* SECARA HIERACHIAL CLUSTER ANALYSIS (HCA) DAN PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA)

Yohanes Martono^{1,3}, Sugeng Riyanto², Sudibyo Martono², Abdul Rohman²

¹Doctoral Student Faculty of Pharmacy Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

² Faculty of Pharmacy Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Chemistry Study Program, Faculty Science and Mathematic, Universitas Kristen Satya Wacana

ABSTRACT

Bioactivity herbal plant is influenced by its active compounds and consistency. Stevia rebaudiana contains bioactive compounds, diterpene glycosides which have antidiabetes activity. The goal of this study was to develop fingerprints analysis of S. rebaudiana based on High Performance Liquid Chromatography (HPLC) chromatogram. S. rebaudiana leaves were taken from different planting area, leave ages, and seeds source. S. rebaudiana leaves were analyzed using isocratic Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). Fingerprints analysis of S. rebaudiana was done using chemometrics of Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA). Peak marker "common peak" were identify using Cluster Observation in HCA analysis at each peaks retention time formed in chromatogram. Retention times giving similarity value more than 0,90 were identified as "common peak". HCA analysis resulted in 5 "common peak" identification as peaks marker particularly at peak no 1, 2, 4, 6 and 7. HCA analysis was also clustered samples into 3 main cluster. PCA analysis was optimized by calculated peak area whose $N > 2000$ particularly peak no 4, 6, and 7. PCA analysis result can be used to classify chromatogram based on original seeds, planting area and leave ages. Fingerprints analysis developed can be used an alternative method for quality control of S. rebaudiana herbal plants based on its bioactive compounds systemic characteristics.

Keywords: Stevia rebaudiana, Hierachial Cluster Analysis (HCA), Principal Component Analysis (PCA)

ABSTRAK

Bioaktivitas tanaman herbal sangat dipengaruhi oleh kandungan senyawa aktif dan konsistensinya. Stevia rebaudiana mengandung senyawa aktif diterpen glikosida yang berkhasiat untuk antidiabetes. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan metode analisis sidik jari tanaman herbal S. rebaudiana berdasarkan kromatogram High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Sampel daun S. rebaudiana berasal dari 5 daerah, usia dan asal bibit yang berbeda. Sampel daun S. rebaudiana dianalisis dengan metode Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) isokratik. Analisis sidikjari kromatogram S. rebaudiana menggunakan metode kemometrika secara Hierarchical Cluster Analysis (HCA) dan Principal Component Analysis (PCA). Pemilihan peak penanda (marker) "common peak" dilakukan dengan melakukan uji HCA secara Cluster Observation pada waktu retensi setiap puncak yang muncul di setiap kromatogram sampel. Waktu retensi yang memberikan nilai similarity level lebih dari 0,90 digunakan sebagai "common peak". Analisis HCA yang dilakukan memberikan 5 puncak "common peak" sebagai penanda kromatogram yaitu peak no 1, 2, 4, 6, dan 7 dan dikelompokkan menjadi tiga klaster utama. Analisis PCA yang dilakukan dioptimalkan dengan memasukkan data area puncak yang memiliki nilai $N > 2000$ yaitu puncak no 4, 6 dan 7. Hasil PCA yang diperoleh dapat mengklasifikasikan kromatogram berdasarkan asal bibit, tempat tumbuh dan usia daun. Metode analisis sidik jari yang dikembangkan dapat dijadikan alternatif metode untuk kontrol kualitas tanaman herbal S. rebaudiana berdasarkan karakteristik sistemik kandungan senyawa fitokimia.

kata kunci: Stevia rebaudiana, Hierachial Cluster Analysis (HCA), Principal Component Analysis (PCA)

Corresponding authors : Sudibyo Martono
E-mail : sudib_kekes@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Stevia rebaudiana adalah tanaman herbal yang berasal dari Amerika Selatan (Paraguay dan Brazil). Senyawa diterpene glikosidanya memiliki berbagai bioaktivitas seperti antidiabetes (Roy dkk., 2010; Shivanna dkk., 2013), antikanker (Takasaki dkk., 2009), antidiare (Wang dkk., 2014), imunomodulator (Sehar dkk., 2008), dan antioksidan (Kim dkk., 2011).

S. rebaudiana mengandung senyawa diterpen glikosida yang mempunyai karakteristik kemanisan tinggi (lebih 300 kali sukrosa) dan rendah kalori (Bergs dkk., 2012). Kandungan senyawa diterpen glikosida utama dalam tanaman *S. rebaudiana* adalah steviosida (6-10%) dan rebaudiosida A (2-4%). Senyawa diterpen glikosida lain yang terkandung dalam *S. rebaudiana* adalah rebaudiosida C (1-2%), dan dulkosida (0,4-0,7%). Senyawa glikosida lainnya yang berada dalam konsentrasi rendah yaitu steviolbiosida, rebaudiosida B, rebaudiosida D, rebaudiosida E, rebaudiosida F (Pól et al., 2007). Konsentrasi senyawa diterpen glikosida dalam tanaman *S. rebaudiana* sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti lama penyinaran sinar Matahari, ketinggian tempat tumbuh, temperatur, kultivar dan ketersediaan nutrisi (Ceunen and Geuns, 2013).

Aktivitas farmakologi tanaman herbal sangat dipengaruhi oleh kandungan senyawa fitokimia dalam tanaman (Zeng dkk., 2004). Kualitas tanaman herbal berdasarkan kandungan senyawa fitokimia akan mempengaruhi efikasi ekstrak tanaman tersebut terhadap suatu bioaktivitas (Zhu dkk., 2014). Penjaminan mutu tanaman herbal berdasarkan kandungan senyawa fitokimia diperlukan untuk menjamin keterulangan bioaktivitas tanaman herbal. Penjaminan mutu tanaman herbal mengandung dua aspek. Aspek pertama adalah aspek kuantitatif untuk menetapkan kadar senyawa aktif dominan dalam tanaman. Aspek kedua adalah aspek kualitatif meliputi analisis sidik jari tanaman herbal yang memberikan penekanan pada karakteristik sistemik dan penilaian stabilitas kandungan komponen bioaktif dalam tanaman (Chen dkk., 2009).

Metoda analisis yang banyak digunakan untuk analisis sidik jari tanaman herbal adalah kromatografi, baik Kromatografi Gas (Zeng et al., 2004), Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri (Dey dan Pandey, 2014) maupun Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Chen dkk., 2009; Pan dkk., 2015; Zhang dkk., 2008; Zhu dkk., 2014). Metode KCKT menjadi metode yang populer karena memberikan analisis sidik jari yang presisi, fleksibel dan relatif sederhana (Chen

et al., 2009). Klasifikasi kualitas tanaman herbal dapat dilakukan dengan analisis kemometri secara *Hierarchical Cluster Analysis* (HCA) dan *Principal Component Analysis* (PCA) (Liu dkk., 2011; Tie dkk., 2015).

Tujuan penelitian ini adalah menganalisis sidik jari kromatogram tanaman herbal *S. rebaudiana* sejumlah 20 sampel yang berasal dari berbagai tempat tumbuh, usia daun, dan asal bibit. Uji similaritas dan klasifikasi kualitas tanaman herbal *S. rebaudiana* dilakukan dengan kemometri *Hierarchical Cluster Analysis* (HCA) dan *Principal Component Analysis* (PCA) berdasarkan waktu retensi dan area beberapa puncak kromatogram KCKT. Hasil uji ini dapat digunakan sebagai penjaminan mutu dan kontrol kualitas bahan baku daun *S. rebaudiana* berdasarkan kandungan sistemik senyawa fitokimia untuk digunakan lebih lanjut dalam produksi ekstrak, ekstrak terpurifikasi maupun produk yang mengandung ekstrak daun *S. rebaudiana*.

METODOLOGI

Sampel

Sampel daun *S. rebaudiana* yang berasal dari dataran tinggi Bandungan, Poloboga, Tajuk, Kabupaten Semarang; Pakis, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah diperoleh dari perkebunan P.T Java Sakti Niaga, sedangkan sampel dari Tawangmangu, Kabupaten Karang Anyar Jawa Tengah diperoleh dari petani lokal. Daun *S. rebaudiana* berasal dari berbagai tempat tumbuh dengan ketinggian tempat berkisar antara 800–1400 m di atas permukaan laut, variasi usia daun yang dipanen dari 5 hari hingga 4 bulan dihitung berdasar usia tumbuh tanaman, dan variasi asal bibit. Jumlah variasi sampel sebanyak 20.

Bahan

Senyawa aktif steviosida dan rebaudiosida A yang digunakan adalah standar baku dengan kadar minimal 99,0 % berdasarkan CoA (WAKO, Japan). Pelarut untuk fase gerak HPLC adalah asetonitril (derajat *Liquid Chromatography*), metanol (derajat *Liquid Chromatography*), dan asam trifluoroasetat (derajat *pro-analysis*) dari E. Merck, Germany dan akuabides (Laboratorium Kimia, FSM, UKSW). Pelarut untuk ekstraksi adalah akuades (Laboratorium Kimia, FSM, UKSW), dan etanol (derajat *pro analysis*) dari E. Merck, Germany.

Alat

HPLC Knauer GmbH-Jerman Model Smart Line Series dengan detektor UV (Smart Line UV Detektor 2500 A 5140), kolom Eurosphere C-18 (250 × 4,6 mm i.d, 5µm), pompa ganda Smart Line

Pump 1000 V 7603, sampel injektor dengan volume 20 µL Rheodyne Loop model A1357 dan sonikator Sonikator Krisbow DSA50-GL2-2.5L.

Metode

Preparasi dan ekstraksi sampel

Preparasi dan ekstraksi sampel mengacu pada metode Martono dkk. (2015). Daun *S. rebaudiana* dipisahkan dari batang dan dikeringkan dalam *cabinet dryer* suhu 50°C selama 24 jam. Kemudian, daun kering dihaluskan dengan grinder dan serbuk kering daun diayak menggunakan ayakan dengan ukuran partikel 60 mesh. Sampel serbuk daun kering *S. rebaudiana* sebanyak 0,50 g ditimbang dan diekstraksi dengan 25 mL pelarut ekstraksi selama 60 menit menggunakan sonikator pada suhu 40 °C. Pelarut yang digunakan adalah etanol 60% dalam air selama 15 menit. Volume filtrat hasil ekstraksi ditampung dalam labu takar 25 mL dan digenapkan volumenya. Residu dire-ekstraksi sebanyak dua kali menggunakan pelarut yang sama. Filtrat hasil ekstraksi setiap bagian digabung dan digenapkan volumenya dalam labu takar 100 mL. Larutan sampel disaring menggunakan *mikrofilter* ukuran 0,45 µm dan diencerkan sesuai kebutuhan sebelum diinjeksikan ke sistem HPLC.

Kondisi Operasional KCKT

Kondisi kromatografi yang digunakan adalah sesuai metode yang dikembangkan oleh (Martono dkk., 2015). Sistem KCKT menggunakan fase diam Eurosphere C-18 (250 × 4.6 mm., i.d., 5 µm) pada suhu 30°C, fase gerak campuran air : metanol (90 : 10, v/v disesuaikan pH 3,00 dengan asam fosfat 0,01%) : asetonitril : asam trifluoroasetat (65 : 35 : 0,01, v/v/v), kecepatan alir 0,6 mL/min, detektor UV pada λ_{210} nm dan volume injeksi 20 µL. Waktu analisis KCKT tidak lebih dari 15 menit.

Hierarchical Cluster Analysis (HCA)

Uji HCA ini dimaksudkan untuk menentukan puncak-puncak yang menjadi *marker* atau identitas kromatogram sampel daun *S. rebaudiana* yang selanjutnya dapat digunakan untuk dasar klasifikasi kualitas sampel berdasarkan aspek kuantitas senyawa fitokimia penanda yang terdeteksi. Analisis sidik jari menggunakan *similarity test* dengan uji *Hierarchical Cluster Analysis* (HCA) secara Cluster Observation menggunakan model *Squared Euclidean Distance, Complete Linkage*.

Pemilihan puncak-puncak penanda (*marker*) yang selanjutnya disebut sebagai "*common peak*" dilakukan dengan melakukan uji

Cluster Observation pada waktu retensi setiap puncak yang muncul di setiap kromatogram sampel. Waktu retensi yang memberikan nilai *similarity level* lebih dari 0,90 digunakan sebagai "*common peak*". Analisis HCA dilakukan dengan memasukkan data rasio area "*common peak*" dengan area steviosida sebagai senyawa dominan. Data tersebut adalah data Relative Peak Area (RPA). Berdasarkan hasil analisis HCA, kromatogram *S. rebaudiana* yang berasal dari berbagai daerah dan usia daun akan diklasterisasi berdasarkan nilai *similarity level*. Hasil pengelompokan ditampilkan dalam dendrogram. Analisis data secara kemometri ini dilakukan dengan *software* Mini tab 17.

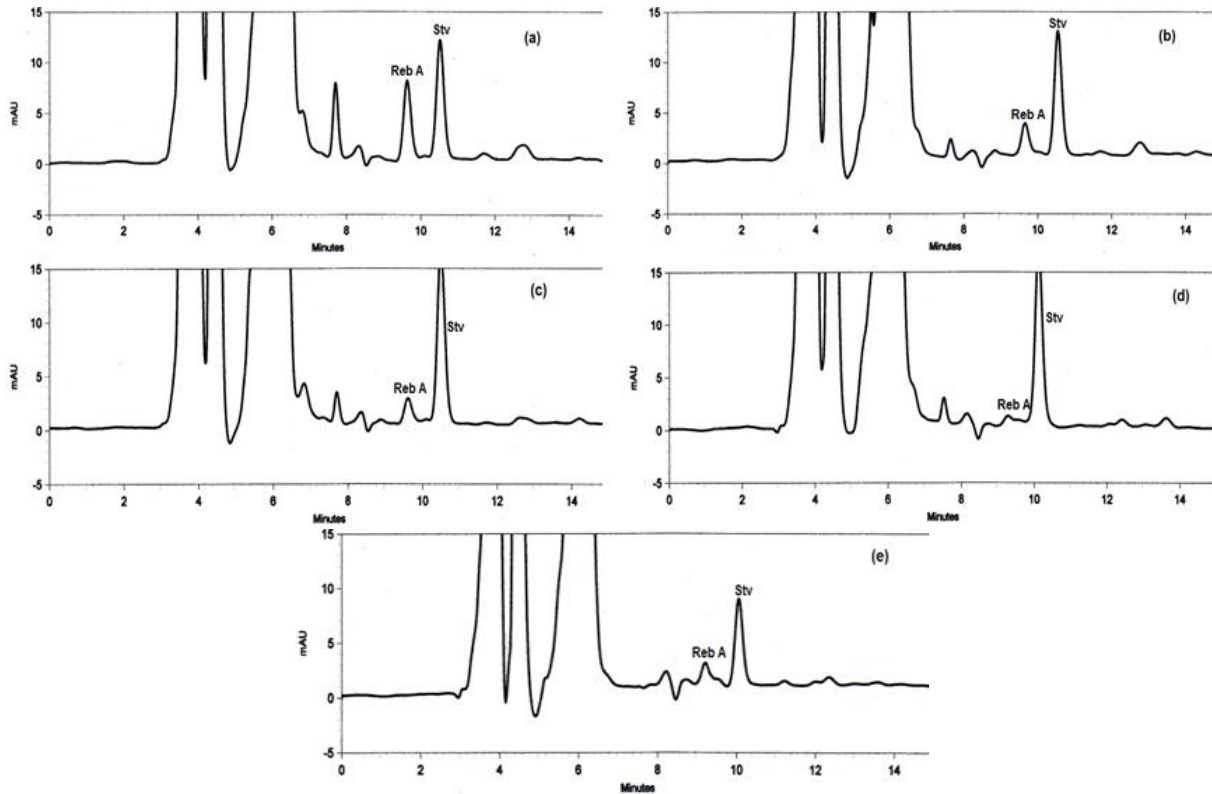
Principal Component Analysis (PCA)

Analisis PCA ini menghasilkan metode klasifikasi sampel yang mengkorelasikan aspek kuantitatif (area) puncak penanda dengan asal bibit, usia daun dan daerah penanaman *S. rebaudiana* sehingga secara langsung dapat digunakan untuk identifikasi karakteristik sampel. Data yang digunakan dalam PCA ini adalah area "*common peak*" yang digunakan pada uji HCA sebelumnya. Setiap data akan diklasifikasikan dan hasilnya akan ditampilkan dalam bentuk *Scare Plot*. Analisis data secara kemometri ini dilakukan dengan *software* Mini tab 17.

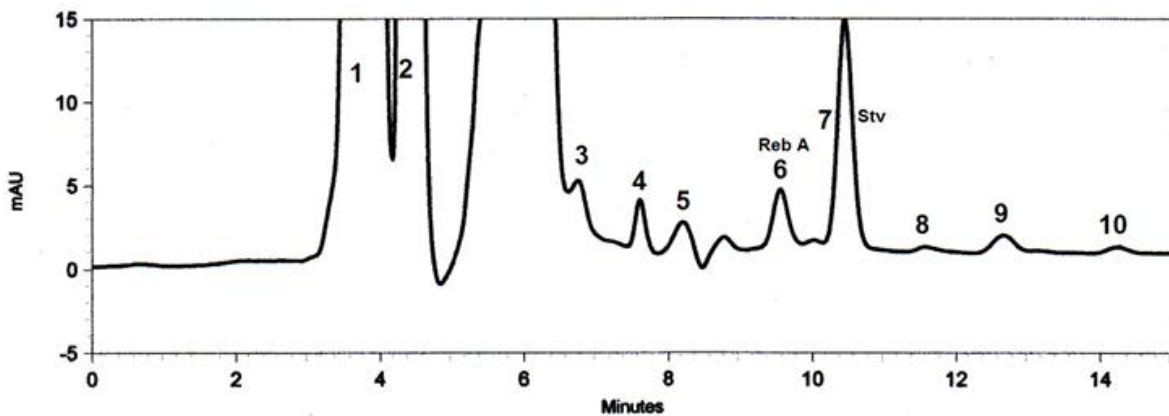
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kandungan senyawa aktif dalam tanaman herbal sangat dipengaruhi daerah lingkungan tumbuhnya. Perbedaan karakteristik lingkungan tumbuh akan menyebabkan kandungan senyawa aktif menjadi bervariasi (Pan dkk., 2015). Hasil identifikasi ini menunjukkan adanya puncak-puncak yang tidak muncul dan atau pada area kecil pada sampel dari daerah dan usia daun yang berbeda. Area pada waktu retensi 7,700 min pada kromatogram sampel Bandungan usia 1 bulan lebih besar dibanding dengan kromatogram Bandungan bibit Tawangmangu usia 1 bulan. Karakteristik kromatogram yang berbeda pada daerah tumbuh dan usia daun sama namun berbeda asal bibit juga ditemukan pada sampel Tajuk BPBP 4 bulan dengan Tajuk Kintamani 4 bulan. Kromatogram sampel Tajuk Kintamani 4 bulan memiliki puncak pada waktu retensi 13,617 min sedangkan puncak yang sama tidak teridentifikasi pada sampel Tajuk BPBP 4 bulan. Perbedaan ketinggian tempat tumbuh akan mempengaruhi besarnya kandungan senyawa dominan sampel. Hasil ini ditunjukkan oleh kromatogram sample Bandungan bibit



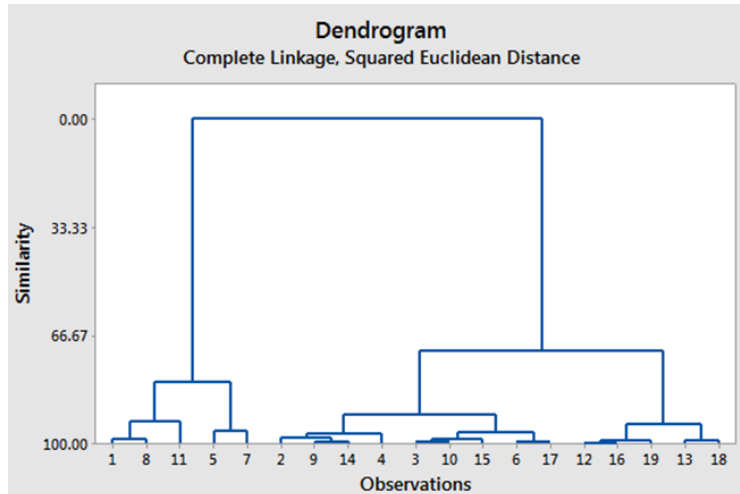
Gambar 1. Contoh Kromatogram KCKT tanaman herbal *S. rebaudiana* yang berasal dari (a) Bandungan_bibit Bandungan_usia daun 1 bulan (b) Bandungan_bibit Tawangmangu_usia daun 1 bulan, (c) Tajuk_bibit BPBP_usia daun 4 bulan, (d) Tajuk_bibit Kintamani_usia daun 4 bulan, (e) Poloboga_bibit Tawangmangu_usia daun 1 bulan. Reb A = rebaudiosida A, Stv = steviosida.



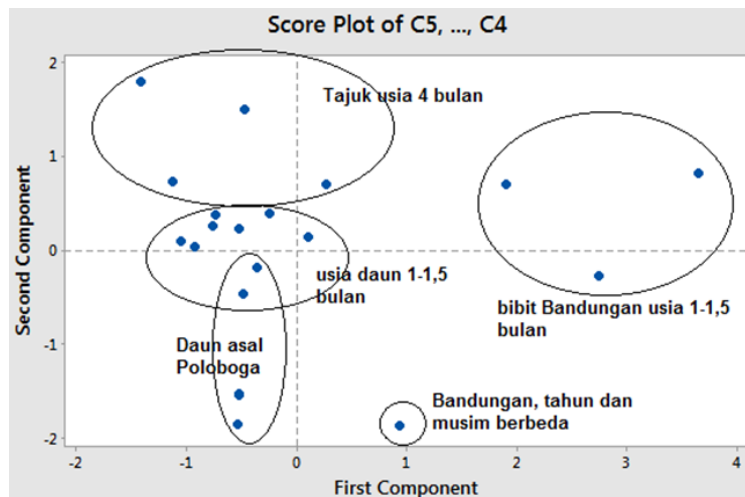
Gambar 2. Pembagian puncak dalam Kromatogram KCKT tanaman *S. rebaudiana*. Reb A = rebaudiosida A, Stv = steviosida.

Tawangmangu usia 1 bulan (ketinggian tempat tumbuh \pm 1400 m di atas permukaan laut) yang mana area senyawa analit dominan lebih besar daripada area senyawa analit dominan dalam sampel Poloboga bibit Tawangmangu usia 1 bulan (ketinggian tempat tumbuh \pm 800 m di atas permukaan laut). Contoh hasil identifikasi

kromatogram tanaman *S. rebaudiana* ditunjukkan pada Gambar 1. Perbedaan tempat tumbuh tanaman *S. rebaudiana* menyebabkan perbedaan karakter puncak teridentifikasi pada sampel. Perbedaan karakter puncak kromatogram tanaman *S. rebaudiana* ini dapat menjadi sidik jari karakter sistemik senyawa aktif *S. rebaudiana*.



Gambar 3. Dendrogram hasil uji HCA model *Squared Euclidean Distance, Complete Linkage* dengan masukan data waktu retensi antara seluruh peak dengan “*common peak*”.



Gambar 4. *Score Plot* hasil klasifikasi PCA model *Eigenanalysis of the Correlation Matrix* berbagai sampel tanaman *S. rebaudiana*

Analisis Sidik Jari Fitokimia Kromatogram *S. rebaudiana*

Hierarchical Cluster Analysis (HCA)

Tujuan dalam analisis sidik jari ini adalah menemukan kesamaan dan atau perbedaan dalam profil kromatogram antar sampel berdasarkan karakter retensi dan intensitas peak yang diidentifikasi. Hasil analisis ini dapat memberikan sidik jari karakteristik sistemik kandungan senyawa fitokimia antar sampel. Analisis HCA dapat dijadikan uji kemiripan dan juga klasifikasi tanaman herbal yang berbeda berdasarkan variasi retensi dan intensitas *peak* dalam kromatogram KCKT. Langkah pertama yang dilakukan adalah memilih “*common peak*” dengan melakukan uji

kemiripan data waktu retensi setiap peak yang muncul di setiap kromatogram sampel (Gambar 2). Penentuan *common peak* ini berdasarkan nilai *similarity level* > 0,90 untuk setiap kluster yang diobservasi. Analisis HCA memberikan hasil bahwa puncak yang memiliki nilai kemiripan tinggi adalah peak no 1, 2, 4, 6, 7. Dalam penelitian ini, senyawa aktif dominan yang terkandung dalam *S. rebaudiana* ditentukan dengan analisis KCKT senyawa standar baku steviosida dan rebaudiosida A berdasar waktu retensinya. Senyawa dominan yang teridentifikasi adalah rebaudiosida A (puncak no 6, waktu retensi 9,667 min) dan steviosida (puncak no 7, waktu retensi 10,550 min). Daftar nilai *similarity level*

Tabel I. Analisa uji kemiripan HCA model *Squared Euclidean Distance, Complete Linkage* dengan masukan data waktu retensi antara seluruh peak dengan "common peak"

Seluruh puncak			Puncak "common peak" (No 1, 2,4,6 dan 7)		
Jumlah laster	Similarity level	Distance level	Jumlah Kluster	Similarity level	Distance level
19	100.00	0.000000	19	99.8287	0.000834
18	99.925	0.000545	18	99.6576	0.001667
17	99.920	0.000578	17	99.6438	0.001734
16	99.920	0.000578	16	99.2170	0.003812
15	99.894	0.000768	15	99.2035	0.003878
14	99.800	0.001445	14	98.9593	0.005067
13	99.800	0.001445	13	98.9135	0.005290
12	99.800	0.001445	12	98.8017	0.005834
11	99.464	0.003878	11	98.7880	0.005901
10	99.353	0.004678	10	98.7629	0.006023
9	98.519	0.010712	9	98.6900	0.006378
8	98.427	0.011378	8	98.5051	0.007278
7	98.058	0.014045	7	96.8916	0.015134
6	98.055	0.014067	6	95.3759	0.022513
5	93.217	0.049067	5	95.3759	0.022513
4	92.280	0.055845	4	93.4752	0.031767
3	82.560	0.126156	3	92.2313	0.037823
2	51.773	0.348867	2	91.0218	0.043712
1	0.000	0.723389	1	0.0000	0.486867

Tabel 2. Pengelompokan sampel berdasarkan analisis HCA model *Squared Euclidean Distance, Complete Linkage* dengan masukan data RPA "common peak"

No	Sampel	Kluster		
		I	II	III
1	Poloboga_bibit Bandungan_Usia daun 6 Minggu	√		
2	Bandungan_bibit Bandungan_Usia daun 1 Bulan (Tahun dan musim berbeda)		√	
3	Bandungan_bibit Tawangmangu_usia daun 1,5 bulan		√	
4	Bandungan_bibit Tawangmangu_usia daun 1 bulan		√	
5	Bandungan_bibit Bandungan_usia daun 1 bulan	√		
6	Pakis_bibit Tawangmangu_usia daun 1,5 bulan		√	
7	Poloboga_bibit Tawangmangu_usia daun 1 bulan	√		
8	Poloboga_bibit Tawangmangu_usia daun 2 bulan	√		
9	Poloboga_bibit Tawangmangu_usia daun 3 bulan		√	
10	Poloboga_bibit Tawangmangu_usia daun 1,5 bulan		√	
11	Tajuk_bibit Balitro_usia daun 4 bulan	√		
12	Tajuk_bibit Balitro_usia daun 3 bulan			√
13	Tajuk_bibit BPBP_usia daun 4 bulan			√
14	Tajuk_bibit Bandungan_usia daun 1 bulan		√	
15	Tajuk_bibit Kintamani_usia daun 1 bulan		√	
16	Tajuk_bibit Kintamani_usia daun 4 bulan			√
17	Tajuk_bibit Tigra_usia daun 1 bulan		√	
18	Tajuk_bibit Tigra_usia daun 4 bulan			√
19	Tawangmangu_bibit Tawangmangu_Usia daun 1,5 bulan			√

antara waktu retensi seluruh puncak dan "common peak" ditunjukkan pada Tabel 1. Analisis HCA dilanjutkan dengan memasukkan

data RPA setiap "common peak" untuk setiap sampel. Pemeriksaan outlier dilakukan untuk meminimalkan bias. Outlier ditentukan dari

sampel yang memberikan nilai *Mahalanobis Distance* terbesar. Dalam penelitian ini, jumlah outlier yang ditemukan adalah 1. Data RPA "common peak" tiap sampel disusun sehingga diperoleh data dengan matrik 19×5 . Hasil analisis HCA seperti yang ditunjukkan pada dendrogram (Gambar 3) mengelompokkan sampel dalam 3 kluster utama. Hasil pengelompokan ini terdaftar pada tabel II.

Hasil analisis HCA ini menunjukkan bahwa puncak penanda (*marker*) kromatogram ekstrak daun *S. rebaudiana* adalah puncak no 1, 2, 4, 6 dan 7. Puncak-puncak tersebut dapat menjadi sidik jari kromatogram ekstrak daun *S. rebaudiana* berdasarkan kemiripan karakteristik kandungan senyawa fitokimia khususnya senyawa steviosida dan rebaudiosida A antar sampel dan lebih luas lagi antar kelompok.

Principal Component Analysis (PCA)

Analisa PCA dilakukan dengan memasukkan data area tiap "common peak" untuk setiap sampel. Analisis ini memberikan hasil pengelompokan sampel berdasarkan aspek kuantitatif konsentrasi senyawa yang mengkorelasikan area "common peak" dengan sampel secara langsung. Dalam penelitian ini, analisis PCA awal menunjukkan klasifikasi yang masih bias. Hal ini dikarenakan area puncak no 1 dan 2 memiliki nilai *theoretical plate* (N) yang kecil sehingga kualitas *peak* yang dihasilkan dapat memberikan bias terhadap area terhitung (Snyder dkk., 1997). Oleh karena itu, analisis PCA dioptimalkan dengan memasukkan data area puncak yang memiliki nilai $N > 2000$ yaitu puncak no 4, 6 dan 7. Hasil PCA yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 4.

Klasifikasi PCA ini dapat dijadikan metode untuk mengelompokkan bahan baku daun *S. rebaudiana* sesuai karakteristik sampel berdasar asal bibit, usia daun dan daerah penanaman *S. rebaudiana*. Kualitas ekstrak, ekstrak terpurifikasi maupun produk yang mengandung ekstrak *S. rebaudiana* sangat dipengaruhi kualitas bahan baku berdasar sidik jari kandungan senyawa fitokimia yang berpengaruh. Oleh karena itu, analisis PCA ini dapat dijadikan metode kontrol kualitas bahan baku yang juga akan memengaruhi kualitas produk yang dihasilkan.

KESIMPULAN

Analisis sidik ragam kromatogram *S. rebaudiana* dengan analisis multivariat HCA memberikan 5 puncak penanda (*marker*) yaitu puncak no 1, 2, 4, 6 dan 7 yang mana puncak no 6 dan 7 adalah senyawa aktif dominan rebaudiosida A dan steviosida, secara berturut-turut. Hasil klasifikasi PCA dapat mengelompokkan secara

langsung sampel daun *S. rebaudiana* berdasarkan karakteristik asal bibit, usia daun dan daerah penanaman dengan mengkorelasikan area puncak penanda 4, 6 dan 7.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada Kementerian Risetdikti Indonesia yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Doktor tahun 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Bergs, D., Burghoff, B., Joehnck, M., Martin, G. And Schembecker, G. 2012. Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. *J. Für Verbraucherschutz Leb.* 7: 147–154.
- Ceunen, S. And Geuns, J.M.C. 2013. Spatio-temporal variation of the diterpene steviol in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. *Phytochemistry* 89: 32–38.
- Chen, J., Lu, Y.-H., Wei, D.-Z. And Zhou, X.-L. 2009. Establishment of a Fingerprint of Raspberries by LC. *Chromatographia* 70: 981–985.
- Dey, A. And Pandey, D.K. 2014. HPTLC detection of altitudinal variation of the potential antivenin stigmaterol in different populations of the tropical ethnic antidote *Rauwolfia serpentina*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7 (Supplement 1): S540–S545.
- Kim, I.-S., Yang, M., Lee, O.-H. And Kang, S.-N. 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Sci. Technol.* 44: 1328–1332.
- Liu, X.-J., Hu, J., Li, Z.-Y., Qin, X.-M., Zhang, L.-Z. And Guo, X.-Q. 2011. Species classification and quality assessment of Chaihu (*Radix bupleuri*) based on High-Performance Liquid Chromatographic fingerprint and combined chemometrics methods. *Arch. Pharm. Res.* 34: 961–969.
- Martono, Y., Riyanto, S., Rohman, A., Martono, S., 2015. Improvement method of fast and isocratic RP-HPLC analysis of major diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana* leaves. AIP (accepted). Selected paper on International Conference Science Technology, ICST Gadjah Mada University Indonesia.
- Pan, Y., Zhang, J., Shen, T., Zhao, Y.-L., Wang, Y.-Z. And Li, W.-Y. 2015. Comparative metabolic fingerprinting of *Gentiana rhodantha* from different geographical origins using LC-UV-MS/MS and multivariate statistical analysis. *BMC Biochem.* 16: 9-19.

- Pól, J., Hohnová, B. And Hyötyläinen, T. 2007. Characterisation of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 29th International Symposium on Capillary Chromatography 1150: 85–92.
- Roy, B., Kujur, R., Singh, V., Ram, M., Yadava, H., Singh, K. And Kumari, S. 2010. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacogn. Res.* 2: 28-34.
- Sehar, I., Kaul, A., Bani, S., Pal, H.C. And Saxena, A.K. 2008. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chem. Biol. Interact.* 173: 115–121.
- Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F., Kaul, V.K., 2013. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *J. Diabetes Complications* 27: 103–113.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J. And Glajch, J. 1997. *Practical HPLC Method Development*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc, New York, United States of America. pp. 418-20.
- Takasaki, M., Konoshima, T., Kozuka, M., Tokuda, H., Takayasu, J., Nishino, H., Miyakoshi, M., Mizutani, K. And Lee, K.-H. 2009. Cancer preventive agents. Part 8: Chemopreventive effects of stevioside and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 600–605.
- Tie, C., Hu, T., Guo, B. And Zhang, J. 2015. Novel strategy for herbal species classification based on UPLC–HRMS oligosaccharide profiling. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 111: 14–20.
- Wang, L.S., Shi, Z., Shi, B.M. And Shan, A.S. 2014. Effects of dietary stevioside/rebaudioside A on the growth performance and diarrhea incidence of weaned piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 187: 104–109.
- Zeng, Z.-D., Liang, Y.-Z., Xu And C.-J. 2004. Comparing chemical fingerprints of herbal medicines using modified window target-testing factor analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 381: 913–924.
- Zhang, Y., Dan, M., Wu, J., Yang, H., Huang, H., Qi, Y., Wei, S., Okuyama, T. And Nakajima, K. 2008. Study on the Chromatographic Fingerprinting of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. by LC Coupled with Principal Component Analysis. *Chromatographia* 68: 101–104.
- Zhu, Y., Zheng, Q., Sun, Z., Chen, Z., Zhao, Y., Wang, Z., Yang, H., Li, J., Li, Y. And Xiao, X. 2014. Fingerprint–efficacy study of *Radix Aconiti Lateralis Preparata* (Fuzi) in quality control of Chinese herbal medicine. *J. Therm. Anal. Calorim.* 118: 1763–1772.