

**VALIDASI METODE *ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID*
CHROMATOGRAPHY DOUBLE MASS SPECTROSCOPY
(UHPLC-MS/MS) UNTUK ANALISIS KURKUMIN PADA
EKSTRAK ETANOL KUNYIT (*Curcuma longa*) DENGAN
BERBAGAI PERBANDINGAN KONSENTRASI PELARUT**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



Oleh:

Intan Maysaroh

NIM 155070500111002

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

DAFTAR ISI

Halaman

Halaman Pengesahan	i
Pernyataan Keaslian Tulisan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Tabel	xi
Daftar Gambar	xii
Daftar Lampiran	xiv
Daftar Singkatan	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Pelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kunyit	7
2.2 Kurkumin	8
2.3 Metode Maserasi	11
2.3.1 Prosedur Umum	11
2.3.2 Proses Maserasi untuk <i>organized</i> dan <i>unorganized drug</i>	12

2.4	Standarisasi Ekstrak.....	13
2.4.1	Definisi.....	13
2.4.2	Faktor yang Berpengaruh pada Mutu Ekstrak.....	14
2.4.2.1	Faktor Biologi.....	14
2.4.2.2	Faktor Kimia.....	15
2.4.3	Parameter Uji Ekstrak.....	16
2.4.3.1	Parameter Non Spesifik.....	16
2.4.3.2	Parameter Spesifik.....	16
2.5	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	17
2.5.1	Definisi.....	17
2.5.2	Instrumentasi.....	18
2.5.2.1	Fase Gerak.....	19
2.5.2.2	Fase Diam.....	20
2.5.2.3	Detektor.....	22
2.5.3	Pemisahan Puncak pada Kromatografi.....	23
2.5.4	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography Double Mass Spectrophotometry (UHPLC MS/MS)</i>	26
2.6	Validasi Metode.....	29
2.6.1	Selektivitas.....	30
2.6.2	Linieritas dan Rentang.....	31
2.6.3	Akurasi.....	33
2.6.4	Presisi.....	34
2.6.5	<i>Limit of Detection (LOD)</i> dan <i>Limit of Quantification (LOQ)</i>	36

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1	Kerangka Konsep.....	37
-----	----------------------	----

3.2 Hipotesis Penelitian	38
--------------------------------	----

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian.....	39
-------------------------------	----

4.2 Variabel Penelitian.....	39
------------------------------	----

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	39
--------------------------------------	----

4.4 Bahan dan Alat / Instrumen Penelitian.....	40
--	----

4.4.1 Bahan Penelitian	40
------------------------------	----

4.4.2 Alat Penelitian	40
-----------------------------	----

4.5 Definisi Istilah / Operasional.....	40
---	----

4.6 Prosedur Penelitian.....	41
------------------------------	----

4.6.1 Metode Maserasi.....	41
----------------------------	----

4.6.2 Kondisi Operasi UHPLC MS/MS.....	42
--	----

4.6.3 Pembuatan Larutan Standar Kurkumin.....	44
---	----

4.6.4 Pembuatan Larutan Sampel.....	44
-------------------------------------	----

4.6.5 Validasi Metode Analisis.....	45
-------------------------------------	----

4.6.5.1 Uji Selektivitas.....	45
-------------------------------	----

4.6.5.2 Uji Linieritas	45
------------------------------	----

4.6.5.3 Penentuan <i>Limit of Detection</i> (LOD) dan <i>Limit of Quantification</i> (LOQ)	45
--	----

4.6.5.4 Penentuan Akurasi dan Presisi Standar Kurkumin	46
--	----

4.6.5.5 Pengukuran Kadar Sampel	46
---------------------------------------	----

4.7 Analisa Data	46
------------------------	----

4.7.1 Linieritas.....	46
-----------------------	----

4.7.2 <i>Limit of Detection</i> (LOD) dan <i>Limit of Quantification</i> (LOQ).....	47
---	----

4.7.3 Akurasi.....	48
--------------------	----

4.7.4	Presisi	48
4.7.5	Perhitungan Kadar Sampel	48
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA		
5.1	Maserasi	50
5.2	Validasi Metode	54
5.2.1	Selektivitas	55
5.2.2	Linieritas	59
5.2.3	LOD dan LOQ	61
5.2.4	Akurasi dan Presisi	62
5.3	Penetapan Kadar Kurkumin Sampel Ekstrak	64
BAB 6 PEMBAHASAN		
6.1	Pembahasan Hasil Penelitian	67
6.2	Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian	78
6.3	Keterbatasan Penelitian	78
BAB 7 PENUTUP		
7.1	Kesimpulan	79
7.2	Saran	79
	Daftar Pustaka	80
	Lampiran	84

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**VALIDASI METODE ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY DOUBLE MASS SPECTROSCOPY (UHPLC-MS/MS)**

**UNTUK ANALISIS KURKUMIN PADA EKSTRAK ETANOL KUNYIT (*Curcuma
longa*) DENGAN BERBAGAI PERBANDINGAN KONSENTRASI PELARUT**

Oleh:

Intan Maysaroh (155070500111002)

Telah diuji pada

Hari / Tanggal : Kamis / 29 November 2018

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

Uswatun Khasanah, S.Farm., Apt., M.Farm.
NIP. 2011068512222001

Pembimbing-I/Penguji-II

Bachtiar Rifai P. I., S.Farm., M.Farm.,
Apt.

NIP. 2012058709291001

Pembimbing-II/Penguji-III

Ika Putri Nurhayati, S.Farm., Apt., M.Sc.

NIP. 2013048909152002

Mengetahui,

Ketua Program Studi Farmasi,

Dr. Dra. Sri Wijarsih, Apt., M.Si.
NIP. 195408231981032001

ABSTRAK

Maysaroh, Intan. 2018. *Validasi Metode Ultra High Performance Liquid Chromatography Double Mass Spectroscopy (UHPLC-MS/MS) untuk Analisis Kurkumin pada Ekstrak Etanol Kunyit (Curcuma longa) dengan Berbagai Perbandingan Konsentrasi Pelarut*. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Bachtiar Rifai Pratita Ihsan, S.Farm., M.Farm., Apt. (2) Ika Putri Nurhayati, S.Farm., Apt., M.Sc.

Kunyit (*Curcuma longa*) merupakan salah satu tanaman herbal yang banyak dimanfaatkan untuk mengobati beberapa penyakit di masyarakat. Senyawa yang terkandung dalam kunyit dan berperan dalam aktivitas farmakologi tersebut adalah kurkumin. Pada penelitian ini dilakukan maserasi kunyit dengan menggunakan 3 konsentrasi pelarut etanol yang berbeda, yaitu etanol 70%, etanol 80% dan etanol 96%. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan berbagai konsentrasi etanol pada proses maserasi terhadap kandungan kurkumin dalam ekstrak. Ekstrak yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan instrumen UHPLC-MS/MS dengan sistem *triple quadrupole* (QqQ) dan metode *targetted Selected Reaction Monitoring* (SRM) yang ditargetkan dengan massa quantifier 285 dan qualifier 177. UHPLC MS/MS dioperasikan menggunakan fase diam C18 dan fase gerak 0,1% asam format dalam aquabidest dan 0,1% asam format dalam asetonitril. Parameter validasi metode yang diuji dalam penelitian ini adalah selektivitas, linieritas, akurasi, presisi dan LOD LOQ. Puncak kurkumin yang muncul pada kromatogram larutan baku kurkumin, larutan sampel ekstrak etanol kunyit 96%; 80%; dan 70% secara berturut-turut muncul pada 3,195; 3,202; 3,220 dan 3,214 menit. Kurva konsentrasi larutan standar kurkumin terhadap area didapatkan hasil yang linier, dengan rentang konsentrasi 0,25 hingga 4 ppm ($r^2 = 0,999$). Nilai %recovery yang didapatkan adalah mulai dari 97,54% hingga 106,38% dan didapatkan nilai RSD mulai dari 1,09% hingga 4,37%. Nilai LOD dan LOQ yang didapatkan berturut-turut adalah 0,03 ppm dan 0,08 ppm. Nilai kadar kurkumin yang terkandung dalam sampel ekstrak etanol 96%; 80% dan 70% berturut-turut adalah $17,64 \pm 2,10$ %; $16,99 \pm 2,49$ % dan $7,73 \pm 4,95$ %. Dari uji one way ANOVA didapatkan nilai $p < 0,01$ dan uji *post hoc tukey* didapatkan nilai $p < 0,01$. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode UHPLC-MS/MS yang dilakukan telah memenuhi parameter validitas yang baik dan berbagai perbandingan konsentrasi etanol yang digunakan berpengaruh terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak.

Kata Kunci: Kurkumin, etanol, UHPLC-MS/MS, validasi metode, maserasi

ABSTRACT

Maysaroh, Intan. 2018. *Method Validation and Determination of Curcumin Content in Turmeric (*Curcuma longa*) Ethanolic Extract with Different Solvent Concentration using Ultra High Performance Liquid Chromatography Double Mass Spectroscopy (UHPLC-MS/MS)*. Final Assignment, Pharmacy Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Bachtiar Rifai Pratita Ihsan, S.Farm., M.Farm., Apt. (2) Ika Putri Nurhayati, S.Farm., Apt., M.Sc.

Turmeric (*Curcuma longa*) is a plant widely consumed by people to treat some diseases. Curcumin is the major compound in turmeric and perform some pharmacological activities. The aim of this study is to understand the influence of different ethanol concentration towards curcumin content in the turmeric extract. Maceration of turmeric was done using three different ethanol concentration which is 96%; 80% and 70%. The extract obtained from maceration was analyzed using UHPLC-MS/MS instrument triple quadropole (QqQ) system and operated under targetted Selected Reaction Monitoring (SRM) which targetted at 285 m/z for quantifier and 177 m/z for qualifier. UHPLC MS/MS separation was performed on a C18 column using isocratic elution of 0,1% formic acid in aquabidest and 0,1% formic acid in acetonitrile. The parameter of method validation analyzed in this research were selectivity, linierity, accuration, presicion and LOD LOQ. The peaks of curcumin in the curcumin standard solution, turmeric ethanolic extract 96%; 80% and 70% occured at 3,195; 3,202; 3,220 and 3,214 min respectively. The curcumin content and peak area was linier at the concentration rate 0,25 - 4 ppm ($r^2 = 0,999$). %Recovery of this analysis was in between 97,54%-106,38% and %RSD of this analysis was in between 1,09%-4,37%. The value of LOD and LOQ in this analysis was 0,03 and 0,08 ppm respectively. The result of curcumin content measurement in sample ethanol extract 96%; 80%; and 70% are $17,64 \pm 2,10$ %; $16,99 \pm 2,49$ % and $7,73 \pm 4,95$ % respectively. The result of one way ANOVA analysis is $p < 0,01$ and the result of pst hoc Tukey is $p < 0,01$. Thus, UHPLC-MS/MS method for determination of curcumin in turmeric extract was valid and the ethanol concentration of maceration solvent have an influence to curcumin content in the extract.

Keywords: Curcumin, ethanol, UHPLC-MS/MS, method validation, maceration

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Sebagian besar masyarakat memilih penggunaan obat herbal untuk terapi berbagai macam penyakit daripada penggunaan obat konvensional. Estimasi prevalensi dari penggunaan obat herbal pada masyarakat Amerika Serikat berkisar antara 3% (studi survei telepon dari 1539 responden) sampai 93% (studi Kaiser dari 100 responden) (Winslow & Kroll, 1998). Penggunaan obat herbal sebagai pengobatan di Indonesia juga cukup tinggi. Data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013, menunjukkan bahwa 30,4% rumah tangga di Indonesia memanfaatkan pelayanan kesehatan tradisional, diantaranya 77,8% rumah tangga memanfaatkan jenis pelayanan kesehatan tradisional keterampilan tanpa alat, dan 49,0% rumah tangga memanfaatkan ramuan (Aditama, 2014).

Sebagian produk obat tradisional mengandung kunyit. Kunyit merupakan tanaman herbal yang banyak dimanfaatkan untuk mengobati beberapa penyakit di masyarakat. Kunyit dimanfaatkan sebagai pengobatan beberapa penyakit, seperti dispepsia, penyakit rematik (*rheumatoid arthritis*), tukak lambung, epilepsi, asma, batuk, sakit kepala, gangguan hepar, dan lain-lain (World Health Organization, 1999). Senyawa yang terkandung dalam kunyit dan berperan dalam aktivitas farmakologi tersebut adalah kurkumin (Priyadarsini, 2014).

Ekstraksi merupakan teknik pemisahan zat atau senyawa yang terkandung di jaringan tanaman atau hewan menggunakan pelarut yang terpilih melalui sebuah prosedur standar. Beberapa teknik ekstraksi memisahkan metabolit yang larut dalam pelarut tertentu dengan metabolit yang tidak larut dalam pelarut. Ekstrak yang didapatkan kemudian dapat diolah menjadi sediaan obat dalam bentuk tinktur atau cairan ekstrak dan dapat diproses lebih lanjut ke bentuk sediaan obat yang lain seperti tablet dan kapsul (Singh, 2008).

Beberapa metode ekstraksi yang bisa dilakukan pada kunyit adalah maserasi, ekstraksi ultrasonik (sonikasi), perkolasi, ekstraksi soxhlet, distilasi uap dan ekstraksi asam-basa (Sarker & Nahar, 2012). Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi dengan pengulangan (remaserasi). Keunggulan metode maserasi dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya yaitu prosedurnya sederhana dan mudah dilakukan (Azwanida, 2015). Remaserasi lebih efisien dilakukan dibandingkan dengan maserasi tunggal, karena masih terdapat senyawa aktif yang tertinggal dengan jumlah yang cukup pada residu ekstrak (Singh, 2008).

Berbagai macam pelarut dapat digunakan dalam metode maserasi kunyit seperti air, aseton, metanol, etanol dan petroleum eter (Jansirani dkk., 2014). Pelarut maserasi yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol. Pemilihan pelarut didasarkan pada kelarutan kurkumin. Kurkumin bersifat mudah larut pada etanol (NCBI, 2018). Pemilihan pelarut etanol juga didasarkan pada data keamanan pelarut. Etanol memiliki data toksisitas yang lebih kecil dibandingkan dengan aseton dan petroleum eter (MSDS, 2013).

Penelitian maserasi kunyit dengan berbagai perbandingan konsentrasi pelarut etanol pernah dilakukan, dan hasilnya ekstrak etanol 96% memiliki kadar kurkumin yang lebih tinggi daripada ekstrak etanol 70% (Paulucci dkk., 2013). Namun demikian, terdapat sedikit penelitian mengenai maserasi kunyit dengan berbagai perbandingan konsentrasi pelarut etanol. Pada penelitian ini dilakukan maserasi kunyit dengan menggunakan 3 konsentrasi pelarut etanol yang berbeda, yaitu etanol 70%, etanol 80% dan etanol 96%. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan berbagai konsentrasi etanol pada proses maserasi terhadap kandungan kurkumin dalam ekstrak.

Senyawa marker dari kunyit adalah kurkumin (Priyadarsini, 2014). Syarat kandungan kurkuminoid dari ekstrak kental rimpang kunyit adalah tidak kurang dari 33,90% dihitung sebagai kurkumin (Menkes RI, 2009). Pengukuran kadar senyawa marker juga merupakan salah satu parameter spesifik standarisasi ekstrak (Depkes RI, 2000). Standarisasi ekstrak merupakan salah satu upaya dalam penjaminan mutu ekstrak. Konsentrasi kurkumin dari hasil ekstrak dapat diketahui dengan beberapa metode analisa, yaitu KLT Densitometer (Jansirani, dkk., 2014), Kromatografi Gas (Braga, dkk., 2003), Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Paulucci, dkk., 2013) dan Spektrofotometer UV (Anindya dkk., 2015)

Salah satu metode analisa untuk mendeteksi dan menghitung kadar kurkumin adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau biasa disebut dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Pada penelitian ini digunakan instrumen *Ultra High Performance Liquid Chromatography Double Mass Spectrophotometry* (UHPLC MS/MS) untuk analisis kadar kurkumin

dalam ekstrak kunyit. Metode analisa HPLC dipilih daripada metode analisa kromatografi yang lain karena bersifat efisien, sangat selektif, hanya memerlukan sampel berjumlah sedikit, dan dapat digunakan untuk analisa kuantitatif (Khopkar, 2014). Metode analisa UHPLC dipilih daripada metode HPLC karena metode UHPLC bersifat lebih sensitif, membutuhkan waktu yang lebih sedikit dalam analisis dan memerlukan jumlah pelarut fase gerak yang lebih sedikit (Piontek, dkk., 2013).

Beberapa penelitian analisis kurkumin secara HPLC yang pernah dilakukan antara lain menggunakan fase diam C18 dan beberapa fase gerak yang berbeda, yaitu asetonitril, asam asetat, dan akuabides (50:1:49) (Cahyono dkk., 2011), asetonitril 5% dan asam asetat (75:25) (Li dkk., 2009), asetonitril 0,1% dan asam trifluoroasetat (50:50) (Jadhav dkk., 2007), asetonitril 2% dan asam asetat (40:60) (Wichitnithad dkk., 2009), metanol dan air (70:30) (Chaucan dkk., 1998). Hal yang membedakan penelitian ini dengan penelitian sebelumnya terletak pada fase gerak yang digunakan. Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini adalah 0,1% asam format dalam aquabidest dan 0,1% asam format dalam asetonitril. Pemilihan fase gerak didasarkan pada pelarut fase gerak yang umum digunakan dalam kondisi operasi HPLC fase terbalik. Pada umumnya, dalam operasi HPLC fase terbalik, digunakan 2 macam campuran pelarut yaitu pelarut A dan pelarut B. Pelarut A adalah pelarut air (*aqueous solvent*) dan pelarut B adalah pelarut organik. Asam format digunakan untuk memperbaiki dari bentuk puncak kromatogram yang muncul dan untuk memberikan sumber proton pada kondisi operasi UHPLC MS/MS (Guzzeta, 2001).

Berdasarkan uraian di atas, pada penelitian ini dilakukan validasi metode UHPLC MS/MS untuk menetapkan kadar kurkumin pada ekstrak kunyit dari berbagai perbandingan konsentrasi pelarut etanol metode maserasi. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan informasi ilmiah mengenai pengaruh konsentrasi pelarut etanol metode maserasi kunyit terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak dan prosedur penetapan analisa kurkumin dalam ekstrak kunyit dengan metode UHPLC MS/MS yang tervalidasi.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

- 1) Apakah metode UHPLC MS/MS dalam analisa kurkumin pada ekstrak etanol kunyit menggunakan fase diam C18 dan fase gerak 0,1% asam format dalam aquabidest dan 0,1% asam format dalam asetonitril memenuhi persyaratan parameter validitas?
- 2) Apakah terdapat variasi dari penggunaan perbedaan konsentrasi pelarut etanol dalam maserasi kunyit terhadap perbedaan kadar kurkumin dalam ekstrak?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

- 1) Untuk mengetahui validitas metode UHPLC MS/MS dalam analisa kurkumin pada ekstrak etanol kunyit menggunakan fase diam C18 dan fase gerak 0,1% asam format dalam aquabidest dan 0,1% asam format dalam asetonitril

2) Untuk mengetahui pengaruh penggunaan perbedaan konsentrasi pelarut etanol dalam maserasi kunyit terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak.

1.3.2 Tujuan Khusus

1) Untuk mengukur kadar kurkumin pada ekstrak kunyit secara UHPLC MS/MS menggunakan fase diam C18 dan fase gerak 0,1% asam format dalam aquabidest dan 0,1% asam format dalam asetonitril.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan informasi ilmiah mengenai validasi metode UHPLC MS/MS dalam analisa kurkumin pada ekstrak etanol kunyit menggunakan fase diam C18 dan fase gerak 0,1% asam format dalam aquabidest dan 0,1% asam format dalam asetonitril dan pengaruh penggunaan perbedaan konsentrasi pelarut etanol dalam maserasi kunyit terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai prosedur penetapan analisa kurkumin dalam ekstrak kunyit dengan metode UHPLC MS/MS yang tervalidasi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kunyit

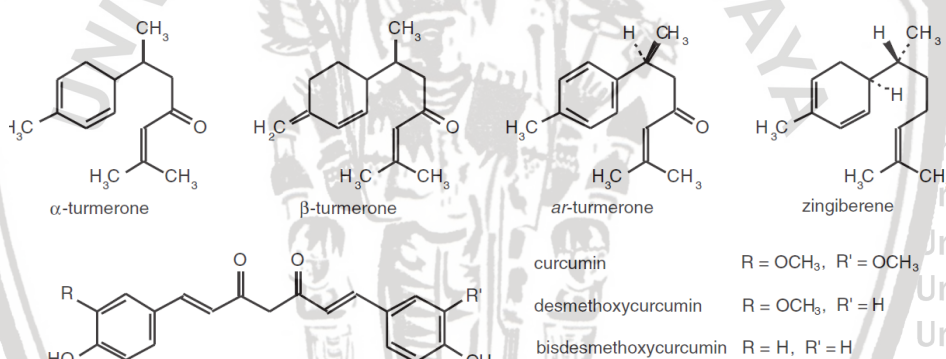
Tumbuhan kunyit merupakan tanaman *herbaceous* (batang lunak dan berair), dengan tinggi berkisar 60-90 cm yang memiliki batang pendek dan daun yang berumbai. Tanaman kunyit memiliki bunga berwarna kuning dengan panjang antara 10-15 cm. Tanaman kunyit tidak memiliki buah.

Rhizoma dari tanaman ini (biasa disebut kunyit) memiliki kulit yang kasar dan bersegmen. Warna dari rhizoma kunyit adalah coklat kekuningan dan berwarna oranye pada bagian dalam. Warna serbuk dari kunyit adalah kuning cerah. Panjang dari rhizoma kurkumin adalah 2,5 hingga 7 cm dengan diameter 2,5 cm (Lal, 2012). Berikut merupakan deskripsi taksonomi kunyit atau *Curcuma longa*.

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Subkelas : Zingiberidae
Ordo : Zingiberales
Famili : Zingiberaceae
Genus : *Curcuma*
Spesies : *Longa*

Nama latin : *Curcuma longa*

Sifat organoleptis dari kunyit adalah bau khas aromatis, memiliki rasa pahit dan sedikit aromatis. Kunyit mengandung minyak atsiri kurang dari 4% dan kurkuminoid tidak kurang dari 3%. Konstituen utama dari kunyit adalah minyak atsiri yang terdiri dari monoterpen dan sesquiterpene seperti *zingiberene*, *curcumene*, α - dan β -*turmerone*. Senyawa kurkuminoid memberikan warna pada kunyit, kurkuminoid pada kunyit terdiri dari kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin (*World Health Organization*, 1999).

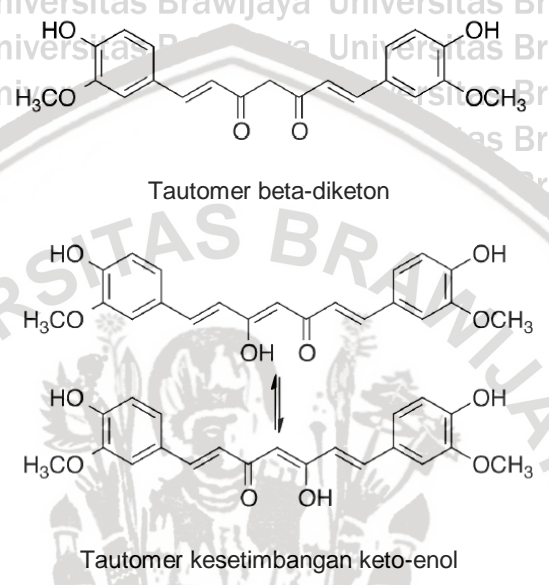


Gambar 2.1 Kandungan Senyawa pada Kunyit (*World Health Organization*, 1999)

2.2 Kurkumin

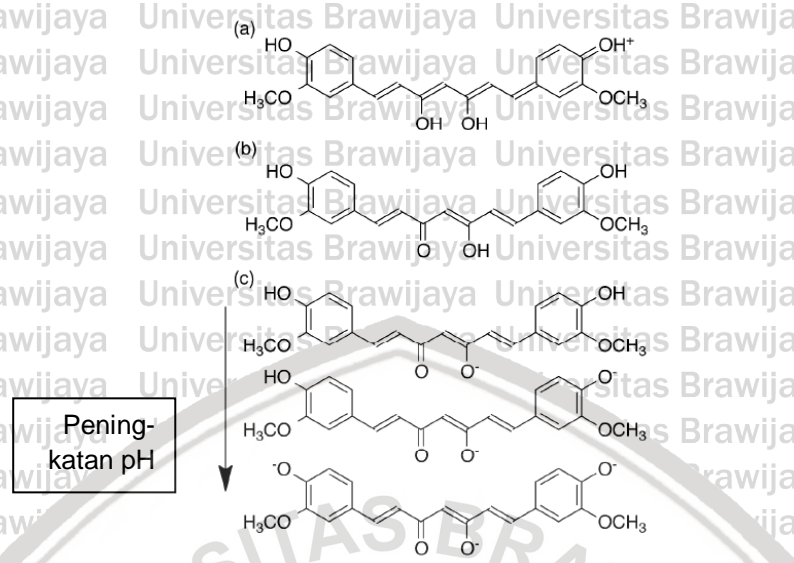
Kurkumin merupakan senyawa hidrofobik polifenol. Nama struktur kimia kurkumin adalah 1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion. Kurkumin berwarna kuning-keemasan pada fase solid, memiliki berat molekul 368 g/mol dan memiliki titik lebur 183° C. Kurkumin memiliki 2 bentuk tautomer yang berbeda. Pada cincin aromatis kurkumin, terdapat gugus metoksi dan gugus hidroksi dengan posisi ortho. Kedua cincin aromatis pada

kurkumin dihubungkan oleh 7 atom karbon yang mengandung gugus karbonil α dan β . Struktur ini dinamakan beta-diketon yang selanjutnya struktur ini akan berubah bentuk menjadi tautomer keto-enol yang merupakan struktur dari kurkumin (Salem dkk., 2014).



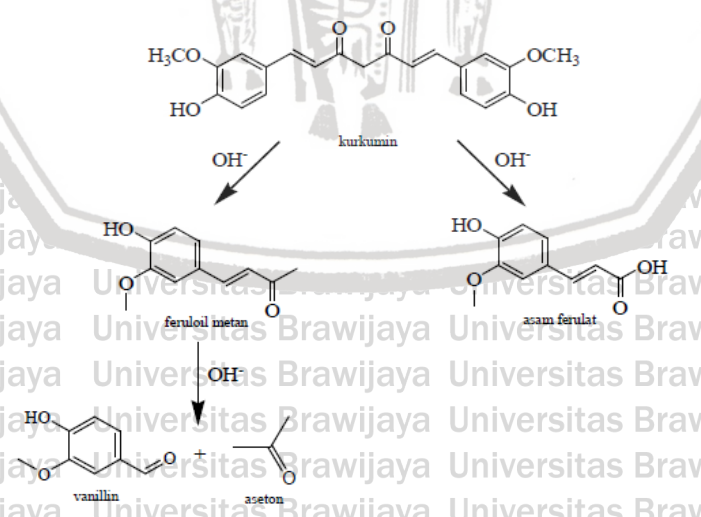
Gambar 2.2 Bentuk Tautomer dari Kurkumin (Salem dkk., 2014)

Salah satu faktor yang mempengaruhi sifat kurkumin adalah pH. Pada pH kurang dari 1, kurkumin mengalami protonasi. Ketika pH meningkat, kurkumin mengalami deprotonasi. Kurkumin mengalami deprotonasi pada kondisi basa, sehingga kelarutan kurkumin pada kondisi basa meningkat, sementara itu kurkumin tidak larut pada kondisi asam dan pH netral (Salem dkk., 2014).



Gambar 2.3 Struktur Kurkumin pada Kondisi (a) Asam, (b) Netral, dan (c) Basa (Salem dkk., 2014)

Kurkumin mengalami degradasi pada kondisi basa. Berdasarkan penelitian yang ada, produk degradasi dari kurkumin terbentuk pada pH 8,5 yang disimpan selama 5 menit dan 28 jam. Degradasi kurkumin pada kondisi basa menghasilkan senyawa asam ferulat dan feruloiil metan (Tonnesen dan Karlsen, 1985).



Gambar 2.4 Proses Degradasi Kurkumin Kondisi Basa (Tonnesen dan Karlsen, 1985)

Stabilitas kurkumin selain dipengaruhi oleh pH juga dipengaruhi oleh cahaya. Kurkumin sangat sensitif terhadap cahaya. Uji degradasi fotolitik pada kurkumin, menghasilkan beberapa produk senyawa yaitu p-hidroksibenzaldehida, asam vanilat, vanilin dan asam ferulat. Produk degradasi yang dihasilkan dapat berbeda, tergantung pada waktu paparan cahaya yang diberikan (Salem dkk., 2014)

Kurkumin sukar larut dalam air. Kelarutan kurkumin dalam air adalah 3,12 mg/L pada suhu 25° C. Kurkumin sukar larut eter, mudah larut alkohol dan asam asetat glasial, sangat mudah larut pada etanol dan asam asetat (NCBI, 2018). Secara spektrofotometri, kurkumin memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 430 nm dalam pelarut metanol dan pada 415 nm hingga 420 nm dalam pelarut aseton. Kurkumin akan berfluoresensi pada panjang gelombang 524 nm dalam pelarut asetonitril, 549 nm dalam pelarut etanol dan 557 nm pada larutan misel (Chignell dkk., 1994).

2.3 Metode Maserasi

2.3.1 Prosedur umum

Prosedur umum dari maserasi pada skala laboratorium adalah menempatkan bahan tanaman yang telah disiapkan pada wadah yang tertutup dengan menambahkan pelarut tertentu atau disebut juga dengan *menstruum*. Penggunaan wadah tertutup ini berfungsi untuk mencegah penguapan dari pelarut yang ada. Proses ini dilakukan selama 7 hari dengan diberikan guncangan/gerakan tertentu pada waktu tertentu. Cairan yang ada kemudian disaring dan

residunya yang berbentuk solid (disebut dengan *marc*) diberi tekanan untuk memperoleh cairan sebanyak mungkin (Singh, 2008).

Proses difusi pelarut / *menstruum* ke dalam dinding sel tanaman untuk melarutkan konstituen dan untuk mengeluarkan konstituen tersebut keluar dinding sel membutuhkan waktu yang lama. Oleh karena itu, proses maserasi yang menggunakan bahan tanaman membutuhkan waktu yang lama. Proses pemberian guncangan/gerakan pada wadah dapat membantu proses difusi pelarut dan dapat mencegah terakumulasinya konstituen pada satu area pelarut tertentu sehingga dapat memberikan kesempatan bagi pelarut yang lain untuk berdifusi ke dalam dinding sel tumbuhan tersebut (Singh, 2008).

2.3.2 Proses Maserasi untuk *organized* dan *unorganized crude drugs*

Organized crude drugs adalah bahan ekstraksi yang memiliki struktur seluler (contoh: batang tanaman, rhizoma), sedangkan *unorgaized crude drugs* adalah bahan ekstraksi yang memiliki struktur non seluler (contoh: gum, resin) (Singh, 2008). Perbedaan proses maserasi dari kedua bahan tersebut dapat dilihat pada tabel

2.1.

Tabel 2.1 Perbedaan Proses Maserasi untuk Bahan *Organized* dan *Unorganized Crude Drugs* (Singh, 2008).

<i>Organized Crude Drugs</i>	<i>Unorganized crude drugs</i>
Bahan ditambahkan keseluruhan volume dari <i>menstruum</i>	Bahan ditambahkan 4 hingga 5 bagian dari <i>menstruum</i>
Goncangan/gerakan diberikan setiap hari dalam 7 hari	Goncangan diberikan 2 kali sehari, atau sesuai yang telah ditentukan
Cairan disaring, <i>marc</i> diberi tekanan	Cairan dipisahkan dengan <i>marc</i> dengan cara dituang ke wadah lain. <i>Marc</i> tidak diberi tekanan
Cairan hasil penyaringan dicampur dengan cairan hasil penekanan <i>marc</i>	Cairan disaring dan ditambahkan <i>menstruum</i> yang tersisa (5 hingga 6 bagian) melalui penyaring

Pada proses maserasi *organized drugs*, dilakukan penekanan pada marc karena terdapat banyak cairan yang menempal pada marc. Pada proses maserasi *unorganized drugs*, tidak dilakukan penekanan pada marc karena marc yang tersisa berbentuk getah atau menyerupai lumpur (Singh, 2008).

2.4 Standarisasi Ekstrak

2.4.1 Definisi

Standarisasi dalam kefarmasian tidak lain adalah serangkaian parameter, prosedur dan cara pengukuran yang hasilnya merupakan unsur-unsur terkait paradigma mutu kefarmasian, mutu dalam artian memenuhi syarat standar (kimia, biologi dan farmasi), termasuk jaminan (batas-batas) stabilitas sebagai produk kefarmasian umumnya. Pengertian standarisasi juga berarti proses menjamin bahwa produk akhir (obat, ekstrak atau produk ekstrak) mempunyai nilai parameter tertentu yang konstan dan ditetapkan (dirancang dalam formula) terlebih dahulu (Depkes RI, 2000).

Terpenuhinya standar mutu produk/bahan ekstrak tidak terlepas dari pengendalian proses. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2014). Persyaratan mutu ekstrak terdiri dari berbagai parameter standar umum dan parameter standar

spesifik. Pengujian atau pemeriksaan persyaratan parameter standar umum ekstrak harus dilakukan dengan berpegang pada manajemen pengendalian mutu eksternal oleh badan formal atau/dan badan independen (Depkes RI, 2000).

2.4.2 Faktor yang Berpengaruh pada Mutu Ekstrak

Menurut Depkes RI (2000) disebutkan bahwa faktor yang berpengaruh pada mutu ekstrak adalah sebagai berikut.

2.4.2.1 Faktor Biologi

Faktor biologi yang mempengaruhi mutu ekstrak meliputi beberapa hal, antara lain sebagai berikut.

- Identitas jenis (*species*). Jenis tumbuhan dari sudut keragaman hayati dapat dikonfirmasi sampai informasi genetik sebagai faktor internal untuk validasi jenis (*species*).
- Lokasi tumbuhan asal. Lokasi berarti faktor eksternal, yaitu lingkungan (tanah dan atmosfer) dimana tumbuhan berinteraksi, energi (cuaca, temperatur, cahaya), dan materi (air, senyawa organik dan anorganik).
- Periode pemanenan hasil tumbuhan. Faktor ini merupakan dimensi waktu dari proses kehidupan tumbuhan terutama proses metabolisme tanaman yang menentukan kadar senyawa kandungan.
- Penyimpanan bahan tumbuhan. Faktor ini merupakan faktor eksternal yang dapat berpengaruh terhadap

stabilitas bahan serta adanya kontaminasi (biotik dan antibiotik).

- Umur tumbuhan dan bagian yang digunakan.

2.4.2.2 Faktor Kimia

Faktor kimia yang mempengaruhi mutu ekstrak meliputi beberapa hal, antara lain sebagai berikut.

1) Faktor internal

- Jenis senyawa aktif dalam bahan
- Komposisi kualitatif senyawa aktif
- Komposisi kuantitatif senyawa aktif
- Kadar total rata-rata senyawa aktif

2) Faktor eksternal

- Metode ekstraksi
- Perbandingan ukuran alat ekstraksi (diameter dan tinggi alat)
- Ukuran, kekerasan dan kekeringan bahan
- Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi
- Kandungan logam berat
- Kandungan pestisida

Menurut Depkes RI (2000) disebutkan bahwa senyawa kimia dalam ekstrak ditinjau dari asalnya dapat dibedakan menjadi 4 kelompok, yaitu:

- Senyawa kandungan asli tumbuhan asal.

Senyawa asli adalah senyawa yang terkandung dalam tanaman sejak masa tanaman tersebut hidup. Jika proses

preparasi simplisia dan ekstraksi dijamin tidak menyebabkan perubahan kimia, maka hasil analisis kimia terhadap ekstrak mencerminkan komposisi senyawa kandungan asli.

- Senyawa hasil perubahan dari senyawa asli.
- Senyawa kontaminasi, baik sebagai polutif atau aditif proses.

Senyawa kontaminasi merupakan senyawa eksogen yang tercampur pada ekstrak, baik polusi yang tidak terhindari atau residu suatu proses.

- Senyawa hasil interaksi kontaminasi dengan senyawa asli atau senyawa perubahan.

2.4.3 Parameter Uji Ekstrak

Menurut Depkes RI (2000) dalam dalam buku parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat disebutkan bahwa parameter uji ekstrak adalah sebagai berikut.

2.4.3.1 Parameter Non Spesifik

Parameter non spesifik terdiri dari susut pengeringan, bobot jenis, kadar air, kadar abu, sisa pelarut, residu pestisida, cemaran logam berat, dan cemaran mikroba.

2.4.3.2 Parameter Spesifik

Parameter spesifik terdiri dari sebagai berikut.

- Identitas, meliputi deskripsi tata nama yaitu nama ekstrak (generik, dagang, paten), nama latin tumbuhan (sistematika botani), bagian tumbuhan yang digunakan

(rimpang, daun, dan sebagainya), dan nama Indonesia tumbuhan.

- Organoleptik, meliputi bentuk, warna, bau dan rasa.
- Senyawa terlarut dalam pelarut tertentu

2.5 High Performance Liquid Chromatography

2.5.1 Definisi

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan yang menggunakan fase diam dan fase gerak (Sudjaji, 2007). Dalam kromatografi, komponen-komponen senyawa terdistribusi dalam dua fase, yaitu dalam fase gerak dan dalam fase diam. Laju perpindahan suatu molekul zat terlarut tertentu di dalam kolom (fase diam) berhubungan dengan interaksi antara molekul tersebut dengan fase diam dan fase gerak. Jika ada perbedaan interaksi, maka masing-masing komponen akan bergerak sepanjang kolom bergantung pada karakteristik interaksi tersebut (Khopkar, 2014).

Berdasarkan pada mekanisme pemisahannya, kromatografi dibedakan menjadi beberapa tipe yaitu kromatografi partisi atau kromatografi cair-cair, kromatografi adsorpsi atau kromatografi padat-cair, kromatografi pasangan ion, kromatografi eksklusi ukuran, kromatografi afinitas, dan kromatografi kiral (Skoog dkk., 2004). Berdasarkan pada alat yang digunakan, kromatografi dapat dibedakan menjadi beberapa tipe yaitu kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan kromatografi gas (Sudjaji, 2007).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau biasa disebut dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dikembangkan

pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Kegunaan Umum

HPLC adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik

atau senyawa biologis, analisis senyawa tidak mudah menguap,

analisis ketidakhayuan, isolasi dan pemurnian senyawa, dan lain-lain.

HPLC merupakan metode yang dapat digunakan untuk analisa

kualitatif dan kuantitatif (Sudjaji, 2007).

2.5.2 Instrumentasi

Pada HPLC, analit dipisahkan berdasarkan perbedaan afinitas

antara komponen senyawa dengan fase diam dan fase gerak.

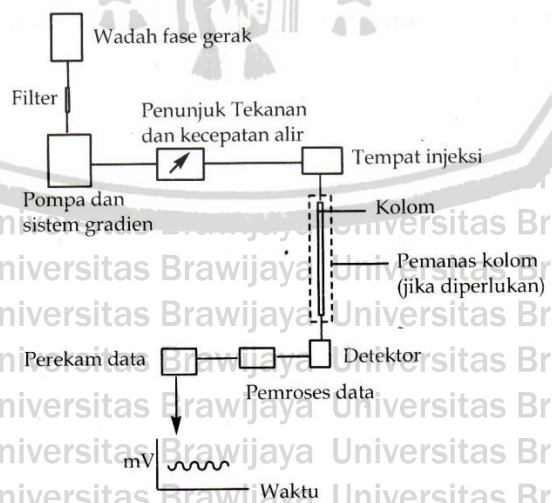
Instrumentasi pada HPLC umumnya terdiri atas wadah fase gerak,

sistem penghantaran fase gerak, tempat untuk penyuntikan sampel,

kolom atau fase diam, detektor, wadah penampung buangan fase

gerak, tabung penghubung dan komputer atau perekam data (Sudjaji,

2007).



Gambar 2.5 Skema Instrumen HPLC (Sudjaji, 2007)

2.5.2.1 Fase Gerak

Fase gerak pada umumnya merupakan campuran pelarut yang dapat bercampur secara keseluruhan dan berperan dalam daya elusi. Daya elusi ini ditentukan oleh polaritas dari fase gerak, fase diam, dan komponen-komponen senyawa dalam sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar daripada fase gerak) kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut, sedangkan untuk fase terbalik (fase gerak lebih polar daripada fase diam) kemampuan elusi akan menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut (Sudjaji, 2007).

Terdapat beberapa syarat pelarut yang dapat digunakan untuk fase gerak HPLC. Pertama, pelarut harus tidak memiliki respon terhadap dektektor. Adanya respon terhadap detektor dapat mempengaruhi hasil pembacaan detektor. Kedua, pelarut harus mempunyai kemurnian yang cukup. Ketiga, pelarut harus mempunyai viskositas yang rendah. Jika pelarut memiliki viskositas tinggi, maka tekanan yang dibutuhkan juga lebih tinggi. Keempat, pelarut yang digunakan sebaiknya nonreaktif, tidak bereaksi secara spesifik dengan fase diam yang ada, yang menyebabkan perubahan pada fase diam (Hansen dkk., 2012).

Pada instrumen HPLC saat ini dilengkapi dengan satu atau lebih wadah fase gerak, tiap wadah dapat menampung 500 ml atau lebih pelarut. Wadah fase gerak harus bersih dan

inert. Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan *degassing* (penghilangan gas), karena gas yang terkumpul dapat mengacaukan analisis (Sudjaji, 2007). *Degasser* terdiri dari sistem pompa, sistem distilasi dan alat pemanas dan pengaduk (Skoog dkk., 2004).

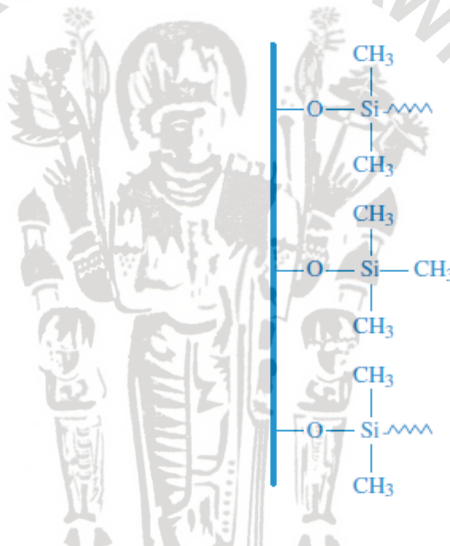
Elusi dapat digunakan dengan 2 cara. Pertama, menggunakan satu solven atau campuran solven dengan komposisi yang tetap selama elusi. Cara ini disebut dengan elusi isokratrik. Kedua, menggunakan dua atau lebih solven, dengan komposisi yang berubah-ubah selama elusi. Cara ini disebut dengan elusi gradien (Skoog dkk., 2004).

2.5.2.2 Fase Diam

Kolom HPLC biasanya terbuat dari silinder *stainless steel* atau silinder *Tygon*. Panjang kolom umumnya berkisar antara 10 sampai 30 cm dengan diameter 2 hingga 5 mm. Kolom berisi partikel dengan ukuran antara 3 hingga 10 mikrometer. Partikel dalam kolom kromatografi atau fase diam yang sering digunakan adalah partikel silika. Partikel tersebut akan terlapis dengan lapisan tipis organik yang secara fisik dan kimia akan berikatan dengan permukaan silinder. Bahan lain yang digunakan adalah partikel alumina, partikel polimer berpori, dan resin penganti ion (Skoog dkk., 2004).

Partikel silika mempunyai permukaan gugus silanol atau SiOH. Gugus silanol merupakan gugus polar. Pada gugus hidroksi tersebut dapat direaksikan dengan senyawa

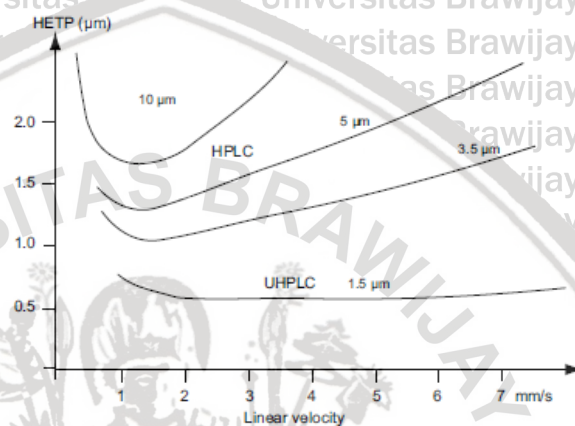
lain. Misalkan, reaksi antara silanol dengan monoklorosilen $R(CH_3)_2SiCl$ ($R = CH_3(CH_2)_{16}CH_2-$), akan menghasilkan kolom yang disebut dengan silika C_{18} atau oktadesil silika (ODS). Proses ini disebut *capping*. Namun, proses reaksi ini biasanya tidak dilakukan pada semua gugus silanol, karena sulit untuk melakukan *capping* lebih dari 30% gugus silanol. Gugus silanol yang tak bereaksi dapat dilakukan *endcapping*, yaitu mengganti gugus R dengan gugus yang lebih pendek (Christian dkk., 2014).



Gambar 2.6 Gambar gugus Silanol (atas dan bawah) yang dilakukan proses *capping*, gugus silanol (tengah) yang dilakukan proses *endcapping*. Garis tebal menunjukkan permukaan silika (Christian dkk., 2014)

Kolom harus memiliki nilai *theoretical plate* (N) yang tinggi. Tingginya nilai N menunjukkan efisiensi kolom juga tinggi. Nilai ini bergantung pada ukuran partikel pada kolom. Penurunan ukuran partikel memberikan nilai *theoretical plate* yang lebih tinggi. Hal ini diilustrasikan oleh gambar 2.7. Pada gambar tersebut ditunjukkan bahwa semakin tinggi ukuran

partikel, maka akan semakin tinggi pula nilai *height equivalent theoretical plate* (HETP). Nilai HETP ini berbanding terbalik dengan nilai N , sehingga semakin tinggi ukuran partikel, maka nilai HETP semakin tinggi dan nilai N akan semakin rendah (Hansen dkk., 2012).



Gambar 2.7 Grafik Nilai HETP pada Beberapa Ukuran Partikel (Hansen dkk., 2012)

2.5.2.3 Detektor

Detektor HPLC berfungsi untuk memberikan respon terhadap analit yang diubah menjadi sinyal elektrik. Respon yang ada harus proporsional dengan konsentrasi substansi yang ada di fase gerak, sehingga analisa kuantitatif dapat dilakukan berdasarkan perhitungan area *peak* atau tinggi *peak*. Detektor dapat dibedakan menjadi 2 tipe yaitu tipe detektor universal (mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat selektif, tidak bersifat spesifik) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa dan tipe detektor spesifik (hanya mendeteksi analit secara spesifik dan selektif)

seperti detektor UV-vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia (Hansen dkk., 2012).

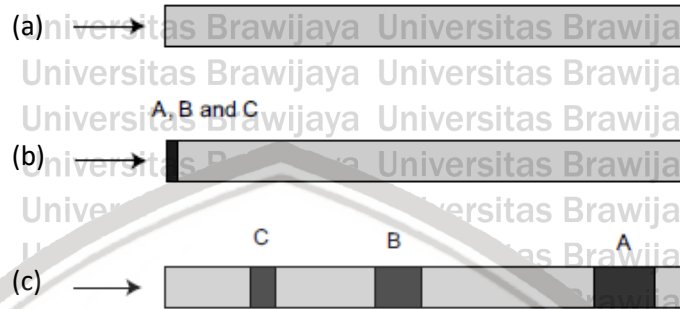
Menurut Sudjaji (2007) karakteristik dari suatu detektor HPLC yang ideal adalah sebagai berikut:

- mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduisibel,
- mempunyai sensitivitas tinggi, mampu mendeteksi analit pada kadar yang kecil,
- stabil dalam pengoperasian,
- signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran luas, dan
- tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak.

2.5.3 Pemisahan puncak pada Kromatografi

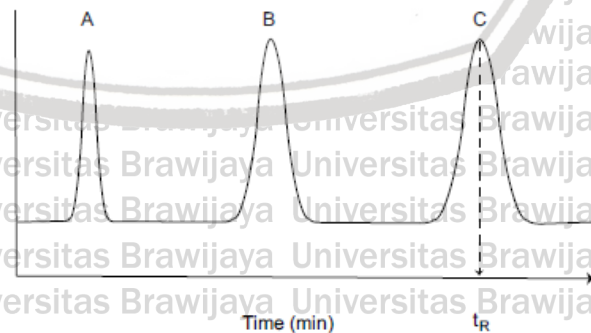
Pada kromatografi, pemisahan komponen analit didasarkan interaksi analit dengan fase diam dan fase gerak. Sebagai contoh, pada gambar 2.9 diilustrasikan pemisahan analit yang mengandung komponen senyawa A, senyawa B, dan senyawa C. Pada contoh tersebut, senyawa A memiliki kecepatan migrasi yang sama dengan fase gerak. Senyawa B tertahan oleh fase diam, sehingga kecepatan migrasinya lebih rendah daripada senyawa A. Senyawa C tertahan lebih lama dibandingkan senyawa B, sehingga memiliki kecepatan migrasi terendah diantara 3 senyawa tersebut. Ketika perbedaan retensi atau tahanan fase diam pada senyawa itu besar, maka

senyawa akan terelusi dari kolom pada waktu yang berbeda dan senyawa terelusi secara terpisah (Hansen dkk., 2012).



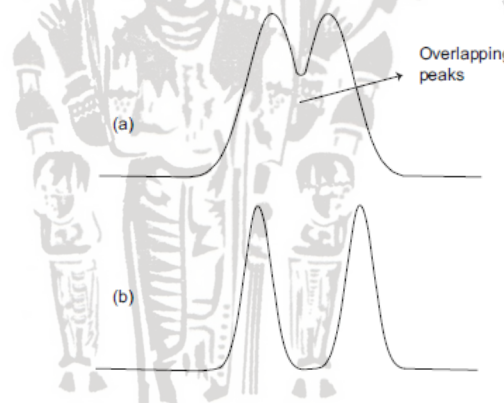
Gambar 2.8 Pemisahan Kromatogram Senyawa A, B, dan C, (a) Fase Gerak Dipompa ke dalam Kolom, (b) Sampel Diinjeksikan, (c) Senyawa Analit Melewati kolom dan Terpisah (Hansen dkk., 2012)

Respon detektor terhadap senyawa yang terelusi dari kolom akan direkam dan *output* data akan disajikan dalam bentuk kromatogram. Dari contoh sebelumnya, urutan migrasi senyawa dari yang tercepat adalah senyawa A, senyawa B, kemudian senyawa C. Pada gambar 2.10 dapat dilihat bahwa kromatogram disajikan sesuai dengan urutan migrasi senyawa dari yang tercepat. Waktu yang dibutuhkan oleh senyawa mulai dari sampel diinjeksikan hingga mencapai detektor disebut waktu retensi (t_R) (Hansen dkk., 2012).



Gambar 2.9 Kromatogram dari Sampel yang Mengandung Senyawa a, b, dan c (hansen dkk., 2012)

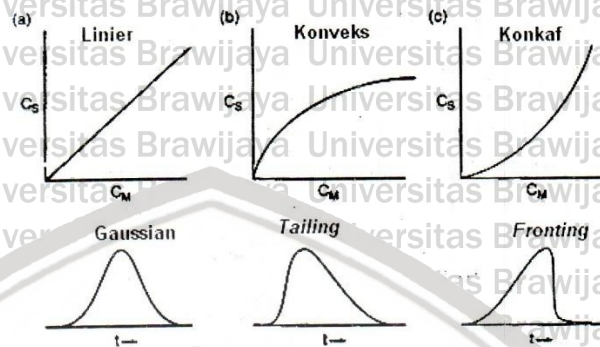
Meskipun senyawa pada sampel terelusi dari kolom dan mempunyai waktu retensi yang berbeda, namun belum tentu senyawa-senyawa tersebut terpisah secara sempurna. Pemisahan 2 senyawa secara sempurna ditandai dengan respon detektor yang mencapai *baseline* di antara kedua puncak. Pada gambar 2.11 (a) pemisahan senyawa terjadi secara tidak sempurna karena puncak yang kedua mulai naik sebelum puncak pertama mencapai *baseline*. Karena saling bertumpang tindih, kedua puncak ini disebut *overlapping peak*. Pada gambar 2.11 (b) pemisahan senyawa terjadi secara sempurna karena puncak yang kedua mulai naik setelah puncak pertama telah mencapai *baseline* (Hansen dkk., 2012).



Gambar 2.10 Kromatogram (a) Dua *Overlapping Peak* (b) Dua Puncak yang Terpisah Sempurna (Hansen dkk., 2012)

Profil konsentrasi senyawa yang bermigrasi akan simetris jika rasio distribusi solut (D) konstan, sebagaimana ditunjukkan pada gambar 2.12 (a) yang merupakan plot konsentrasi senyawa dalam fase diam (C_s) terhadap konsentrasi senyawa pada fase gerak (C_m) yang linear. Kurva ini, dapat berubah bentuk menjadi 2 puncak asimetris yaitu puncak yang berekor (*tailing*) dan adanya puncak

pendahulu (*fronting*) jika ada perubahan rasio distribusi senyawa (Sudjaji, 2007).



Gambar 2.11 Macam Profil Puncak yang Dihasilkan (a) Linier, (b) Tailing, dan (c) Fronting (Sudjaji, 2007)

Adanya *tailing* dan *fronting* tidak dikehendaki, karena dapat menyebabkan pemisahan yang kurang baik dan data retensi kurang reproduisibel. Menurut Sudjaji (2007) adanya puncak asimetri disebabkan oleh hal-hal berikut:

- ukuran sampel yang dianalisis terlalu besar sehingga fase gerak tidak mampu membawa senyawa dengan sempurna,
- interaksi yang kuat antara senyawa dengan fase diam dapat menyebabkan senyawa sukar terelusi sehingga dapat menyebabkan terbentuknya puncak yang mengekor, dan
- adanya kontaminan dalam sampel yang dapat muncul terlebih dahulu sehingga menimbulkan puncak mendahului.

2.5.4 Ultra High Performance Liquid Chromatography Double Mass

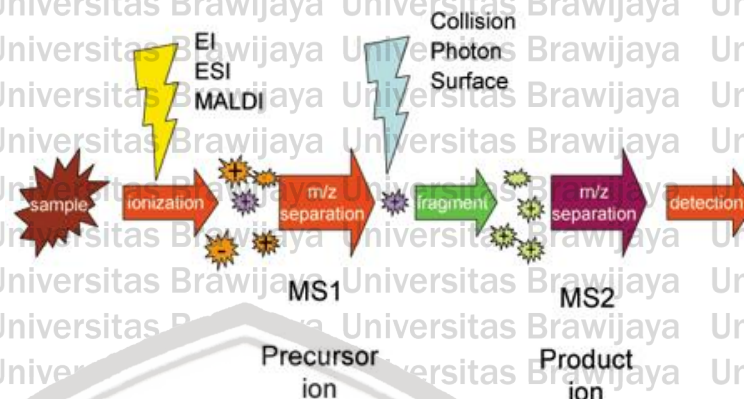
Spectrophotometry (UHPLC-MS/MS)

HPLC adalah salah satu teknik analisis yang banyak digunakan dalam bidang kimia analisis. Penggunaan HPLC memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan metode kromatografi

yang lain yaitu bersifat efisien, sangat selektif, hanya memerlukan sampel berjumlah sedikit, dan dapat digunakan untuk analisa kuantitatif (Khopkar, 2014). Pada saat ini, UHPLC banyak digunakan sebagai alternatif dari HPLC. Metode analisa UHPLC memiliki beberapa keunggulan daripada metode HPLC yaitu bersifat lebih sensitif, membutuhkan waktu yang lebih sedikit dalam analisis dan memerlukan jumlah pelarut fase gerak yang lebih sedikit (Piontek, dkk., 2013).

Terdapat beberapa detektor yang digunakan dalam teknik analisis HPLC atau UHPLC. Detektor yang biasa digunakan adalah detektor indeks bias, detektor spektrofotometri massa, detektor UV-vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia (Hansen dkk., 2012). Pada saat ini, UHPLC dengan detektor *double mass spectrophotometry* (MS/MS atau *tandem mass spectrophotometry*) banyak digunakan untuk berbagai keperluan analisis (McKenna, 2015).

MS/MS adalah detektor yang bekerja dengan cara memecah ion yang terpilih menjadi fragmen ion. Skema gambar 2.12 menunjukkan cara kerja dari MS/MS. Sampel akan diionisasi dengan menggunakan berbagai cara seperti *electrospray ionization* (ESI), *matrix laser desorption* (MALDI), *electron bombardment* (EI), dan lain-lain. Setelah itu, ion sampel dengan massa molekul tertentu akan diseleksi pada MS pertama dan akan di fragmentasi pada MS kedua (McKenna, 2015).



Gambar 2.12 Cara Kerja Detektor MS/MS (McKenna, 2015)

Strategi analisis data pada UHPLC MS/MS didesain dalam uji *targeted* dan *untargeted*. Uji *targeted* biasa dilakukan dalam analisis kuantitatif yang memerlukan deteksi senyawa yang lebih akurat dan sensitif. Uji *untargeted* biasa dilakukan dalam analisis kualitatif dengan tujuan untuk dapat mendeteksi dan mengidentifikasi senyawa-senyawa yang terkandung dalam sampel. Analisis senyawa tertarget biasanya menggunakan instrumen *low resolution tandem mass spectrophotometry* (LRMS/MS) seperti *triple quadropole* (QqQ) dan *quadropole/linier ion trap* (QLIT) yang keduanya dapat dioperasikan melalui metode *selected ion monitoring* (SIM) dan *selected reaction monitoring* (SRM). Analisis senyawa tidak tertarget biasanya menggunakan instrumen *high resolution tandem mass spectrophotometry* (HRMS/MS) seperti *quadropole time of flight* (QTOF) dan *quadropole/hybrid ion trap* (Eva, dkk., 2016).

2.6 Validasi Metode

Validasi dari prosedur analisis adalah proses yang dibangun melalui uji laboratorium untuk meyakinkan bahwa karakteristik hasil dari prosedur telah memenuhi syarat dari aplikasi analisis. Tipe karakteristik hasil analisis yang harus dipertimbangkan atau parameter pada validasi metode adalah akurasi (ketepatan), presisi (ketelitian), selektivitas, batas deteksi, batas kuantifikasi, linieritas, *range* (rentang), dan *robustness* (ketahanan) (*United States Pharmacopeia and National Formulary*, 2017).

Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi masalah analisis. Menurut Sudjaji (2007) suatu metode harus divalidasi ketika:

- metode baru dikembangkan untuk mengatasi masalah analisis tertentu,
- metode yang sudah baku diperbaiki untuk menyesuaikan dengan perkembangan yang ada,
- metode baku dilakukan di laboratorium berbeda, dikerjakan oleh analis berbeda, dan dilakukan oleh orang yang berbeda,
- penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah dan berkembang, dan
- untuk mendemonstrasikan kesetaraan antara 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku.

United States Pharmacopeia 40 and *National Formulary* 35 (USP 40-NF 35) menggolongkan pengujian menjadi 4 kategori. Parameter validasi metode yang harus dilakukan setiap kategori berbeda-beda. Pengujian kategori I ialah prosedur analisis untuk kuantifikasi dari bahan baku pada substansi obat serbuk atau senyawa aktif (termasuk bahan pengawet) pada

produk akhir sediaan farmasetika. Kategori tipe II adalah prosedur analisis untuk menentukan ketidakh murnian pada substansi obat serbuk atau degradasi senyawa pada produk akhir sediaan farmasetika. Prosedur ini meliputi uji kuantitatif dan *limit test*. Kategori III adalah prosedur analisis untuk menentukan karakteristik performa, misalkan disolusi, pelepasan obat, dan lain-lain. Kategori IV adalah tes identifikasi (*United States Pharmacopeia and National Formulary*, 2017). Parameter validasi metode yang harus dilakukan setiap kategori telah dicantumkan pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Parameter Analisis yang Diperlukan untuk Validasi (*United States Pharmacopeia and National Formulary*, 2017)

Parameter Validasi	Kategori I	Kategori II		Kategori III	Kategori IV
		Kuantitatif	<i>Limit test</i>		
Akurasi	Ya	Ya	*	*	Tidak
Presisi	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak
Selektivitas	Ya	Ya	Ya	*	Ya
Batas Deteksi	Tidak	Tidak	Ya	*	Tidak
Batas Kuantifikasi	Tidak	Ya	Tidak	*	Tidak
Linieritas	Ya	Ya	Tidak	*	Tidak
Rentang	Ya	Ya	*	*	Tidak

Keterangan : * Mungkin diperlukan, tergantung sifat pada uji tertentu

2.1.1 Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang ada pada sampel yang didalamnya terdapat komponen lain seperti pengotor, produk degradasi, dan komponen matriks. *International Conference on Harmonisation* (ICH) membagi selektivitas menjadi 3 kategori yaitu identifikasi, uji kemurnian dan assay (kandungan dan potensi). Untuk tujuan identifikasi, selektivitas dilakukan untuk memastikan identitas dari analit. Untuk tujuan uji kemurnian, selektivitas dilakukan untuk memastikan bahwa semua hasil prosedur

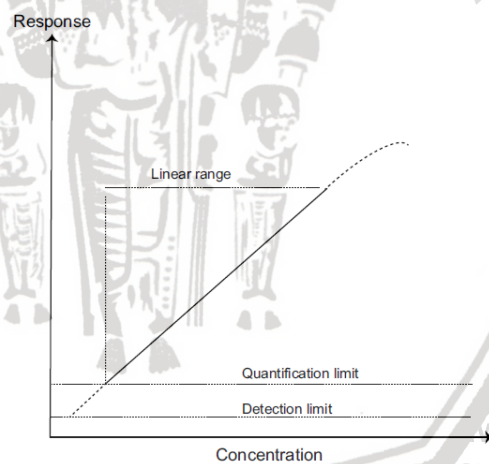
analisis memberikan pernyataan yang akurat mengenai kandungan pengotor pada analit seperti logam berat, kandungan sisa pelarut, dan lain-lain. Untuk uji assay, selektivitas dilakukan untuk memberikan hasil yang tepat dan memberikan pernyataan yang akurat pada kandungan dan potensi dari analit pada sampel tertentu (*International Conference on Harmonisation, 2005*).

Penentuan metode selektivitas dapat dilakukan dengan dua cara. Cara pertama adalah melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju dan terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain (untuk metode pemisahan atau kromatografi). Cara yang kedua adalah menggunakan detektor yang selektif. Contoh detektor elektrokimia dan detektor fluoresensi akan mendeteksi senyawa-senyawa tertentu. Penggunaan detektor UV pada panjang gelombang spesifik juga merupakan salah satu metode Selektivitas yang efektif (Sudjaji, 2007).

2.1.2 Linieritas dan Rentang

Linieritas adalah kemampuan memperoleh hasil uji yang proporsional terhadap konsentrasi dari analit pada sampel pada rentang yang diberikan. Rentang adalah interval antara konsentrasi tertinggi dan terendah dari analit suatu sampel untuk mendemonstrasikan bahwa suatu metode analisa memenuhi parameter linieritas, akurasi, dan presisi (*International Conference on Harmonisation, 2005*).

Linieritas dibangun melalui rentang dari metode analisa. Linieritas dievaluasi dengan pemeriksaan dari plot respon detektor dan konsentrasi yang ada. Respon detektor dapat berupa absorbansi pada analisa spektrofotometri dan dapat berupa luas area puncak atau tinggi puncak pada analisa kromatografi. Jika plot tersebut linier, hasil dari pengujian harus dievaluasi melalui metode statistik yang memadai, misalnya dengan perhitungan regresi (Hansen dkk., 2012). Data dari perhitungan regresi akan membantu untuk memberikan estimasi secara matematis dari derajat linieritas. Data yang harus dicantumkan meliputi koefisien korelasi (r^2), *y-intercept* (b), *slope* (a) dan persamaan garis regresi linear ($y = bx + a$) (United States Pharmacopeia and National Formulary, 2017).



Gambar 2.13 Grafik Penggambaran Linieritas dan Rentang (Hansen dkk., 2012)

Derajat linieritas suatu data dilihat dari koefisien korelasi (r^2) dan *y-intercept* dari persamaan garis regresi linear. Nilai r^2 yang lebih dari 0,998 dinilai telah sesuai atau merupakan nilai yang diperbolehkan dari data regresi linear (Christian dkk., 2014). ICH memberikan ketentuan untuk uji linieritas, bahwa minimum digunakan

5 konsentrasi yang berbeda. ICH juga memberikan ketentuan untuk nilai minimum rentang pada beberapa pengujian. Ketentuan yang diberikan adalah sebagai berikut:

- untuk pengujian dari substansi obat (atau produk jadi) minimum rentang adalah 80% hingga 120% dari konsentrasi yang diuji,
- untuk penentuan ketidakhomogenitas minimum rentang adalah 50% hingga 120% dari kriteria yang diperbolehkan,
- untuk uji keseragaman minimum rentang adalah 70% hingga 130% dari konsentrasi yang diuji, dan
- untuk uji disolusi minimum rentang adalah $\pm 20\%$ dari rentang penerimaan.

2.1.3 Akurasi

Akurasi menyatakan kedekatan antara nilai yang terukur (baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan) dengan nilai yang diterima (*International Conference on Harmonisation, 2005*). Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan metode *spiking* suatu sampel (Sudjaji, 2007).

Akurasi dapat ditentukan dengan 3 cara. Cara pertama adalah analisis bahan rujukan. Jika tidak dapat dilakukan cara pertama, dapat dilakukan cara kedua. Cara kedua adalah membandingkan hasil pada metode lain yang metode tersebut diketahui telah akurat.

Jika tidak dapat dilakukan cara kedua, dapat dilakukan cara ketiga.

Cara ketiga adalah uji perolehan kembali. Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode *spiking* (penambahan) jumlah tertentu

suatu analit pada blanko matriks atau dengan cara penambahan analit pada suatu sampel yang telah mengandung analit yang mana analit yang ditambahkan telah diketahui konsentrasinya dan analit pada sampel belum diketahui konsentrasinya (Christian dkk., 2014).

Untuk melakukan prosedur akurasi, ICH merekomendasikan untuk menggunakan minimal 9 kali penetapan kadar dengan minimal 3 konsentrasi yang berbeda (misal 3 konsentrasi dengan 3 replikasi pada setiap konsentrasi) (*International Conference on Harmonisation*, 2005). Rentang *recovery* yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada tabel 2.3.

Tabel 2.3 Rentang Persen Recovery yang Diperbolehkan (AOAC Guidelines, 2012)

Konsentrasi analit pada sampel (%)	Recovery limits (%)
100	98-101
10	95-102
1	92-105
0,1	90-108
0,01	85-110
10 µg/g (ppm)	80-115
1 µg/g	75-120
10 µg/kg (ppb)	70-125

2.1.4 Presisi

Presisi adalah ukuran dari keterulangan metode analisis antara beberapa pengujian pengukuran yang didapat dari beberapa sampel yang homogen. Presisi dapat dilakukan pada 3 tingkatan yang berbeda yaitu keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*) dan *reproducibility*. Keterulangan adalah presisi yang dilakukan pada percobaan yang sama baik personil, waktu dan tempatnya. Keterulangan atau *repeability* juga disebut dengan *intra-assay precision*. *Intermediate precision* adalah presisi

yang dilakukan pada percobaan yang berbeda, baik harinya (waktunya), peralatannya atau personilnya. *Reproducibility* adalah presisi yang dilakukan pada laboratorium yang berbeda (*International Conference on Harmonisation*, 2005).

Pada pengujian *repeatability*, minimal digunakan 9 pengukuran sampel dari setiap konsentrasi yang ada (3 konsentrasi dan 3 replikasi dalam setiap konsentrasi), dan pada konsentrasi 100% minimal digunakan 6 pengukuran sampel. Pada pengujian *intermediate precision* dilakukan analisa dari efek *random events* terhadap hasil presisi yang didapatkan. Efek tersebut mencakup perbedaan hari atau waktu, perbedaan analis, dan perbedaan peralatan yang digunakan. Pada pengujian *reproducibility*, dilakukan pengujian inter-laboratorium. *Reproducibility* seharusnya bergantung pada kasus dari standarisasi sebuah prosedur analisis untuk sebuah instansi tertentu. Data dari presisi adalah berupa nilai *relative standard deviation* (RSD) (*International Conference on Harmonisation*, 2005). Rentang RSD yang diperbolehkan dapat dilihat pada tabel 2.4.

Tabel 2.4 Rentang Nilai RSD Maksimum yang Diperbolehkan (AOAC Guidelines, 2012)

Konsentrasi analit pada sampel (%)	RSD (%)
100	1
10	1,5
1	2
0,1	3
0,01	4
10 µg/g (ppm)	6
1 µg/g	8
10 µg/kg (ppb)	15

2.1.5 *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantification (LOQ)*

LOD atau batas deteksi adalah konsentrasi terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi oleh instrumen. LOQ atau batas kuantifikasi adalah konsentrasi terendah dalam sampel yang masih dapat diukur oleh instrumen (Sudjaji, 2007).

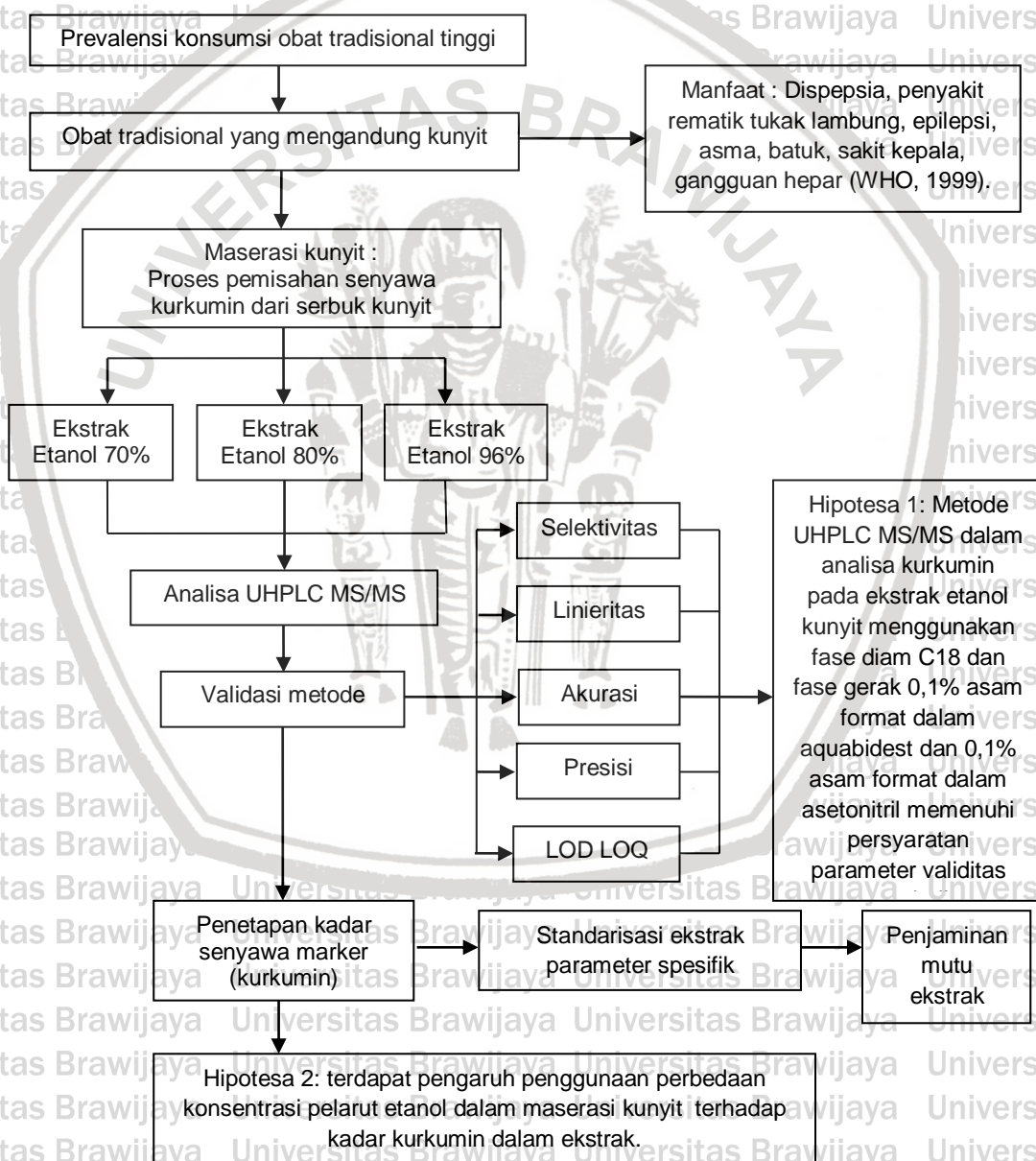
Terdapat 2 metode dalam menentukan LOD dan LOQ, yakni metode non instrumental visual dengan metode perhitungan. Metode non instrumental visual digunakan pada teknik kromatografi lapis tipis dan pada metode titimetri. LOD dan LOQ dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (*slope*, *s*) kurva baku (*International Conference on Harmonisation*, 2005).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Berpikir

Pada penelitian ini dilakukan maserasi kunyit dengan menggunakan konsentrasi pelarut etanol yang berbeda, yaitu etanol 70%, 80% dan 96%.

Ekstrak etanol kunyit yang didapatkan diukur kadar senyawa markernya (kurkumin). Tujuan dari penetapan kadar senyawa marker adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan perbedaan konsentrasi pelarut etanol dalam maserasi kunyit terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak. Kadar kurkumin diukur dengan sistem UHPLC MS/MS yang tervalidasi. Parameter validasi yang diuji meliputi selektivitas, linieritas, LOD, LOQ, akurasi dan presisi.

3.2 Hipotesa Penelitian

- 1) Metode UHPLC MS/MS dalam analisa kurkumin pada ekstrak etanol kunyit menggunakan fase diam C_{18} dan fase gerak 0,1% asam format dalam aquabidest dan 0,1% asam format dalam asetonitril memenuhi persyaratan parameter validitas.
- 2) Terdapat pengaruh penggunaan perbedaan konsentrasi pelarut etanol dalam maserasi kunyit terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan mengikuti jenis penelitian *true experimental*.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah serbuk kunyit.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi pelarut etanol yang digunakan dalam maserasi, yaitu terdiri dari etanol 96%, etanol 80% dan etanol 70%.

4.2.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar kurkumin yang dinyatakan dalam %b/b ekstrak.

4.2.3 Variabel Perancu Terkendali

Variabel perancu terkendali pada penelitian ini adalah jenis kolom HPLC dan jenis pelarut fase gerak HPLC, berupa fase gerak *pro hplc* yang memiliki tingkat kemurnian yang tinggi.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Laboratorium Bahan Alam Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya dan pada Laboratorium Kimia,

Fakultas Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang. Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli hingga Oktober 2018.

4.4 Bahan dan Alat / Instrumen Penelitian

4.4.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel serbuk kunyit (dari materia medika), etanol teknis konsentrasi 70%, 80% dan 96%, standar kurkumin TCI® (*Tokyo Chemical Industry*), metanol *pro hplc*, asam format *pro hplc* 0,1 % dalam aquabidest *pro hplc*, dan asam format *pro hplc* 2% dalam asetonitril *pro hplc* (pelarut *pro hplc* yang digunakan bermerk MERCK®).

4.4.2 Alat/Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik Shimadzu® AUW 220, labu ukur, pipet volume, gelas ukur, gelas kimia, toples kaca tertutup, corong kaca, kain flanel, *stirrer* IKA® RW 20 digital, *rotary evaporator* IKA® RV 10 Basic, *oven* memmert® UN 50, neraca Mettler AE® 200, mikrotube, mikropipet 2-20µl BOECO®, *sentrifuge* Orcgon® LC-04S, *membran filter* AGILENT® econofiltr nylh, sonikator DAWE®, kolom Kinetex® EVO C18 100OA (50mm x 2,1mm x 1,7µm) dan UHPLC merk ACCELLA® type 1250.

4.5 Definisi Istilah / Operasional

1. Sistem UHPLC MS/MS yang digunakan terdiri atas fase diam C18 dan fase gerak 2 macam campuran yaitu fase gerak A terdiri dari 0,1% asam format *pro hplc* dalam aquabidest *pro hplc* dan fase B terdiri dari 0,1%

asam format *pro hplc* dalam asetronitril *pro hplc*. Pemberian fase gerak menggunakan metode elusi gradien.

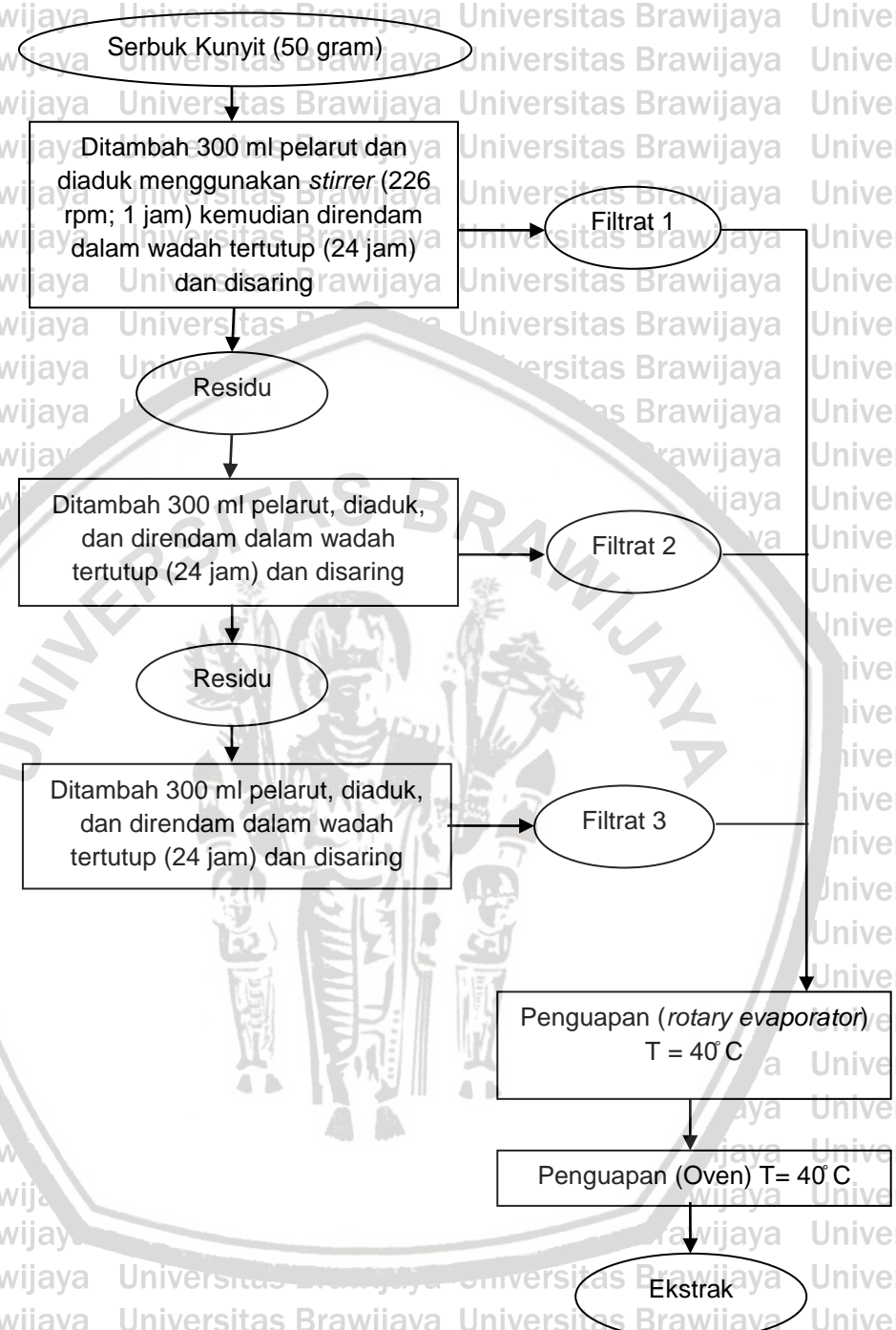
2. Kadar kurkumin sampel dinyatakan dalam %g/g ekstrak yaitu massa kurkumin (gram) dalam 1 gram ekstrak.
3. Parameter validasi metode yang dilakukan pada penelitian ini adalah selektivitas, linieritas, akurasi, presisi, LOD dan LOQ.
4. Selektivitas adalah kemampuan instrumen untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan selektif (Sudjaji, 2007).
5. Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran (*range*) yang diberikan (Sudjaji, 2007).
6. Akurasi (ketepatan) adalah kedekatan antara nilai yang terukur dengan nilai sebenarnya dari suatu analit (Sudjaji, 2007).
7. Presisi adalah ukuran keterulangan metode analisis (Sudjaji, 2007).
8. *Limit of Detection* (LOD) atau batas deteksi adalah konsentrasi terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi oleh instrumen (Sudjaji, 2007).
9. *Limit of Quantification* (LOQ) atau batas kuantifikasi adalah konsentrasi terendah dalam sampel yang masih dapat diukur oleh instrumen (Sudjaji, 2007).

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Metode Maserasi

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi terdapat 3 macam pelarut yaitu etanol 70%, etanol 80% dan etanol 96% (pelarut teknis).

Proses maserasi yang dilakukan adalah sebagai berikut.



Gambar 4.1 Bagan Metode Maserasi

4.6.2 Kondisi Operasi UHPLC-MS/MS

Fase gerak yang digunakan pada analisis digunakan 2 macam campuran fase gerak dengan metode elusi gradien. Fase gerak A

terdiri dari 0,1% asam format *pro hplc* dalam aquabidest *pro hplc*, fase B terdiri dari 0,1% asam format *pro hplc* dalam asetonitril *pro hplc*.

Kecepatan pemberian fase gerak adalah 300 $\mu\text{l}/\text{menit}$ dengan pengaturan perbandingan pemberian fase gerak sebagai berikut:

Tabel 4.1 Kondisi Fase Gerak UHPLC-MS/MS

No.	Time	A%	B%	$\mu\text{l}/\text{min}$
0	0.00	75.0	25.0	300.0
1	0.50	75.0	25.0	300.0
2	3.00	25.0	75.0	300.0
3	4.00	25.0	75.0	300.0
4	4.50	75.0	25.0	300.0
5	6.00	75.0	25.0	300.0

Spesifikasi dari instrumen UHPLC yang digunakan adalah dengan merk ACCELLA tipe 1250 buatan Thermo Scientific yang terdiri dari *degasser* vakum, pompa *quartener*, *autosampler* termostatik dan dikendalikan oleh *personal computer* melalui program x-calibur 2.1.

Kolom yang digunakan adalah kolom Kinetex EVO C18 100Å (50mm x 2.1mm x 1.7 μm). Kolom dikontrol pada suhu 30C dan kompartemen *autosampler* ditetapkan pada suhu 16C. Penggunaan MS/MS *Triple Q*

(*quadrupole*) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan sumber ionisasi ESI (*Electrospray Ionization*)

yang dikendalikan oleh *software* TSQ Tune dan dioperasikan dengan ionisasi mode positif. Penentuan senyawa yang ditarget dengan

metode SRM (*Selected Reaction Monitoring*) diatur pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Optimasi Parameter Massa untuk Kurkumin

Komponen	Parent mass (m/z)	Product mass (m/z)	
		Qualifier	Quantifier
Curcumin	369	177	285

Kondisi ionisasi ESI adalah sebagai berikut:

- tegangan spray 3kV;
- suhu penguapan 275°C;
- suhu kapiler 300°C;
- nitrogen sebagai sheath gas pressure 40 psi, dan
- aux gas pressure 10 psi dengan gas argon.

4.6.3 Pembuatan Larutan Standar Kurkumin

- Ditimbang 2 mg standar kurkumin dan dilarutkan pada 2 ml metanol untuk membuat larutan baku induk 1000 ppm
- Dilakukan sonikasi selama 10 menit.
- Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit
- Dipipet supernatant sebanyak 10 μ l, larutan diencerkan lagi dengan methanol hingga 1000 μ l dan didapatkan konsentrasi larutan baku sebesar 10 ppm. Larutan baku 10 ppm kemudian diencerkan melalui pengenceran bertingkat menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 4; 2; 1; 0,5; dan 0,25 ppm.
- Larutan disaring menggunakan *filter* berukuran pori 0,2 μ m.

4.6.4 Pembuatan Larutan Sampel

- Sampel ekstrak etanol 70%; 80% dan 96% ditimbang dengan 3 kali pengulangan (3 kali replikasi). Sasaran penimbangan tidak lebih dari 100 mg. Hasil penimbangan dicatat.
- Sampel dilarutkan pada 10 ml metanol
- Dilakukan sonikasi selama 10 menit.

- Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit
- Dipipet supernatant sebanyak 100 μl , larutan ditambah methanol 1000 μl . Kemudian larutan diencerkan lagi sebanyak dua kali (dipipet sebanyak 100 μl dan ditambah methanol 1000 μl).
- Didapatkan 9 larutan sampel uji (dari 3 sampel ekstrak etanol 70%; 80% dan 96% masing-masing 3 kali replikasi).

4.6.5 Validasi Metode Analisis

4.6.5.1 Uji Selektivitas

- Larutan standar dan larutan sampel diinjeksikan sebanyak 2 μl pada sistem UHPLC MS/MS.
- Diamati waktu retensi antara larutan standar dan larutan sampel.

4.6.5.2 Uji Linieritas

- Larutan standar kurkumin dengan konsentrasi 0,25; 0,5; 1; 2; dan 4 $\mu\text{g/ml}$ diinjeksikan sebanyak 2 μl pada sistem UHPLC MS/MS.
- Diamati luas area puncak yang muncul.
- Dihitung persamaan garis regresi linier.

4.6.5.3 Penentuan *Limit of Detection* (LOD) dan *Limit of Quantification* (LOQ)

- Larutan baku kurkumin dengan konsentrasi 0,25; 0,5; 1; 2; dan 4 $\mu\text{g/ml}$ diinjeksikan sebanyak 2 μl pada sistem UHPLC MS/MS.
- Diamati luas area puncak yang muncul.

- Dihitung nilai LOD dan nilai LOQ

4.6.5.4 Penentuan Akurasi dan Presisi Standar Kurkumin

- Larutan standar kurkumin dengan konsentrasi 0,25; 0,5; 1; 2; dan 4 $\mu\text{g/ml}$ diinjeksikan sebanyak 2 μl pada sistem

UHPLC-MS/MS.

- Dilakukan 3 kali penginjeksian pada setiap larutan standar kurkumin.

- Diamati luas area puncak yang muncul.
- Luas area puncak yang muncul dimasukkan ke persamaan garis regresi linear. Kemudian dihitung persen perolehan kembali dan RSD-nya.

4.6.6 Pengukuran Kadar Sampel

- 9 larutan sampel diinjeksikan sebanyak 2 μl pada sistem UHPLC MS/MS.
- Setiap larutan diinjeksikan 5 kali (total terdapat 45 injeksi).
- Diamati luas area puncak yang muncul.
- Luas area puncak yang muncul dimasukkan ke persamaan garis regresi linear. Kemudian dihitung kadar kurkumin dalam sampel
- Nilai kadar kurkumin yang didapatkan dianalisis menggunakan uji beda nyata *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA).

4.7 Analisis Data

4.7.1 Linieritas

Linearitas dinyatakan dengan koefisien korelasi (r^2). Konsentrasi larutan baku kurkumin diplotkan terhadap luas area pada kromatogram

sehingga diperoleh nilai koefisien korelasi (r^2) dari persamaan $y = bx + a$ (Harmita, 2004). Linieritas juga dapat ditentukan melalui nilai koefisien variasi dari fungsi (V_{x0}). Nilai V_{x0} tidak boleh melebihi 5% (Yuwono & Indrayanto, 2005).

Rumus perhitungan S_{x0} dan V_{x0} adalah sebagai berikut.

$$S_{x0} = \frac{Sy}{b}$$

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{\bar{x}} \times 10$$

(1)

Keterangan:

S_{x0} : standar deviasi dari fungsi

Sy : simpangan baku respon analitik

b : slope

V_{x0} : koefisien variasi dari fungsi

\bar{x} : rata-rata nilai konsentrasi larutan baku standar

Nilai b didapatkan dari slope persamaan garis regresi linier.

Persamaan untuk nilai Sy (simpangan baku respon analitik) adalah sebagai berikut.

$$Sy = \sqrt{\frac{\sum(y - yi)^2}{n - 2}}$$

(2)

Keterangan:

Sy : simpangan baku respon analitik

y : nilai area yang muncul di detektor

yi : nilai area didapat dari persamaan garis regresi

n : jumlah variabel konsentrasi yang digunakan

4.7.2 Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantification (LOQ)

Nilai LOD dan LOQ dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi (Harmita, 2004). Rumus perhitungan

LOD dan LOQ adalah sebagai berikut.

$$LOD = \frac{Sy}{b} \times 3$$

$$LOQ = \frac{Sy}{b} \times 10$$

(3)

Keterangan:

Sy : simpangan baku respon analitik

b : slope

4.7.3 Akurasi

Akurasi dinyatakan dengan persen perolehan kembali atau *recovery* (Harmita, 2004). Rumus *recovery* adalah sebagai berikut.

$$\text{Recovery} = \frac{\text{konsentrasi terukur}}{\text{konsentrasi sebenarnya}} \times 100\% \quad (4)$$

4.7.4 Presisi

Presisi dihitung sebagai simpangan deviasi relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV) (Harmita, 2004). Rumus perhitungan RSD adalah sebagai berikut.

$$\text{RSD} = \frac{\text{simpangan deviasi (SD)}}{\text{rata - rata}} \times 100\% \quad (5)$$

4.7.5 Perhitungan Kadar Sampel

Kadar sampel didapatkan dengan memasukkan nilai luas area yang muncul di detektor ke dalam persamaan regresi linier. Rumus perhitungan konsentrai sampel adalah sebagai berikut.

$$y = bx + a \quad (6)$$

Keterangan:

y : luas area

x : konsentrasi sampel

a : *y-intercept*

b : *slope*

Rumus perhitungan kadar sampel adalah sebagai berikut.

$$\text{Kadar sampel \%} \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{FP \times \text{konsentrasi terukur} \left(\frac{\mu g}{ml} \right)}{\text{massa sampel terukur (g)}} \times 10^{-6} g \times 10 \text{ ml} \times 100\% \quad (7)$$

Keterangan:

FP : faktor pengencer yang bernilai 1331

Nilai kadar sampel yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan uji beda nyata *One-Way ANOVA*, dengan syarat

distribusi data normal ($p > 0,05$) dan varians data harus homogen ($p > 0,05$). Apabila syarat uji ANOVA tidak terpenuhi maka akan dilakukan transformasi data dan dilakukan uji normalitas kembali. Apabila setelah dilakukan transformasi data distribusi data tetap tidak normal, maka data dianalisis menggunakan uji statistika non-parametrik *Kruskal Wallis*. Kemudian dilakukan uji *Post-hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna. Analisa data tersebut dilakukan dengan menggunakan *software IBM SPSS Statistics 20*, dengan nilai probabilitas 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan sebesar 95%.



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Maserasi

Pada penelitian ini dilakukan maserasi kunyit dengan menggunakan berbagai perbandingan konsentrasi pelarut etanol. Proses maserasi dilakukan untuk memisahkan zat atau senyawa yang terkandung di serbuk kunyit menggunakan pelarut yang terpilih, yaitu etanol 96%, etanol 80% dan etanol 70% melalui prosedur standar.

Serbuk kunyit yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari Materia Medika, Kota Batu. Keterangan mengenai determinasi kunyit dapat dilihat pada lampiran 1 gambar 1. Serbuk Kunyit ditimbang sebanyak 50 gram dengan menggunakan neraca analitik, dan ditimbang dengan tiga pengulangan. Hasil penimbangan serbuk kunyit (berturut-turut serbuk pertama, kedua dan ketiga) adalah 50,0003 gram; 50,0002 gram; dan 50,0002 gram.

Serbuk kunyit yang telah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia 600ml dan ditambahkan pelarut etanol yang berbeda-beda, berturut-turut serbuk pertama, kedua dan ketiga ditambahkan pelarut etanol 96%, etanol 80% dan etanol 70% masing-masing sebanyak 300 ml. Kemudian dilakukan pengadukan menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 226 rpm selama 1 jam. Untuk mencegah penguapan dari pelarut, digunakan aluminium foil untuk menutupi gelas kimia selama proses pengadukan

berlangsung. Proses pengadukan dengan stirrer dapat dilihat pada lampiran 2 gambar 1.

Setelah proses pengadukan, 3 larutan ekstrak kemudian disimpan pada wadah tertutup selama 1 hari (merupakan proses maserasi).

Penggunaan wadah tertutup bertujuan untuk mencegah penguapan pelarut.

Pada hari kedua, 3 larutan ekstrak tersebut disaring menggunakan corong

gelas dan kain flanel. Masing-masing filtrat kemudian disimpan pada wadah

tertutup dan residu ekstrak kemudian dilarutkan dengan pelarut etanol

(dengan menggunakan pelarut etanol konsentrasi sama dengan konsentrasi

pelarut etanol sebelumnya) sebanyak 300 ml. Larutan ekstrak kemudian

diaduk dengan pengaduk kaca, dan kemudian larutan disimpan selama 1

hari (merupakan proses maserasi pertama). Pada hari ketiga dilakukan

perlakuan yang sama dengan hari sebelumnya (hari kedua) yaitu

menyaring larutan ekstrak, memisahkan filtrat, dan menambahkan pelarut

etanol 300 ml pada residu ekstrak. Larutan ekstrak kemudian diaduk dengan

pengaduk kaca, dan kemudian larutan disimpan selama 1 hari (merupakan

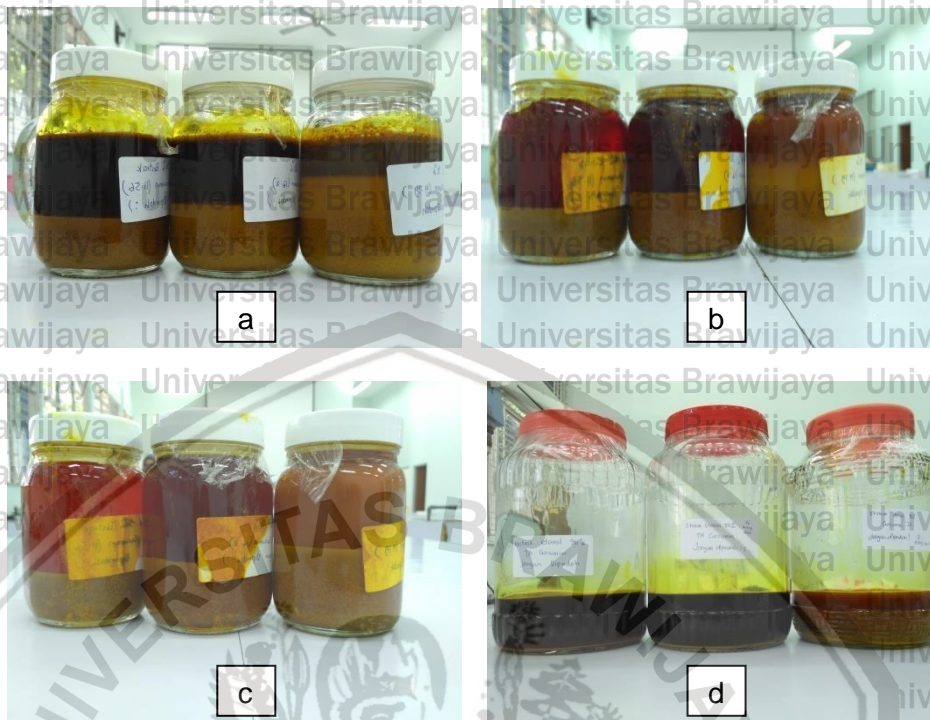
proses remaserasi kedua). Pada hari keempat dilakukan penyaringan larutan

ekstrak dan pemisahan filtrat. Filtrat yang didapatkan pada hari kedua, ketiga,

dan keempat, disimpan pada wadah yang sama sesuai dengan perbedaan

pelarut etanol yang digunakan. Kondisi penyimpanan dari maserasi dapat

dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1 Kondisi Larutan Ekstrak Sebelum Penyimpanan (a) pada Proses Maserasi, (b) pada Proses Remaserasi 1, (c) pada Proses Remaserasi 2 dan (d) merupkan Filtrat Maserasi Ekstrak, Remaserasi 1 dan Remaserasi 2 dari Wadah Paling kiri ke Kanan merupakan Ekstrak dengan Pelarut Etanol 96%, Etanol 80% dan Etanol 70%

Dapat dilihat pada gambar 5.1, terdapat perbedaan warna larutan ekstrak pada setiap proses penyimpanan (maserasi, remaserasi 1 dan remaserasi 2) dan warna larutan filtrat pada setiap jenis konsentrasi pelarut yang digunakan (pelarut etanol 96%, etanol 80% dan etanol 70%).

Kepekatan warna larutan ekstrak pada kondisi maserasi > remaserasi 1 > remaserasi 2. Kepekatan warna larutan filtrat etanol 96% hampir sama dengan kepekatan filtrat etanol 80% (tidak ada perbedaan secara visual) dan kedua filtrat berwarna coklat kehitaman. Kepekatan warna larutan filtrat etanol 70% lebih pudar jika dibandingkan dengan warna larutan filtrat etanol 80% dan etanol 96% (berwarna coklat muda).

Kemudian dilakukan proses penguapan pelarut pada filtrat yang telah disijapa dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C dengan kecepatan 80 rpm. Penguapan dengan *rotary evaporator* dilakukan untuk menguapkan pelarut, terutama untuk menguapkan kandungan etanol dalam pelarut. Proses penguapan menggunakan *rotary* ini dilakukan hingga tidak ada pelarut yang menguap yang dapat terlihat secara visual pada instrumen *rotary* (tidak ada pelarut yang menetes pada *diagonal glassware* atau *cooling area*). Proses penguapan menggunakan *rotary* dapat dilihat pada lampiran 2 gambar 2.

Setelah dilakukan penguapan didapatkan ekstrak etanol 96% dan ekstrak etanol 70% berbentuk ekstrak kental, serta didapatkan ekstrak etanol 80% dalam bentuk ekstrak cair. Hasil ekstrak yang didapatkan kemudian dipindahkan ke cawan porselen dan ditimbang. Tabel waktu penguapan dengan menggunakan *rotary* dan massa ekstrak yang didapatkan dari masing-masing perbedaan konsentrasi pelarut etanol dapat dilihat pada lampiran 3 tabel 1.

Ekstrak yang didapatkan kemudian dilakukan penguapan menggunakan oven. Penguapan dengan oven dilakukan untuk menguapkan pelarut yang tidak menguap saat kondisi penguapan menggunakan *rotary*, terutama untuk menguapkan kandungan air pada pelarut. Ekstrak diuapkan hingga massa konstan. Tabel waktu penguapan oven dan massa ekstrak yang didapatkan dari masing-masing perbedaan konsentrasi pelarut etanol dapat dilihat pada lampiran 3 tabel 2. Menurut Farmakope Indonesia pengeringan harus dilanjutkan hingga pada perbedaan dua kali penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,50 mg tiap g zat yang digunakan,

penimbangan kedua dilakukan setelah pengeringan kembali selama waktu yang sesuai (Depkes RI, 2014). Penimbangan atau kerterangan mengenai massa ekstrak ketika penguapan hingga massa konstan dapat dilihat pada lampiran 3 tabel 3.

Ekstrak hasil penguapan menggunakan oven kemudian ditutup menggunakan plastik *wrap* dan aluminium foil. Hasil ekstrak yang didapatkan dapat dilihat pada gambar 5.2. Ekstrak kemudian disimpan pada desikator dan selanjutnya digunakan untuk di analisa menggunakan UHPLC MS/MS. Sebelum penyimpanan, ekstrak ditimbang terlebih dahulu untuk mengetahui nilai %rendemen ekstrak. Nilai %rendemen ekstrak dapat dilihat pada tabel

5.1.



Gambar 5.2 dari Kiri ke Kanan Ekstrak Etanol Kunyit 96%, 80% dan 70%

Tabel 5.1 Nilai Persen Randemen Ekstrak

Massa serbuk awal (gram)	Pelarut maserasi	Massa ekstrak akhir (gram)	%Randemen ekstrak
50,0003	Etanol 96%	10,978	21,956%
50,0002	Etanol 80%	12,823	25,646%
50,0002	Etanol 70%	14,705	29,410%

5.2 Validasi Metode

Ekstrak etanol 96%, 80% dan 70% dianalisis menggunakan instrumen UHPLC MS/MS. Langkah pertama yang dilakukan yaitu optimasi fase gerak

melalui beberapa percobaan untuk mendapatkan bentuk puncak yang simetris (tidak menghasilkan puncak *fronting* atau *tailing*). Setelah didapat bentuk puncak yang simetris, pengujian dilanjutkan dengan validasi metode UHPLC MS/MS.

5.2.1 Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan untuk memastikan bahwa instrumen yang digunakan mampu untuk mengukur analit (pada penelitian ini yaitu kurkumin) yang ada pada sampel yang didalamnya terdapat komponen lain. Selektivitas dapat dilihat dari perbandingan waktu retensi kurkumin pada larutan standar dan waktu retensi kurkumin pada larutan sampel. Rata-rata waktu retensi kurkumin pada larutan baku standar, larutan sampel ekstrak etanol 96%, 80% dan 70% secara berturut-turut adalah 3,195; 3,202; 3,220 dan 3,214 menit, yang berarti waktu retensi kurkumin dari larutan baku standar dan larutan sampel hampir sama. Waktu retensi kurkumin pada larutan sampel dan larutan standar dapat dilihat pada tabel 5.2.

Selektivitas juga dapat dilihat dari parameter massa yang ditarget dalam metode SRM UHPLC MS/MS. Penentuan senyawa yang ditarget (senyawa kurkumin) dilakukan dengan metode SRM, dimana bahwa senyawa yang ditargetkan memiliki massa molekul (m/z) 369, dengan target massa *quantifier* 285 dan massa *qualifier* 177. Hal ini berarti, puncak yang muncul di setiap kromatogram hasil injeksi sampel merupakan kurkumin. Keterangan mengenai nilai m/z yang ada pada kromatogram larutan standar dan sampel dapat dilihat pada gambar 5.3, 5.4, 5.5 dan 5.6. Puncak yang muncul

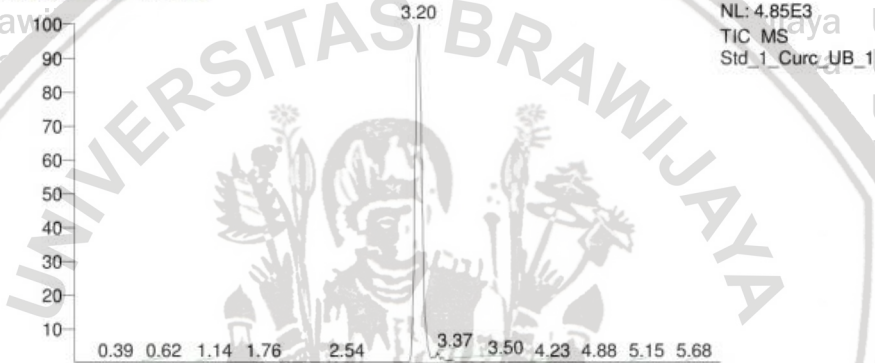
pada setiap konsentrasi larutan standar dan pada sampel ekstrak etanol 96%, 80% dan 70% dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel 5.2 Waktu retensi kurkumin pada larutan standar dan sampel

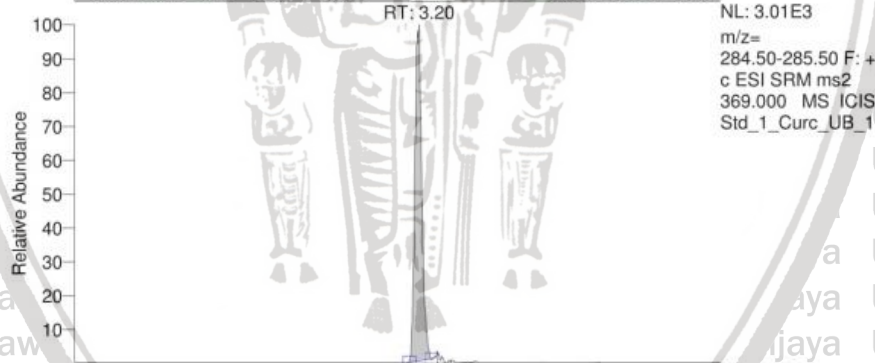
Larutan	Rata-Rata Waktu Retensi (menit)
Baku Standar Kurkumin	3,195
Sampel ekstrak etanol 96%	3,201
Sampel ekstrak etanol 80%	3,220
Sampel ekstrak etanol 70%	3,214

E:\DATA RAW\Curcumin\Std_1_Curc_UB_1

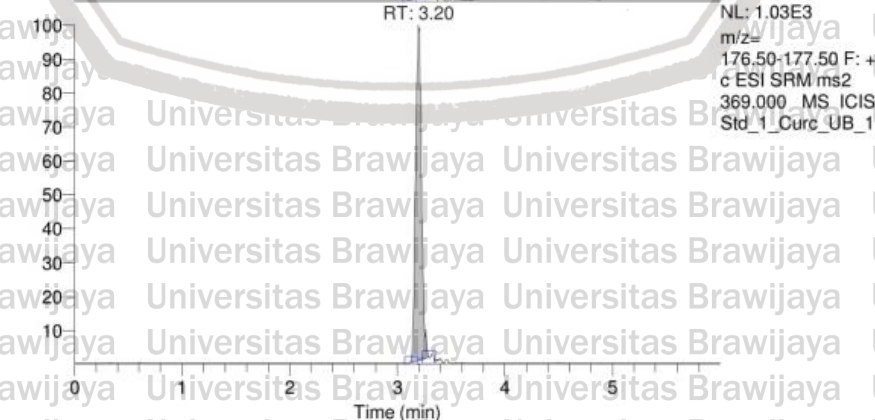
RT: 0.00 - 6.00 SM: 7B



NL: 4.85E3
TIC MS
Std_1_Curc_UB_1

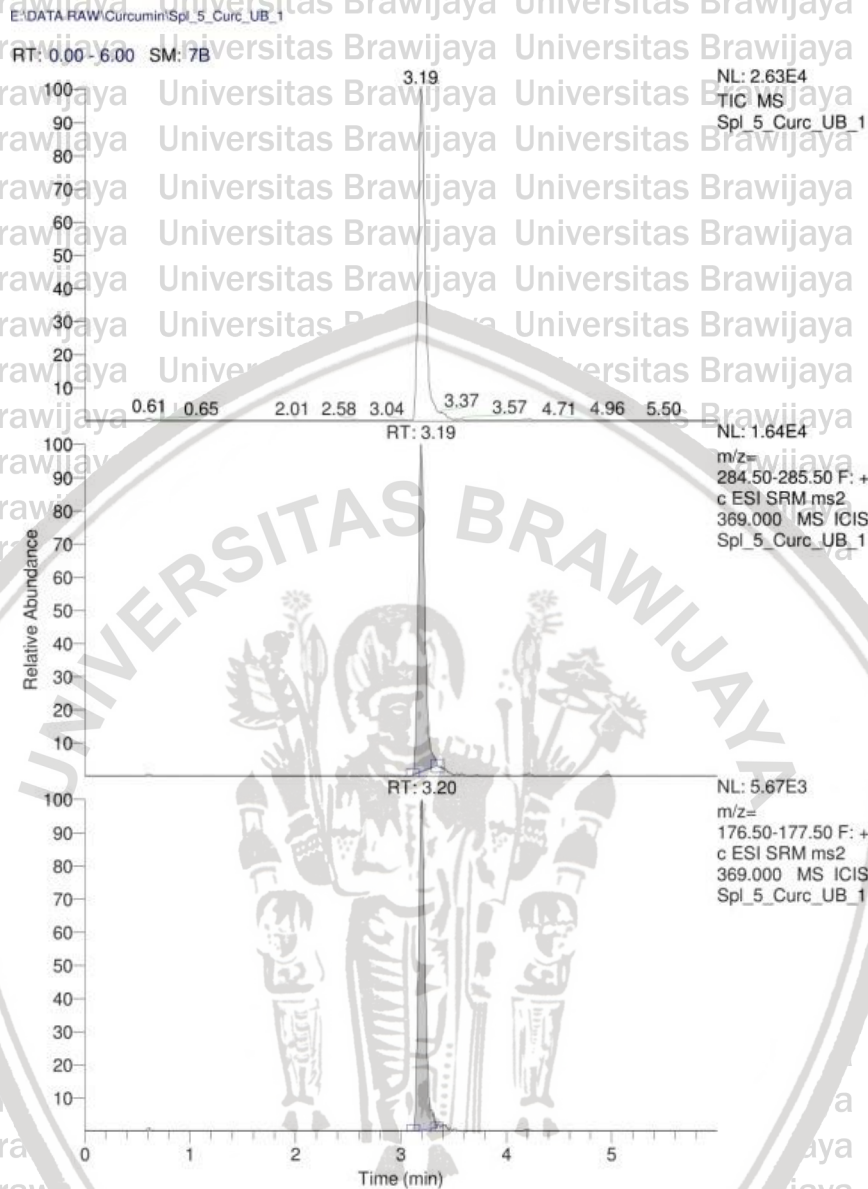


NL: 3.01E3
m/z=
284.50-285.50 F: +
c ESI SRM ms2
369.000 MS ICIS
Std_1_Curc_UB_1

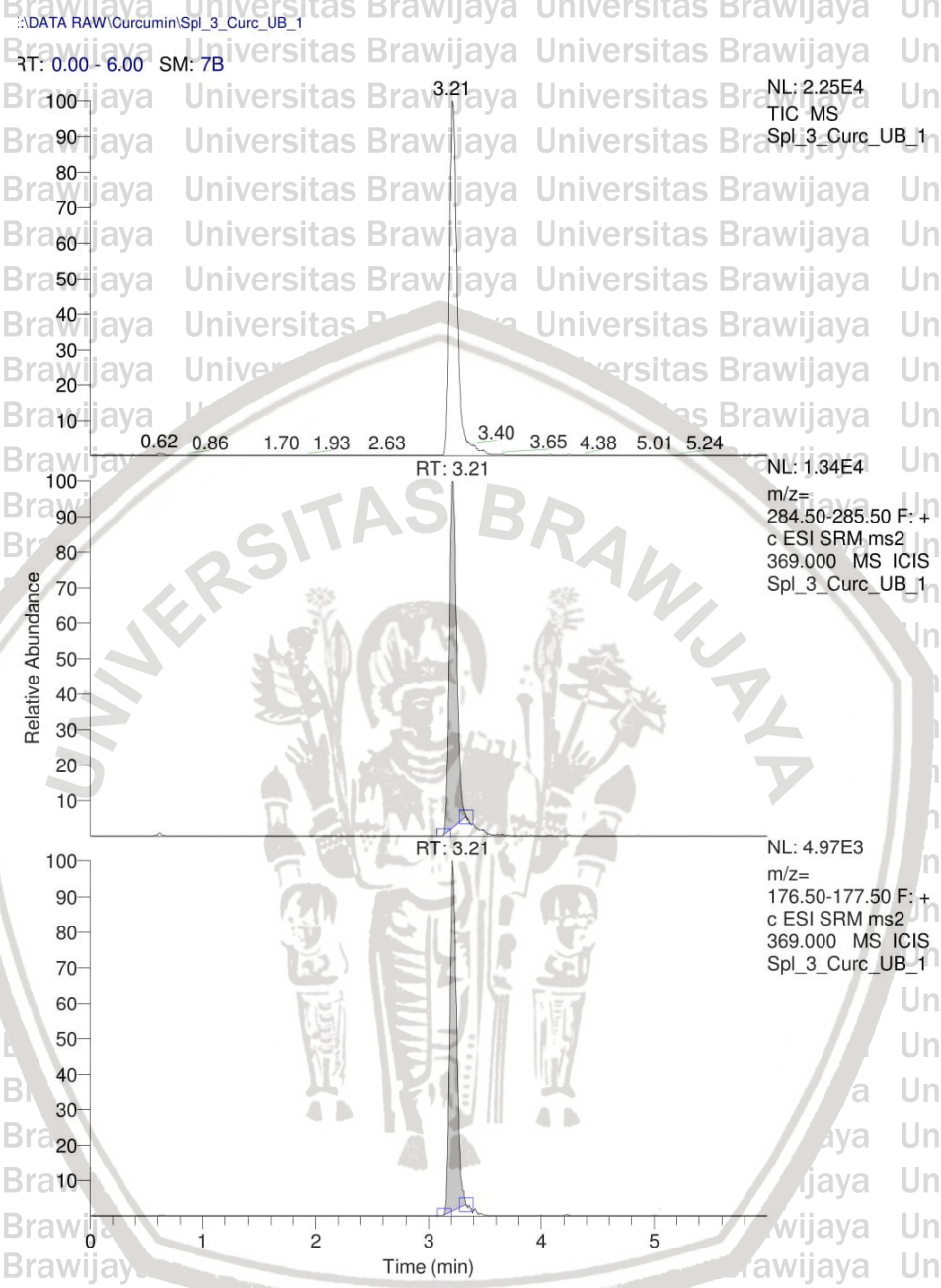


NL: 1.03E3
m/z=
176.50-177.50 F: +
c ESI SRM ms2
369.000 MS ICIS
Std_1_Curc_UB_1

Gambar 5.3 Kromatogram Larutan Standar Kurkumin 0,25 ppm

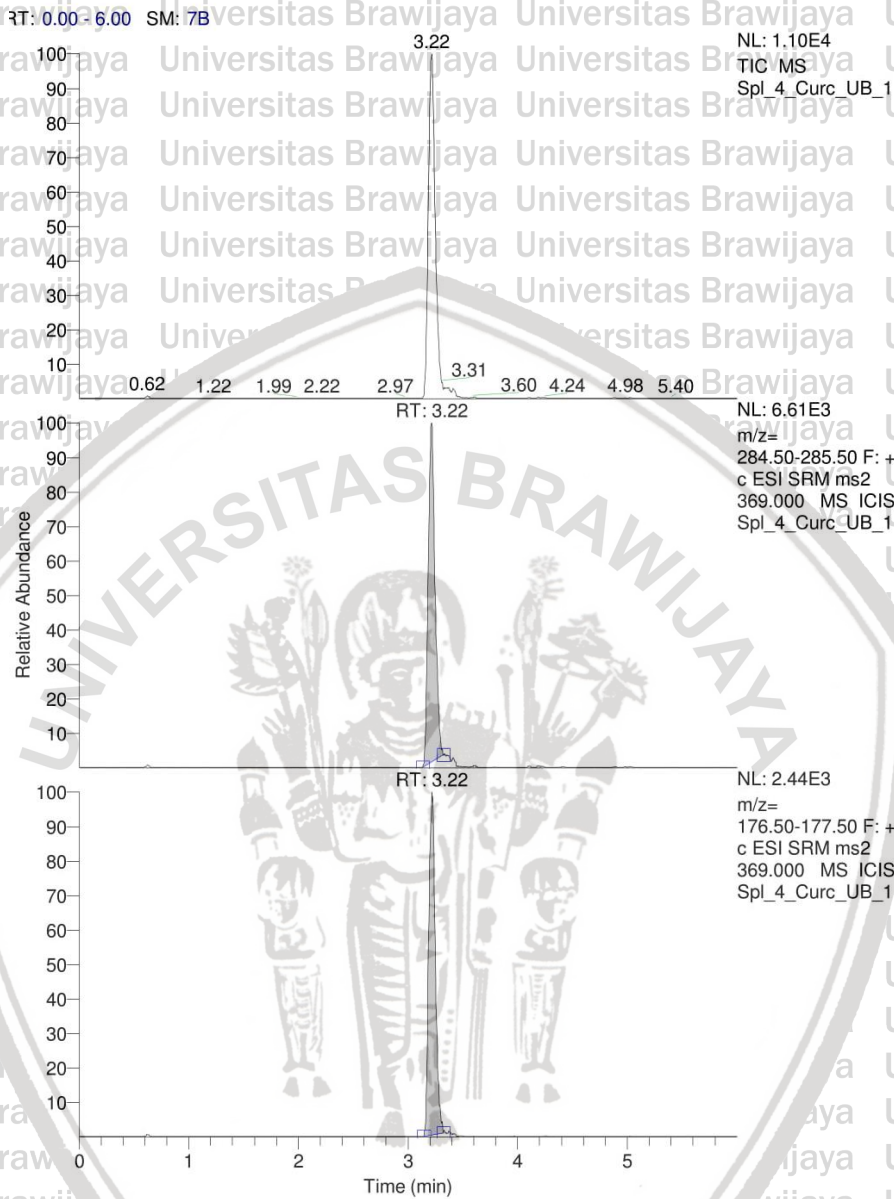


Gambar 5.4 Kromatogram Larutan Sampel Ekstrak Etanol 96%



Gambar 5.5 Kromatogram Larutan Sampel Ekstrak Etanol 80%

DATA RAW: CurcuminSpl_4_Curc_UB_1



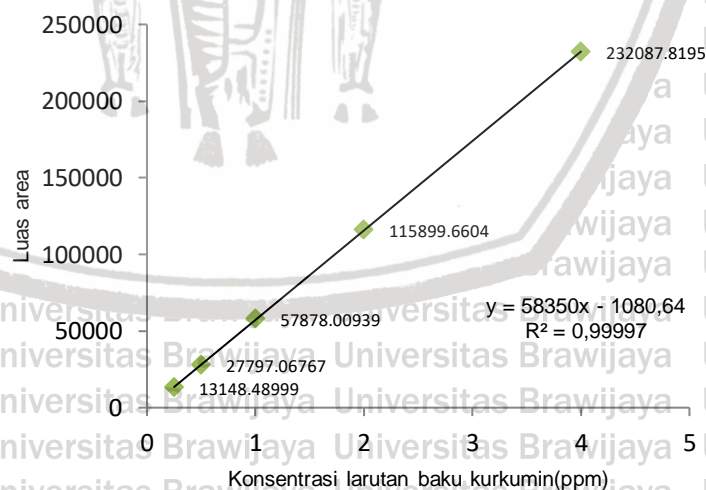
Gambar 5.6 Kromatogram Larutan Sampel Ekstrak Etanol 70%

5.2.2 Linieritas

Uji linieritas dilakukan untuk memastikan bahwa plot respon detektor linier terhadap konsentrasi yang diuji. Pada penelitian ini telah dilakukan uji linieritas dengan menggunakan 5 konsentrasi larutan baku standar yang berbeda yaitu 0,25; 0,5; 1; 2; dan 4 ppm.

ICH memberikan ketentuan untuk uji linieritas, bahwa minimum

digunakan 5 konsentrasi yang berbeda (International Conference on Harmonisation, 2005). Luas area puncak yang muncul pada kromatogram kemudian diplotkan terhadap nilai konsentrasi kurkumin yang diinjeksikan (luas area= y , konsentrasi kurkumin= x). Grafik linieritas dapat dilihat pada gambar 5.7. Persamaan garis linear yang didapatkan adalah $y = 58350x - 1080,64$ dengan nilai koefisien korelasi (r^2) sebesar 0,99997, dimana nilai r^2 yang didapatkan sesuai dengan nilai yang diperbolehkan. Nilai r^2 yang lebih dari 0,998 dinilai telah sesuai atau merupakan nilai yang diperbolehkan dari data regresi linear (Christian dkk., 2014). Linieritas juga dapat ditentukan melalui nilai koefisien variasi dari fungsi (V_{x0}). Perhitungan nilai V_{x0} dapat dilihat pada tabel 5.3. Nilai V_{x0} yang didapatkan adalah 0,54%, dimana nilai V_{x0} yang didapatkan sesuai dengan nilai yang diperbolehkan. Nilai V_{x0} tidak boleh melebihi 5% (Yuwono & Indrayanto, 2005).



Gambar 5.7 Grafik Linieritas

Tabel 5.3 Perhitungan nilai V_{x0}

Konsentrasi larutan baku standar (ppm)	Area terukur (y)	Area terhitung (y_i)	$(y-y_i)^2$	S_y	S_{x0}	V_{x0}
0,25	13148,489	13506,860	128429,06			
0,5	27797,067	28094,360	88382,72			
1	57878,009	57269,360	370454,08	489,71	0,01	0,54
2	115899,660	115619,360	78568,29			
4	232087,819	232319,360	53611,02			

Rumus perhitungan S_{x0} dan V_{x0} adalah sebagai berikut.

$$S_{x0} = \frac{S_y}{b}$$

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{\bar{x}} \times 10$$

(14)

Keterangan:

S_{x0} : standar deviasi dari fungsi

S_y : simpangan baku respon analitik

b : slope

V_{x0} : koefisien variasi dari fungsi

\bar{x} : rata-rata nilai konsentrasi larutan baku standar

Nilai b didapatkan dari slope persamaan garis regresi linier.

Persamaan untuk nilai S_y (simpangan baku respon analitik) adalah sebagai berikut.

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y - y_i)^2}{n - 2}}$$

(15)

Keterangan:

S_y : simpangan baku respon analitik

y : nilai area yang muncul di detektor

y_i : nilai area didapat dari persamaan garis regresi

n : jumlah variabel konsentrasi yang digunakan

5.2.3 LOD dan LOQ

Tujuan dilakukan pengujian terhadap parameter LOD dan

LOQ adalah untuk melihat konsentrasi terkecil yang masih dapat

dideteksi dan dapat diukur oleh instrumen. LOD dan LOQ dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (slope) kurva baku (*International Conference on Harmonisation, 2005*). Berdasar hasil perhitungan, didapatkan nilai LOD adalah 0,03 ppm dan nilai LOQ adalah 0,08 ppm. Perhitungan LOD dan LOQ dapat dilihat pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 Perhitungan LOD dan LOQ

Konsentrasi larutan baku standar (ppm)	Area terukur (y)	Area terhitung (yi)	(y-yi) ²	Sy	LOD	LOQ
0,25	13148,489	13506,860	128429,06			
0,5	27797,067	28094,360	88382,72			
1	57878,009	57269,360	370454,08	489,71	0,03	0,08
2	115899,660	115619,360	78568,29			
4	232087,819	232319,360	53611,02			

Rumus perhitungan LOD dan LOQ adalah sebagai berikut.

$$LOD = \frac{Sy}{b} \times 3$$

$$LOQ = \frac{Sy}{b} \times 10$$

(16)

Keterangan:

Sy : simpangan baku respon analitik

b : slope

5.2.4 Akurasi dan Presisi

Tujuan dari dilakukan pengujian parameter akurasi adalah untuk memastikan bahwa konsentrasi yang diukur sesuai dengan luas area yang ditunjukkan oleh respon detektor. Tujuan dari dilakukan pengujian parameter presisi adalah untuk memastikan bahwa luas area yang ditunjukkan oleh respon detektor melalui pengukuran yang berulang adalah tetap. Dalam penginjeksian larutan

baku standar, setiap konsentrasi larutan baku diinjeksikan sebanyak 3 kali. Dari setiap area yang muncul, kemudian dihitung konsentrasi terhitungnya melalui persamaan garis linier. Kemudian ditentukan nilai %recovery dan %RSD melalui perhitungan. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi larutan baku standar yang berkisar pada 1 µg/ml, sehingga nilai persen recovery yang diperbolehkan adalah 75-120% dan nilai RSD maksimum yang diperbolehkan adalah 8% (AOAC Guidelines, 2012). Nilai persen recovery dan RSD yang diperbolehkan dapat dilihat pada tabel 5.5. Dari hasil perhitungan, didapatkan nilai %recovery mulai dari 96,72% hingga 106,38% dan didapatkan nilai %RSD mulai dari 1,09% hingga 4,37%, hal ini berarti nilai %recovery dan %RSD yang ada telah memenuhi persyaratan. Nilai %recovery dan %RSD yang didapatkan pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.5 Rentang Persen Recovery dan Rentang Nilai RSD Maksimum yang Diperbolehkan (AOAC Guidelines, 2012)

Konsentrasi (%)	Recovery limits (%)	RSD (%)
100	98-101	1
10	95-102	1,5
1	92-105	2
0,1	90-108	3
0,01	85-110	4
10 µg/g (ppm)	80-115	6
1 µg/g	75-120	8
10 µg/kg (ppb)	70-125	15

Tabel 5.6 Nilai %Recovery dan %RSD Larutan Baku Standar

No	Kons. ($\mu\text{g/mL}$)	(Area)	Kons. terhitung (yi)	%Recovery	%RSD
1	0,25	13.148,49	0,24	97,54	4,37
		13.665,98	0,25	101,09	
		14.437,89	0,27	106,38	
2	0,5	27.797,07	0,49	98,98	2,92
		29.496,74	0,52	104,81	
		28.365,93	0,50	100,93	
3	1,00	57.878,01	1,01	101,04	2,49
		60.062,49	1,05	104,79	
		57.235,18	0,99	99,94	
4	2,00	115.899,66	2,01	100,24	3,48
		111.790,43	1,93	96,72	
		119.923,34	2,07	103,69	
5	4,00	232.087,82	3,99	99,90	1,09
		227.428,02	3,91	97,90	
		231.414,46	3,98	99,61	

5.3 Penetapan Kadar Kurkumin Sampel Ekstrak

Setelah dilakukan validasi metode UHPLC MS/MS dilakukan analisis kadar kurkumin dalam sampel ekstrak. Sebanyak 9 larutan sampel ekstrak (ekstrak etanol 96%; 80%; dan 70%, masing-masing 3 replikasi), diinjeksikan 5 kali ke dalam sistem UHPLC MS/MS. Luas area puncak yang didapatkan dari masing-masing injeksi sampel beserta perhitungan konsentrasi dan kadar kurkumin dapat dilihat pada lampiran 5. Didapatkan nilai kadar kurkumin rata-rata yang terkandung dalam sampel ekstrak 96%, 80% dan 70% berturut-turut adalah $17,64 \pm 2,10$ %; $16,98 \pm 2,49$ % dan $7,73 \pm 4,95$ %.

Nilai kadar kurkumin yang didapatkan dapat dilihat pada tabel 5.7.

Tabel 5.7 Nilai Kadar Kurkumin Sampel Ekstrak

No.	Sampel	Pengulangan ke-	Kadar setiap injeksi (%)	Rata-Rata Kadar (%) (n=5)	Rata-rata kadar (%) (n=15)	Kadar kurkumin dalam sampel (ppm)	RSD (%)
1.	Etanol 96%	1	17,53	17,61	17,64	$1,764 \times 10^5$	2,10
			17,64				
			17,90				
			17,32				
			17,69				
		2	17,56				
			17,20				
			17,37				
			17,72				
			17,44				
2.	Etanol 80%	3	18,03	17,86	16,98	$1,698 \times 10^5$	2,49
			17,11				
			18,60				
			17,90				
			17,67				
		1	16,89				
			16,97				
			16,84				
			17,45				
			16,67				
2	16,85						
	16,92						
	17,00						
	16,95						
	18,32						
3.	Etanol 70%	3	16,85	16,78	7,73	$7,73 \times 10^4$	4,95
			16,53				
			16,80				
			17,06				
			16,69				
		1	7,65				
			7,73				
			8,17				
			7,52				
			7,50				
2	7,50						
	7,18						
	7,37						
	7,92						
	7,12						
3	8,37						
	8,04						
	7,63						
	7,98						
	8,26						

Data kadar kurkumin yang didapatkan kemudian dilakukan analisis menggunakan *software IBM SPSS Statistics 20*. Uji normalitas dari data kadar kurkumin dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-wilk*, karena jumlah data sampel yang ada kurang dari 50. Uji normalitas dari data kadar kurkumin sampel didapatkan hasil dengan nilai $p < 0,01$ yang berarti distribusi data tidak normal. Kemudian dilakukan transformasi data menggunakan fungsi *Z score* dan *SD norm*, dan hasil uji normalitas dari transformasi data tersebut didapatkan hasil dengan nilai $p = 0,924$ yang berarti distribusi data normal. Hasil uji normalitas data kadar kurkumin dan data hasil transformasi dapat dilihat pada lampiran 6 gambar 1 dan 2. Uji homogenitas dari data hasil transformasi dilakukan dengan uji *Levene test* dan didapatkan hasil dengan nilai $p = 0,793$ yang berarti data homogen. Hasil uji homogenitas dapat dilihat pada lampiran 6 gambar 3.

Kemudian dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk menentukan adakah pengaruh antara perbedaan konsentrasi etanol terhadap kadar kurkumin. Hasil uji didapatkan nilai $p < 0,01$ yang berarti terdapat pengaruh penggunaan perbedaan konsentrasi pelarut etanol dalam maserasi kunyit terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak. Hasil uji *One Way ANOVA* dapat dilihat pada lampiran 6 gambar 4. Kemudian dilakukan uji *post-hoc tukey* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna. Hasil uji didapatkan nilai $p < 0,01$ dari semua perbandingan kelompok (antara kelompok sampel ekstrak 96%-80%; 96%-70%, dan 80%-70%) yang berarti setiap kelompok berbeda secara bermakna dibandingkan dengan kelompok lain. Hasil uji *post-hoc tukey* dapat dilihat pada lampiran 6 gambar 5.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Kunyit mengandung senyawa aktif kurkumin yang digunakan secara luas sebagai obat tradisional. Kunyit dimanfaatkan sebagai pengobatan beberapa penyakit, seperti dispepsia, penyakit rematik (*rheumatoid arthritis*), tukak lambung, epilepsi, asma, batuk, sakit kepala, gangguan hepar, dan lain-lain (*World Health Organization*, 1999). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan berbagai konsentrasi etanol pada proses maserasi terhadap kandungan kurkumin dalam ekstrak. Penelitian ini dilakukan dengan melakukan maserasi kunyit menggunakan 3 konsentrasi pelarut etanol yang berbeda, yaitu etanol 70%, etanol 80% dan etanol 96%.

Pemilihan metode maserasi dari beberapa metode ekstraksi yang lain adalah berdasarkan kelebihan metode maserasi, yaitu prosedurnya sederhana dan mudah dilakukan (Azwanida, 2015). Proses remaserasi (maserasi dengan pengulangan) dilakukan agar proses yang dilakukan lebih efisien dan banyak senyawa yang terekstrak, karena pada maserasi tunggal masih terdapat senyawa aktif yang tertinggal dengan jumlah yang cukup pada residu ekstrak (Singh, 2008).

Pemilihan pelarut untuk maserasi didasarkan pada kelarutan kurkumin. Kurkumin bersifat mudah larut pada etanol (NCBI, 2018).

Pemilihan pelarut etanol juga didasarkan pada data keamanan pelarut.

Etanol memiliki data toksisitas yang lebih kecil dibandingkan dengan, aseton dan petroleum eter (MSDS, 2013). Aseton dan petroleum eter juga dapat digunakan untuk maserasi kunyit (Jansirani dkk., 2014).

Persen randemen ekstrak yang didapatkan dari maserasi dengan pelarut etanol 96%, 80% dan 70% berturut-turut adalah 21,956%; 25,646%

dan 29,410%. Hal tersebut menunjukkan % randemen ekstrak kunyit dengan pelarut etanol 96% < pelarut etanol 80% < pelarut etanol 70%. Hasil ini

sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya, yaitu persen randemen ekstrak yang didapatkan dari maserasi kunyit menggunakan pelarut etanol 70% lebih

besar daripada maserasi dengan pelarut etanol 96% (Paulucci, dkk., 2013).

Hal ini diduga karena banyaknya amilum yang terkandung dalam rhizoma kunyit yang terlarut dalam pelarut air. Rhizoma kunyit mengandung banyak amilum (Indriyani, 2017). Amilum mudah larut dalam air (Tovarni, 2005).

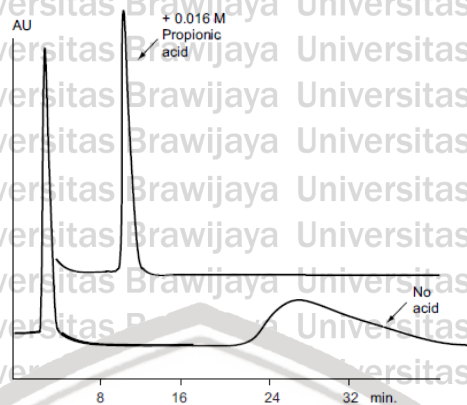
Ekstrak etanol kunyit yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan instrumen UHPLC MS/MS untuk menentukan kadar kurkumin.

Fase gerak yang digunakan pada analisis adalah 2 macam campuran fase gerak dengan metode elusi gradien. Fase gerak A terdiri dari 0,1% asam format dalam aquabidest, fase B terdiri dari 0,1% asam format dalam asetonitril. Kecepatan pemberian fase gerak adalah 300 µl/menit dan pengaturan perbandingan pemberian fase gerak dapat dilihat pada tabel 6.1.

Tabel 6.1 Kondisi Fase Gerak UHPLC-MS/MS

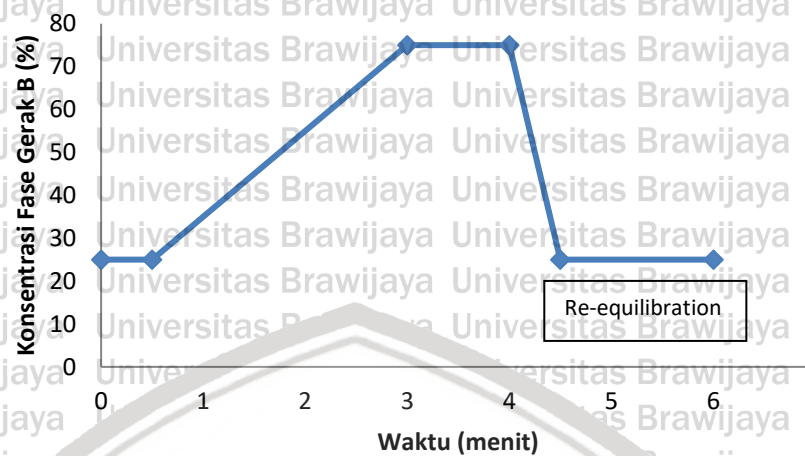
No.	Waktu (Menit)	A%	B%	µl/min
0	0.00	75.0	25.0	300.0
1	0.50	75.0	25.0	300.0
2	3.00	25.0	75.0	300.0
3	4.00	25.0	75.0	300.0
4	4.50	75.0	25.0	300.0
5	6.00	75.0	25.0	300.0

Pemberian fase gerak ini didasarkan pada pelarut yang biasa digunakan untuk analisis HPLC menggunakan fase terbalik atau *reversed phase* HPLC. Pada kondisi fase terbalik, fase diam yang digunakan bersifat hidrofobik dan fase gerak yang digunakan bersifat lebih polar (Hansen, dkk., 2012). Pada umumnya dalam operasi HPLC fase terbalik, digunakan 2 macam campuran pelarut yaitu pelarut A dan pelarut B. Pelarut A adalah pelarut air (*aqueous solvent*) dan pelarut B adalah pelarut organik (Guzzeta, 2001). Pada penelitian ini digunakan aquabidest sebagai pelarut A dan asetonitril sebagai pelarut B. Pelarut A dan pelarut B yang digunakan merupakan pelarut *grade pro hplc* dengan tambahan 0,1% asam format. Asam format digunakan untuk memperbaiki bentuk puncak kromatogram yang muncul dan untuk memberikan sumber proton pada kondisi operasi UHPLC MS/MS (Guzzeta, 2001). Pada kondisi pH netral, gugus silanol pada fase diam memiliki muatan negatif dan dapat berinteraksi dengan analit yang bermuatan positif. Interaksi ion ini lebih kuat daripada interaksi polar yang lain. Oleh karena itu, pelarut fase gerak akan sulit untuk meluluskan analit tersebut, sehingga dapat menyebabkan puncak yang mengekor (*tailing*). Untuk mengatasi hal ini, dapat dilakukan penambahan asam karboksilat ke dalam fase gerak. Asam karboksilat ini akan berkompetisi dengan analit dalam interaksi dengan fase diam sehingga dapat memberikan bentuk puncak kromatogram yang simetris (Hansen, dkk., 2012). Gambar pengaruh pemberian asam karboksilat pada fase gerak terhadap hasil puncak kromatogram dapat dilihat pada gambar 6.1.



Gambar 6.1 Pengaruh Pemberian Asam Karboksilat pada Fase Gerak Terhadap Hasil Puncak Komatogram (Hansen, dkk., 2012)

Kolom yang digunakan memiliki diameter sebesar 2,1 mm. Pada kolom dengan diameter tersebut, kecepatan fase gerak yang biasa digunakan adalah sekitar 200 $\mu\text{l}/\text{menit}$ (Guzzeta, 2001). Pada penelitian ini digunakan kecepatan fase gerak sebesar 300 $\mu\text{l}/\text{menit}$. Fase gerak pelarut B diberikan dengan perbandingan yang berbeda pada setiap menitnya, dengan pemberian 25% pada menit ke-0 hingga ke-0,5; diberikan 75% pada menit ke-3 hingga ke-4; dan diberikan 25% pada menit ke-4,5 hingga ke-6. Perbandingan pemberian fase gerak pelarut B dapat dilihat pada gambar 6.2. Pemberian fase gerak pelarut B yang menurun pada menit terakhir (menit ke-4,5 hingga ke-6) dilakukan untuk melakukan keseimbangan ulang (*re-equilibration*) ke keadaan awal, yaitu saat konsentrasi pelarut A (aquabidest) lebih banyak konsentrasinya dan kondisi ini dilakukan sebelum analisis yang lain dapat dilakukan. Waktu yang dibutuhkan untuk melakukan *re-equilibration* biasanya adalah seperempat waktu terakhir dari waktu total (Guzzeta, 2001). Pada penelitian ini, waktu dari *re-equilibration* adalah 1,5 menit dari waktu total 6 menit.

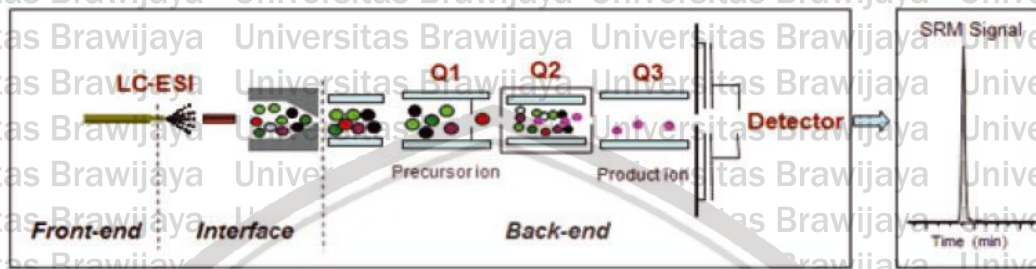


Gambar 6.2 Konsentrasi Pemberian Fase Gerak B, Re-equilibration Terjadi pada Menit ke-4,5 Hingga ke-6

Detektor yang digunakan pada sistem UHPLC pada penelitian ini adalah *tandem mass spectrophotometry* (disebut juga sebagai *double MS* atau *MS/MS*) tipe *triple quadropole* (atau disebut juga *QqQ* atau *triple Q*) dengan menggunakan sumber ionisasi *ESI (Electrospray Ionization)* yang dioperasikan dengan ionisasi mode positif. Metode yang digunakan untuk penentuan senyawa yang ditarget adalah metode *SRM (Selected Reaction Monitoring)*.

Sistem *triple quadropole* biasa digunakan untuk analisa kuantitatif. Sistem ini bersifat sangat sensitif dan merupakan sistem analisa multi komponen yang berkelanjutan. Pada instrumen *triple quadropole*, *quadropole* pertama (*Q1*) digunakan untuk menyeleksi atau memilih ion prekursor. Pada *quadropole* kedua (*Q2*) terjadi fragmentasi prekursor ion dari *Q1*, fragmentasi ini terjadi melalui proses *CID (collision-induced dissociation)*. Fragmentasi dari ion analit ini dilakukan untuk mendapatkan informasi struktural dan untuk mendapatkan molekul yang spesifik. Fragmentasi ion ini terjadi dengan cara menembakkan molekul netral ke ion tersebut. *Quadropole* ketiga (*Q3*)

digunakan untuk menyeleksi atau memilih ion dari Q2 dan selanjutnya akan ditransmisikan ke detektor (Shi dkk., 2012). Skema dari sistem MS/MS *triple quadrupole* dengan ionisasi ESI dapat dilihat pada gambar 6.3.

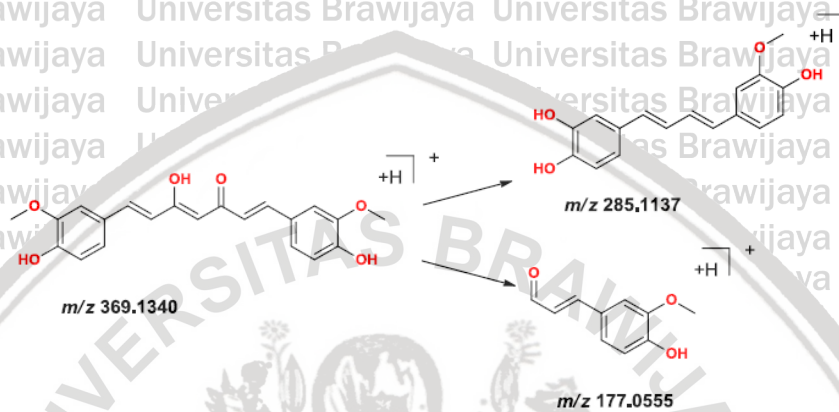


Gambar 6.3 Skema Sistem MS/MS Triple Quadrupole dengan Ioniasi ESI (Shi dkk., 2012)

Ekstrak yang didapatkan ditetapkan kadarnya menggunakan instrumen UHPLC-MS/MS. Sebelum penetapan kadar, dilakukan validasi metode terlebih dahulu. Tujuan dari validasi metode adalah untuk melakukan verifikasi bahwa parameter kinerja dari instrumen cukup mampu untuk mengatasi masalah analisis (Sudjaji, 2007). Validasi metode yang dilakukan meliputi parameter selektivitas, linieritas, akurasi, presisi, LOD dan LOQ.

Selektivitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang ada pada sampel yang didalamnya terdapat komponen lain seperti pengotor, produk degradasi, dan komponen matriks (*International Conference on Harmonisation*, 2005). Dari hasil didapatkan nilai waktu retensi kurkumin baku standar, sampel ekstrak etanol 96%; 80%; dan 70% berturut-turut adalah pada menit ke-3,195; 3,202; 3,220; dan 3,214, yang berarti waktu retensi dari larutan baku standar dan larutan sampel hampir sama. Penentuan senyawa yang ditarget (senyawa kurkumin) dilakukan dengan metode SRM, dimana bahwa senyawa yang ditargetkan memiliki *parent mass* 369, dengan target massa *quantifier* 285 dan massa *qualifier* 177. Nilai m/z kurkumin adalah 369,1340 pada ionisasi mode positif. Kurkumin memiliki 2 fragmen ion utama yaitu ion yang

memiliki nilai m/z 285,1137 dan 177,0555 (Liu dkk., 2016). Hal ini berarti, puncak kromatogram yang muncul dari hasil setiap injeksi sampel merupakan kurkumin. Struktur kimia dari kurkumin dan fragmen ion utama kurkumin dapat dilihat pada gambar 6.4.



Gambar 6.4 Struktur Kimia Kurkumin dan Fragmen Ion Utama Kurkumin (Liu dkk., 2016)

Linieritas merupakan kemampuan memperoleh hasil uji yang proporsional terhadap konsentrasi dari analit pada sampel pada rentang yang diberikan. Linieritas dilakukan untuk memastikan bahwa plot respon detektor linier terhadap konsentrasi yang ada (*International Conference on Harmonisation*, 2005). Pada penelitian ini telah dilakukan uji linieritas dengan menggunakan 5 konsentrasi larutan baku standar yang berbeda yaitu 0,25; 0,5; 1; 2; dan 4 ppm. ICH memberikan ketentuan untuk uji linieritas, bahwa minimum digunakan 5 konsentrasi yang berbeda (*International Conference on Harmonisation*, 2005). Luas area yang muncul pada kromatogram kemudian diplotkan terhadap nilai konsentrasi yang diinjeksikan. Grafik linieritas dapat dilihat pada gambar 5.7. Persamaan garis linear yang didapatkan adalah $y = 58350x - 1080,64$ dengan nilai koefisien korelasi (r^2) sebesar 0,99997, dimana nilai r^2 yang didapatkan sesuai dengan nilai yang diperbolehkan. Nilai r^2 yang lebih dari 0,998 dinilai telah sesuai atau merupakan nilai yang

diperbolehkan dari data regresi linear (Christian dkk., 2014). Linieritas juga dapat ditentukan melalui nilai koefisien variasi dari fungsi (V_{x_0}). Perhitungan nilai V_{x_0} dapat dilihat pada tabel 5.3. Nilai V_{x_0} yang didapatkan adalah 0,54%, dimana nilai V_{x_0} yang didapatkan sesuai dengan nilai yang diperbolehkan.

Nilai V_{x_0} tidak boleh melebihi 5% (Yuwono & Indrayanto, 2005).

LOD atau batas deteksi adalah konsentrasi terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi oleh instrumen. LOQ atau batas kuantifikasi adalah konsentrasi terendah dalam sampel yang masih dapat diukur oleh instrumen (Sudjaji, 2007). Berdasar hasil perhitungan, didapatkan nilai LOD adalah 0,03 ppm dan nilai LOQ adalah 0,08 ppm.

Akurasi menyatakan kedekatan antara nilai yang terukur (baik nilai konvensional, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan) dengan nilai yang diterima. Presisi adalah ukuran dari keterulangan metode analisis antara beberapa pengujian pengukuran yang didapat dari beberapa sampel yang homogen (*International Conference on Harmonisation*, 2005). Rentang persen *recovery* dan rentang nilai RSD maksimum yang diperbolehkan oleh AOAC *Guideline* dapat dilihat pada tabel 5.4. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi larutan baku standar yang berkisar pada 1 $\mu\text{g/ml}$, sehingga nilai persen *recovery* yang diperbolehkan adalah 75-120% dan nilai RSD maksimum yang diperbolehkan adalah 8%. Dari hasil perhitungan, didapatkan nilai %*recovery* mulai dari 96,72% hingga 106,38% dan didapatkan nilai %RSD mulai dari 1,09% hingga 4,37%. Hal ini berarti nilai %*recovery* dan %RSD yang ada telah memenuhi persyaratan.

Setelah dilakukan validasi metode, didapatkan hasil bahwa parameter validasi yang dilakukan telah memenuhi syarat, sehingga validasi metode

yang dilakukan telah valid. Kemudian dilakukan penetapan kadar kurkumin dari ekstrak etanol kunyit. Nilai kadar kurkumin dinyatakan dalam %gram/gram (%gram kurkumin dalam 1 gram ekstrak). Didapatkan nilai kadar kurkumin rata-rata yang terkandung dalam sampel ekstrak etanol 96%; 80% dan 70% berturut-turut adalah $17,64 \pm 2,10$ %; $16,98 \pm 2,49$ % dan $7,73 \pm 4,95$ %. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Lee, dkk., (2013) pengukuran kadar kurkumin dalam ekstrak kunyit menggunakan instrumen HPLC MS didapatkan hasil bahwa kadar yang didapatkan adalah berkisar 6,48% hingga 7,86% (Lee dkk., 2013). Perbedaan hasil ini diduga karena perbedaan metode pada proses ekstraksi yang dilakukan.

Data kadar kurkumin yang didapatkan kemudian dilakukan analisis menggunakan *software IBM SPSS Statistics 20*. Uji normalitas dari data kadar kurkumin dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-wilk*, karena jumlah data sampel yang ada kurang dari 50. Uji normalitas dari sta kadar kurkumin didapatkan hasil dengan nilai $p < 0,01$ yang berarti distribusi data tidak normal. Kemudian dilakukan transformasi data menggunakan fungsi *Z score* dan *SD norm*, dan hasil uji normalitas dari transformasi data tersebut didapatkan hasil dengan nilai $p = 0,924$ yang berarti distribusi data normal. Hasil uji normalitas data kadar kurkumin dan data hasil transformasi dapat dilihat pada lampiran 6 gambar 1 dan 2. Uji homogenitas dari data hasil transformasi dilakukan dengan uji *Levene test* dan didapatkan hasil dengan nilai $p = 0,793$ yang berarti data homogen. Hasil uji homogenitas dapat dilihat pada lampiran 6 gambar 3.

Kemudian dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk menentukan adakah pengaruh antara perbedaan konsentrasi etanol terhadap kadar kurkumin.

Hasil uji didapatkan nilai $p < 0,01$ yang berarti terdapat pengaruh penggunaan perbedaan konsentrasi pelarut etanol dalam maserasi kunyit terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak. Hasil yang didapatkan ini sesuai dengan hipotesa. Hasil uji *One Way ANOVA* dapat dilihat pada lampiran 6 gambar 4. Kemudian dilakukan uji *post-hoc tukey* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna. Hasil uji didapatkan nilai $p < 0,01$ dari semua perbandingan kelompok (antara kelompok sampel ekstrak 96%-80%; 96%-70%, dan 80%-70%) yang berarti setiap kelompok berbeda secara bermakna dibandingkan dengan kelompok lain. Hasil uji *post-hoc tukey* dapat dilihat pada lampiran 6 gambar 5.

Kadar kurkumin yang didapatkan dari ekstrak etanol 96% > ekstrak etanol 80% > ekstrak etanol 70%. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Paulucci, dkk., (2013) menunjukkan bahwa kadar kurkumin yang didapatkan dari maserasi kunyit dengan pelarut etanol 96% lebih besar daripada etanol 70% yang diukur menggunakan instrumen HPLC dengan detektor PDA (*photodiode array*) (Paulucci, dkk., 2013). Hasil ini diduga karena sifat kurkumin yang mudah larut dalam etanol dan sukar larut air. Berdasarkan data kelarutan, kurkumin sangat mudah larut pada etanol dan sukar larut dalam air. Kelarutan kurkumin dalam air adalah 3,12 mg/L pada suhu 25°C. (NCBI, 2018).

Syarat kadar kurkuminoid dari ekstrak kental rimpang kunyit adalah tidak kurang dari 33,90% dihitung sebagai kurkumin dengan penetapan kadar menggunakan instrumen kromatografi lapis tipis (Menkes RI, 2009). Pada penelitian ini kadar kurkumin yang didapatkan kurang dari 33,90%. Diduga kadar kurkumin yang kurang memenuhi persyaratan disebabkan oleh

beberapa faktor. Menurut Paulucci, dkk., (2013) faktor maserasi yang paling mempengaruhi kadar kurkumin adalah konsentrasi pelarut etanol yang digunakan dan waktu maserasi. Maserasi kunyit dengan pelarut etanol 96% menghasilkan kadar kurkumin yang lebih besar daripada menggunakan pelarut etanol 70%. Waktu maserasi dapat berpengaruh terhadap kadar kurkumin yang didapatkan. Semakin lama waktu maserasi, semakin rendah kadar kurkumin yang didapatkan. Hal ini diduga karena terdapat degradasi kurkumin saat proses maserasi berlangsung (Paulucci, dkk., 2013). Menurut Sogi, dkk., (2010) beberapa faktor maserasi yang dapat mempengaruhi kadar kurkumin yang didapatkan adalah suhu, ukuran partikel serbuk yang digunakan, waktu pengadukan dan perbandingan sampel dan pelarut yang digunakan. Kondisi maserasi yang optimal adalah suhu maserasi 60° C, ukuran partikel sampel sebesar 0,042 mm, waktu pengadukan sebesar 30 menit dan perbandingan saampel serbuk kunyit terhadap pelarut yang digunakan adalah 1:50 (Sogi, dkk., 2010).

Sampel yang digunakan juga dapat mempengaruhi kadar kurkumin yang didapatkan. Hal ini berkaitan dengan perbedaan kondisi lingkungan pertumbuhan tanaman kunyit. Beberapa faktor lingkungan seperti suhu, kelembapan, intensitas cahaya, suplai air, mineral dan karbon dioksida mempengaruhi pertumbuhan tanaman dan produksi metabolit sekunder (Ramakrishna dan Ravishankar, 2011). Kandungan kurkumin pada kunyit juga dapat disebabkan oleh kandungan mineral dalam tanah dan pemberian pupuk. Menurut Akamine, dkk., (2007) pemberian pupuk NPK secara bersama dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman kunyit hingga 6 kali lipat dan dapat

meningkatkan kandungan kurkumin hingga 9 kali lipat jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (tanpa pemberian pupuk) (Akamine, dkk., 2007).

6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian

Dari hasil data yang didapatkan pada penelitian ini, prosedur maserasi kunyit menggunakan berbagai perbedaan konsentrasi pelarut yang telah dilakukan dapat digunakan sebagai sumber informasi untuk beberapa industri farmasi dalam melakukan maserasi kunyit. Prosedur operasi UHPLC MS/MS yang digunakan dalam penelitian ini dalam bidang kefarmasian dapat digunakan sebagai prosedur penetapan analisis kurkumin dalam ekstrak kunyit.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dari penelitian ini antara lain adalah kondisi maserasi yang dilakukan kurang optimal. Hal ini dapat menyebabkan rendahnya kadar kurkumin yang didapatkan pada hasil ekstraksi. Berdasarkan keterbatasan penelitian tersebut, penelitian ini dapat dikembangkan untuk penelitian selanjutnya dengan menguji variabel pada kondisi maserasi yang mungkin berpengaruh terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak seperti suhu maserasi, ukuran partikel sampel serbuk kunyit, perbandingan sampel serbuk kunyit terhadap pelarut, dan waktu pengadukan.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. metode analisa kurkumin dalam ekstrak kunyit menggunakan instrumen UHPLC-MS/MS menggunakan fase diam C_{18} dan fase gerak 0,1% asam format dalam aquabidest dan 0,1% asam format dalam asetonitril memenuhi persyaratan parameter validitas (selektivitas, linieritas, LOD, LOQ, akurasi dan presisi),
2. konsentrasi pelarut etanol pada proses maserasi berpengaruh terhadap perbedaan kandungan kurkumin dalam ekstrak.

7.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menguji variabel pada kondisi maserasi yang mungkin berpengaruh terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak seperti suhu maserasi, ukuran partikel sampel serbuk kunyit, perbandingan sampel serbuk kunyit terhadap pelarut, dan waktu pengadukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aditama T.Y. 2014. *Jamu dan Kesehatan*. Jakarta: Lembaga Penerbit Balitbangkes.
- Akamine H., dkk. 2007. Effects of Application of N, P and K Alone or in Combination on Growth, Yield and Curcumin Content of Turmeric (*Curcuma longa* L.). *Journal Plant Product Science*, Vol. 1, hal. 151-154.
- Ammon H.P.T. dan Wahl M.A., 1990. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Journal Planta Medicine*, vol. 57, hal. 1-7.
- Anindya B., Anusree R., Prosenjit M., dan Tausif A. 2015. Curcumin Extraction : Best Solvent on the Basis of Spectrophotometric Analysis. *Universal Journal of Pharmacy*, vol. 04, Issues 02, hal. 48-52.
- AOAC Guidelines. 2012. *Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals*. (Online). (<https://www.aoac.org/>, diakses tanggal 14 Agustus 2018).
- Azwanida. 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Strength and Limitation. *Journal of Medicinal & Aromatic Plants*, vol. 4, hal. 1-6.
- Braga M. E. M., Leal P. F., Carvalho J. E., dan Meireles M. A. A. 2003. Comparison of Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extracts Obtained Using Various Techniques. *Journal Agricultural Food Chemistry*, vol. 51, Issues 22, hal. 6604-6611.
- Cahyono B., Huda M.D.K., dan Limantara L., 2011. Pengaruh Proses Pengeringan Rimpang Temulawak Terhadap Kandungan dan Komposisi Kurkumionid. *Jurnal Reaktor*, vol. 13, hal. 165-171.
- Chaucan S.K., Singh B.P., dan Agrawala S., 1998. Estimation of Curcuminoids in *Curcuma Longa* by HPLC and Spectrophotometric Methods. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, hal. 58-60.
- Chignell C.F., Bilski P., Reszka K.J., Motten A.G., Sik R.H. dan Dahl T.A., 1994. Spectral and Photochemical Properties of Curcumin. *Photochemistry and Photobiology*, vol. 59 hal. 295-302
- Christian G.D., Dasgupta P.K.S., dan Schug K.A., 2014. *Analytical Chemistry seventh edition*. New York: John Wiley & Sons Ltd.

Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

Depkes RI. 2014. *Farmakope Indonesia Edisi V*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

Eva G., Joaquim J., Silvia L., dan Roma T. 2016. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: overview and workflow. *Journal Trends in Analytical Chemistry*, hal 1-88.

Guzzeta, Andrew. 2001. *Reverse Phase HPLC basics for LC/MS*. (Online). (<https://www.ionsource.com/tutorial/chromatography/rphplc.htm>, diakses tanggal 12 November 2018).

Hansen S., Bjergaard S.P., dan Rasmussen K., 2012. *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*. New York: John Wiley & Sons Ltd.

Harmita, 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, vol. 1, no. 3, hal. 117-135.

Indriyani, S. 2017. Secretary Structure and Histochemistry Test of Some Zingiberaceae Plants. *AIP Publishing*, hal. 1-6.

International Conference on Harmonisation, 2005. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(r1)*. (Online). (https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf, diakses tanggal 15 Mei 2018).

Jadhav B.K., Mahadik K.R., dan Paradkar A.R., 2007. Development and Validation of Improved Reversed Phase-HPLC Method for Simultaneous Determination of Curcumin, Demethoxycurcumin and Bis-Demethoxycurcumin. *Journal Chromatographia*, hal. 483-488.

Jansirani D., Saradha R., Salomideborani N., dan Selvapriyadharsini J. 2014. Comparative evaluation of various extraction methods of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Science*, hal. 286-288.

Khopkar S.M., 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.

Lal J., 2012. Turmeric, Curcumin and Our Life : A review. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, vol. 1 hal. 11-17.

Lee K. J., Kim Y. S., dan Ma J. Y. 2013. Separation and Identification of Curcuminoids from Asian Turmeric (*Curcuma longa* L.) Using RP-HPLC and LC-MS. *Asian Journal Of Chemistry*, Vol. 25, No. 2, hal. 1-4.

Li J., Jiang Y., Wen J., Fan G., Wu Y., dan Zhang C., 2009. John Wiley & Sons, Ltd. A Rapid and Simple HPLC Method for the Determination of Curcumin

in Rat Plasma: Assay Development, Validation and Application to a Pharmacokinetic Study of Curcumin Liposome. *Jurnal Biomedical Chromatography*, hal. 1201-1207.

Liu, F., dkk., 2016. Discriminating from species of Curcumae Radix (Yujin) by a UHPLC/Q - TOFMS - based metabolomics approach. *Journal of Chinese Medicine*, vol 11, hal. 1 – 11.

Material Safety Data Sheet. 2013. *Ethyl alcohol 200 Proof MSDS*, (Online). (<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9923955>, diakses 08 Agustus 2018).

McKenna A. 2015. *Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)*. (Online). (<https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/tandem-ms>, diakses tanggal 20 November 2018)

Menkes RI. 2009. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta: Menteri Kesehatan RI.

NCBI. *PubChem Compound Database; CID=969516*, (Online). (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/969516>, diakses 29 April 2018).

Paulucci V. P., Couto R. O., Teixeira C. C. C., dan Freitas L. A. P. 2013. Optimization of the extraction of curcumin from Curcuma longa Rhizomes. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 23, no. 1, hal. 94-100.

Piontek J. C., Zalewski P., Jelinska A., dan Garbacki P. 2013. UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographia*, hal. 1429-1437.

Priyadarsini K.I. 2014. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Journal Molecules* p. 20112-20112.

Ramakrishna A. dan Ravishankar A. 2011. Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants. *Journal Plant Signaling & Behaviour*, Vol. 11, hal. 1720-1731.

Salem M., Rohani S., Gillies E.R., 2014. Curcumin, a Promising Anti-Cancer Therapeutic: A Review of its Chemical Properties, Bioactivity and Approaches to Cancer Cell Delivery. *RSC Advances*, vol. 4 hal. 1-50.

Sarker, S.D. dan Nahar, L., 2012. Initial and Bulk Extraction of Natural Products Isolation. *Journal Natural Products Isolation*, hal. 27 -41.

Singh J., 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, Chapter 3: Maceration, Percolation and Infusion Techniques for the Extraction of Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: ICS-UNIDO.

Shi T., dkk., 2012. Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics. *Journal Proteomics*, vol. 12, hal. 1074-1092.

Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., dan Crouch S.R., 2004. *Fundamentals of Analytical Chemistry eighth edition*. Singapore : Thomson Brooks/Cole.

Sogi D. S., Sharma S., Oberoi D. P. S., dan Wani I. A. 2010. Effect of Extraction Parameters on Curcumin Yield from Turmeric. *Journal Food Science Technology*, vol. 3, hal. 300-304.

Sudjaji, 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Belajar.

Syed H.K., Liew K. B., Loh G.O.K., dan Peh K.K. 2015. Stability Indicating HPLC-UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. *Journal Food Chemistry*, hal. 321-326.

Tonnesen H.H. dan Karlsen J., 1985. Studies on Curcumin and Curcuminoids V, Alkaline Degradation of Curcumin. *Z Lebensm Unters Forsch*, hal. 132-134.

Tovarni. 2005. *Safety Data Sheet: Starch Soluble*, (Online). (<http://www.lachner.com/files/Starch%20soluble.pdf>, diakses tanggal 04 Desember 2018).

United States Pharmacopeia and National Formulary, 2017. *United State Pharmacopeia 40 and National Formulary 35*. (Online). (https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c1225_1SUSP40.pdf, diakses tanggal 15 Mei 2018).

Winslow L.C. dan Kroll D., 1998. Herbs as Medicines. *Jurnal Arch Intern Medicine*, vol. 158, hal. 2192-2199.

Wichitnithad W., Jongaroonngamsang N., Pummangura S. dan Rojsitthisak P., 2009. A Simple Isocratic HPLC Method for the Simultaneous Determination of Curcuminoids in Commercial Turmeric Extracts. *Journal Phytochemical Analysis*, hal. 314-319.

World Health Organization, 1999. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants Volume 1*. Malta : WHO graphic.

Yuwono M. Dan Indrawanto G. 2005. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. *Journal Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, vol. 32, hal. 243-259.