

## ABSTRACT

Phenolic compounds have been discovered in edible flowers, including chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). The flowers are usually consumed as tea in dried form. To determine the level of phenolic compounds in chrysanthemum tea, a new method have been established using high-performance liquid chromatography in couple with diode array detection (HPLC-DAD) and ultra-high-performance liquid chromatography in combination with photodiode array detection (UPLC-PDA). The Box-Behnken design was employed to evaluate the effect of working variables, such as gradient elution and flow rate. The optimum composition of mobile phase (A, 0.1% acetic acid in water; and B, 2% acetic acid in acetonitrile). The optimum point for HPLC-DAD was used in the beginning (2.5% of phase B) and final (94% of phase B) of the gradient program with a flow rate 1 mL min<sup>-1</sup>. Meanwhile, the optimum point for UPLC-PDA was used in the beginning (0% of phase B) and final (55% of phase B) of the gradient program with a flow rate 0.47 mL min<sup>-1</sup>. The results disclosed a total analysis time of ten phenolic compounds (gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, catechin, caffeic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, and quercetin) found in dried chrysanthemum in less than 13 min for HPLC-DAD whereas for UPLC-PDA in less than 6 min without interferences. Furthermore, the validation parameters were assessed for the determination of phenolic compounds within the linear ranges of 1 to 12.5 mg L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0.999$ ) and 15 to 125 mg L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0.999$ ) for HPLC-DAD and the linear ranges of 1 to 7.5 mg L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0.999$ ) and 15 to 40 mg L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0.999$ ) for UPLC-PDA. The highest identifications and quantification limits were noted in gallic acid (0.99 and 3.25 mg L<sup>-1</sup>, respectively), whereas the lowest was for quercetin (0.41 and 1.36 mg L<sup>-1</sup>, respectively) for HPLC-DAD and for UPLC-PDA the highest identifications and quantification limits were noted in catechin (0.17 and 0.53 mg L<sup>-1</sup>, respectively), whereas the lowest was for quercetin (0.09 and 0.28 mg L<sup>-1</sup>, respectively). The coefficient of variation (%CV) of intra- and inter-day precision were less than 3% for HPLC-DAD and less than 2% for UPLC-PDA for variability in retention time and area of peaks. Furthermore, the recoveries ranged from 93.2 (protocatechuic acid) to 104.8% for HPLC-DAD, whereas the recoveries ranged from 92.1 (*p*-coumaric acid) to 107.5% (chlorogenic acid) for UPLC-PDA. These findings indicated that the developed methods were reliable for determining the studied phenolic compounds in chrysanthemum tea.

**Keywords:** Box-Behnken design, dried edible flowers, separation, floral tea, HPLC-DAD, UPLC-PDA.

## INTISARI

Senyawa fenolat telah ditemukan pada bunga yang dapat dimakan, termasuk bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). Bunganya biasa dikonsumsi sebagai teh dalam bentuk kering. Untuk menentukan kadar senyawa fenolik dalam teh bunga krisan, metode baru telah ditetapkan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan detektor *Diode Array* (HPLC-DAD) dan Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi dengan detektor *Photo Diode Array* (UPLC-PDA). Desain *Box-Behnken* digunakan untuk mengevaluasi pengaruh variabel kerja, seperti elusi gradien dan laju aliran. Komposisi optimum fase gerak (A, asam asetat 0,1% dalam air; dan B, asam asetat 2% dalam asetonitril). Titik optimal untuk HPLC-DAD digunakan pada awal (2,5% fase B) dan akhir (94% fase B) dari program gradien dengan laju alir 1 mL/min. Sementara itu, titik optimum untuk UPLC-PDA digunakan pada awal (0% fase B) dan akhir (55% fase B) program gradien dengan laju alir 0,47 mL/min. Hasil mengungkapkan total waktu analisis sepuluh senyawa fenolik (asam galat, asam protokatekuat, asam klorogenat, asam *p*-hidroksibenzoat, katekin, asam kafeat, asam vanilat, asam *p*-koumarat, asam ferulat, dan kuersetin) yang ditemukan di krisan kering di kurang dari 13 menit untuk HPLC-DAD sedangkan untuk UPLC-PDA kurang dari 6 menit tanpa gangguan. Selanjutnya, parameter validasi dinilai untuk penentuan senyawa fenolik dalam rentang linier 1 hingga 12,5 mg/L ( $R^2 = 0,999$ ) dan 15 hingga 125 mg/L ( $R^2 = 0,999$ ) untuk HPLC-DAD dan uji linier, rentang 1 hingga 7,5 mg/L ( $R^2 = 0,999$ ) dan 15 hingga 40 mg/L ( $R^2 = 0,999$ ) untuk UPLC-PDA. Batas identifikasi dan kuantifikasi tertinggi dicatat dalam asam galat (masing-masing 0,99 dan 3,25 mg/L), sedangkan yang terendah adalah untuk kuersetin (masing-masing 0,41 dan 1,36 mg/L) untuk HPLC-DAD dan untuk UPLC-PDA, identifikasi tertinggi dan batas kuantifikasi dicatat dalam katekin (masing-masing 0,17 dan 0,53 mg/L), sedangkan yang terendah adalah untuk kuersetin (masing-masing 0,09 dan 0,28 mg/L). Koefisien variasi (%CV) presisi intra dan antar hari kurang dari 3% untuk HPLC-DAD dan kurang dari 2% untuk UPLC-PDA untuk variabilitas waktu retensi dan luas puncak. Selanjutnya, pemulihan berkisar antara 93,2 (asam protokatekuat) hingga 104,8% untuk HPLC-DAD, sedangkan pemulihan berkisar antara 92,1 (asam *p*-koumarik) hingga 107,5% (asam klorogenat) untuk UPLC-PDA. Temuan ini menunjukkan bahwa metode yang dikembangkan dapat diandalkan untuk menentukan senyawa fenolat yang dipelajari dalam teh krisan.

**Kata kunci:** desain *Box-Behnken*, bunga kering *edible*, pemisahan, teh bunga, HPLC-DAD, UPLC-PDA.