

**PENETAPAN KADAR KURKUMIN METODE HPLC DENGAN
VARIASI METODE EKSTRAKSI MASERASI DAN**

**REMASERASI PADA EKSTRAK RIMPANG TANAMAN
KUNYIT (*Curcuma domestica*)**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



Oleh:

Sofia Salsabila

NIM 175070501111013

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENETAPAN KADAR KURKUMIN METODE HPLC DENGAN
VARIASI METODE EKSTRAKSI MASERASI DAN
REMASERASI PADA EKSTRAK RIMPANG TANAMAN
KUNYIT (*Curcuma domestica*)**

Oleh:

Sofia Salsabila

NIM. 175070501111013

Telah diuji pada

Hari: Selasa

Tanggal: 08 Juni 2021

Penguji-I

apt. Uswatun Khasanah, S. Farm., M.Farm.

NIP. 2011068512222001

Pembimbing-I/Penguji-II.

apt. Bactiar Rifai P.I., S.Farm., M.Farm.

NIP. 198709292019031007

Pembimbing-II/Penguji-III

apt. Alvan F.S., S.Farm., M.Farm.

NIP. 198502182019031007

Mengetahui,

Ketua Program Studi Sarjana Farmasi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya



apt. Alvan F.S., S.Farm., M.Farm.

NIP. 198502182019031007

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sofia Salsabila

NIM : 175070501111013

Program Studi: Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang,

Yang membuat pernyataan,

A handwritten signature in black ink is written over a yellow postage stamp. The stamp features the Garuda Pancasila emblem and the text 'SEBUAH RIBU ALPAM', '2000', '20 METERAI TEMPEL', and the alphanumeric code 'A9275AJX261520683'.

(Sofia Salsabila)

NIM. 175070501111013

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT, berkat rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul Penetapan Kadar Kurkumin Metode HPLC dengan Variasi Metode Ekstraksi Maserasi dan Remaserasi Pada Ekstrak Rimpang Tanaman Kunyit (*Curcuma domestica*) selama pandemi COVID-19 berlangsung. Alasan penulis memilih topik ini adalah adanya bermacam-macam metode ekstraksi dengan metode yang paling sering digunakan adalah maserasi, namun waktu yang dibutuhkan untuk melakukan metode maserasi cukup lama sehingga dibandingkan dengan metode remaserasi dan tanaman kunyit dipilih dikarenakan tanaman kunyit mudah dijumpai di Malang dan mengandung senyawa kurkumin yang memiliki banyak manfaat. Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar kurkumin yang terkandung pada ekstrak tanaman kunyit dengan perbedaan metode ekstraksi maserasi dan remaserasi. Penyelesaian Tugas Akhir ini tidak lepas dari dukungan banyak pihak yang senantiasa selalu memberikan *support* dan motivasi. Oleh karena itu, pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. apt. Alvan Febrian Shalas, S. Farm., M. Farm., selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan selaku pembimbing II yang telah memberikan pengarahan dan pembelajaran yang membangun selama perkuliahan serta telah bersedia meluangkan waktu untuk memberikan saran dan masukan dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
2. apt. Bachtiar Rifai P. I., S.Farm., M.Farm., selaku dosen pembimbing I yang dengan sabar telah membimbing selama proses tugas akhir berlangsung dengan memberikan saran dalam penulisan, analisis data, senantiasa memberi ilmu, dan selalu memberikan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
3. apt. Hananditia Rachma Pramestutie, S.Farm., M.Farm. Klin., selaku Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB yang telah membantu melancarkan pelaksanaan tugas akhir ini.
4. Seluruh pihak pengajar Program Studi Sarjana Farmasi yang dengan ikhlas dan sabar memberikan ilmu selama proses perkuliahan, membagikan pengalaman untuk dijadikan pelajaran ke depannya serta selalu memberikan nasehat yang bermanfaat untuk proses menjadi dewasa dan manusia yang lebih baik.
5. Para laboran di Laboratorium Farmasi yang telah membantu kelancaran selama penelitian berlangsung dalam pandemi COVID-19 dengan peraturan-peraturan baru dikarenakan adanya protokol kesehatan.

6. Orang tua penulis, Badrukhan dan Sri Wulandari, yang selalu mengirim doa dan memberikan semangat dukungan baik secara langsung maupun tidak langsung untuk keberhasilan tugas akhir ini dan keberhasilan hidup penulis.
7. Adik penulis, Roihan Rajabi yang memberikan semangat secara tidak langsung.
8. Saudara-saudara penulis dan para tetangga yang selalu bertanya perkembangan kuliah dan mendoakan yang terbaik untuk penulis.
9. Penghuni grup Farmasi-A (bukan bid(A)n A) dan Punggawa Adikarya (Farmasi 2017) yang telah mengisi hari-hari penulis selama 4 tahun terakhir dan memberikan semangat dalam proses perkuliahan yang sayangnya belum bisa bertemu dikarenakan pandemi hingga penulis menulis naskah ini.
10. Teman-teman dekat penulis (Mildha, Rupti, Mela, Lisa, Anggun, Dita) yang menjadi tempat bercerita dan memberikan saran dan dukungan kepada penulis.
11. Teman-teman penulis pada tim HPLC (Racha dan Nida) yang menemani hari-hari penulis selama pandemi COVID-19 dalam pengambilan data dan pengolahan data serta penulisan naskah dan selalu memberikan semangat.
12. Teman di laboratorium, tim antosianin Mbak Alip dan Nadila yang telah berjuang bersama selama proses tugas akhir berlangsung.
13. Teman-teman *online* penulis, Meng, Cendol (Dhe), Joe, Nyam, Echa dan banyak lainnya, yang bersedia menjadi tempat cerita penulis, pemberi dukungan dan mendoakan penulis dalam sehari-harinya maupun dalam tugas akhir ini.
14. Seluruh pihak yang mendoakan terselesaikannya tugas akhir ini dan memberikan semangat selama prosesnya.

Penulis mengetahui bahwa dalam penulisan tugas akhir ini tidak sempurna dan banyak kurangnya, sehingga penulis sangat menerima apabila ada kritik dan saran dari pembaca. Semoga tugas akhir yang telah dikerjakan oleh penulis dapat berguna bagi pembaca dan yang membutuhkan. Semoga bermanfaat dan semoga pandemi cepat berlalu.

Malang, 19 Mei 2021

Penulis

ABSTRAK

Salsabila, Sofia. 2021. *Penetapan Kadar Kurkumin Metode HPLC dengan Variasi Metode Ekstraksi Maserasi dan Remaserasi Pada Ekstrak Rimpang Tanaman Kunyit (Curcuma domestica)*. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) apt. Bachtiar Rifai Pratita Ihsan, S.Farm., M.Farm. (2) apt. Alvan Febrian Salas, S.Farm., M.Farm.

Ekstraksi merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menarik senyawa kurkumin pada tanaman kunyit (*Curcuma domestica*). Salah satu metode ekstraksi kurkumin yang umum digunakan adalah maserasi. Namun, metode maserasi memiliki kelemahan, untuk melakukan ekstraksi yang efektif dibutuhkan waktu yang cukup lama. Alternatif lain yang dapat dilakukan adalah dengan melakukan remaserasi dan untuk mengetahui keefektifan metode ekstraksi yang digunakan, dilakukan penetapan kadar kurkumin dengan instrumen HPLC. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil penetapan kadar kurkumin pada ekstrak etanol 96% rimpang kunyit yang diekstraksi dengan metode maserasi selama 12 jam dan metode remaserasi dengan total waktu 9 jam dengan pergantian pelarut setiap 3 jam. Sampel dipreparasi dengan pelarut metanol yang kemudian dianalisis dengan kondisi HPLC: fase gerak asetonitril:asam asetat glasial 1% dalam air (pH 2,660) 45:55 yang diatur isokratis, laju alir 1 mL/menit, suhu kolom 30°C, volume injeksi sampel 20 µL, detektor PDA pada panjang gelombang 190-800 nm dan waktu *running* 15 menit. Parameter validasi metode yang dilakukan adalah selektivitas (λ_{maks} standar dan analit 427 nm; waktu retensi standar dan analit $\pm 12,5$ menit; resolusi sampel $\pm 1,8$), linearitas ($y = 157248,21x - 138875,27$; $r = 0,9999$), LOD (0,875 ppm), LOQ (2,653 ppm), akurasi (98,72%-99,57%), dan presisi (0,54%-1,15%) yang diketahui telah memenuhi spesifikasi. Kadar kurkumin ekstrak etanol 96% rimpang kunyit pada kelompok metode maserasi rata-rata adalah $21,175 \pm 0,420$ %b/b dan pada kelompok metode remaserasi rata-rata adalah $21,242 \pm 0,177$ %b/b, dimana hasil uji beda Mann-Whitney menunjukkan hasil $p > 0,05$ yang artinya tidak ada perbedaan yang signifikan antara ekstraksi kunyit dengan metode maserasi dan metode remaserasi.

Kata kunci: Kurkumin, Kunyit (*Curcuma domestica*), Ekstraksi, Maserasi, Remaserasi, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

ABSTRACT

Salsabila, Sofia. 2021. *Determination of Curcumin Content in the Turmeric (*Curcuma domestica*) Rhizome Extract with Variations of Extraction Method Maceration and Remaceration by HPLC*. Final Project, Bachelor of Pharmacy Study Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisor: (1) apt. Bachtiar Rifai Pratita Ihsan, S.Farm., M.Farm. (2) apt. Alvan Febrian Salas, S.Farm., M.Farm.

Maceration is one of extraction method that widely used to separate curcumin in turmeric (*Curcuma domestica*). Maceration method needs a long time to perform an effective extraction and the alternative that can be used to perform more effective extraction beside maceration is remaceration. Curcumin content was determined to know the effectiveness of the extraction method by HPLC. The aim of this work was to study the curcumin content content in 96% ethanolic extract that extracted by maceration method for 12 hours and remaceration method with a total time of 9 hours with a change of solvent every 3 hours. The sample was prepared using methanol as the solvent, then the solution was analyzed by HPLC with isocratic elution of acetonitrile: glacial acetic acid 1% in water (pH 2,660) 45:55 at a flow rate 1 mL/min, a column temperature of 30°C, sample injection volume at 20 μ L, PDA detection at 190-800 nm and running time 15 minutes each analysis. The result of the validation method parameters were known to have met the specifications with selectivity test (λ_{\max} at 427 nm; retention time at ± 12.5 minutes; sample resolution ± 1.8), linearity test ($y = 157248.21x - 138875.27$; $r = 0,9999$), LOD (0.875 ppm), LOQ (2.653 ppm), accuracy (98.72%-99.57%), and precision (0.54%-1.15%). Curcumin content in the maceration group were 21.175 ± 0.420 %w/w in average and in the remaceration group were 21.242 ± 0.177 %w/w in average, where the Mann-Whitney test results showed the significance level was $p > 0.05$, which means that there is no significant difference between the extraction of turmeric with the maceration method and the remaceration method.

Keywords: Curcumin, Turmeric (*Curcuma domestica*), Extraction, Maceration, Remaceration, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

DAFTAR ISI

Halaman

Halaman Judul..... i

Halaman Pengesahan..... ii

Pernyataan Keaslian Tulisan..... iii

Kata Pengantar..... iv

Abstrak..... vi

Abstract..... vii

Daftar Isi..... viii

Daftar Tabel..... xi

Daftar Gambar..... xii

Daftar Lampiran..... xiii

Daftar Singkatan..... xiv

BAB 1. PENDAHULUAN..... 1

1.1 Latar Belakang Masalah..... 1

1.2 Rumusan Masalah..... 4

1.3 Tujuan Penelitian..... 5

1.4 Manfaat Penelitian..... 5

1.4.1 Manfaat akademik..... 5

1.4.2 Manfaat praktisi..... 5

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA..... 6

2.1 *Curcuma domestica* Rhizome (Rimpang Kunyit)..... 6

2.2 Kurkumin..... 9

2.3 HPLC (*High Performance Liquid Chromathography*)..... 11

2.4 Validasi Metode..... 12

2.4.1 Selektivitas..... 13

2.4.2 Linearitas..... 13

2.4.3 Akurasi..... 14

2.4.4 Presisi..... 15

2.4.5 LOD (*Limit of Detection*)..... 16

2.4.6 LOQ (*Limit of Quantitation*)..... 17

2.5 Ekstraksi.....	17
2.5.1 Maserasi.....	20
2.5.2 Remaserasi.....	23
BAB 3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN.....	24
3.1 Kerangka Konsep.....	24
3.2 Hipotesis Penelitian.....	26
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	27
4.1 Rancangan Penelitian.....	27
4.2 Populasi dan Sampel.....	27
4.3 Variabel Penelitian.....	27
4.4 Lokasi dan Penelitian.....	28
4.5 Bahan dan Alat.....	28
4.6 Definisi Istilah.....	28
4.7 Prosedur Penelitian.....	29
4.7.1 Ekstraksi.....	29
4.7.1.1 Ekstraksi Metode Maserasi.....	29
4.7.1.2 Ekstraksi Metode Remaserasi.....	30
4.7.2 Optimasi Fase Gerak.....	32
4.7.3 Pengondisian HPLC.....	33
4.7.4 Preparasi Larutan Standar.....	34
4.7.4.1 Preparasi Larutan Standar untuk Validasi Metode.....	34
4.7.4.2 Preparasi Larutan Standar untuk Penetapan Kadar.....	34
4.7.5 Preparasi Larutan Sampel.....	35
4.7.6 Validasi Metode.....	35
4.7.6.1 Selektivitas.....	35
4.7.6.2 Linearitas.....	36
4.7.6.3 <i>Limit of Detection</i> (LOD).....	36
4.7.6.4 <i>Limit of Quantitation</i> (LOQ).....	36
4.7.6.5 Akurasi dan Presisi.....	37
4.7.6.6 Penetapan Kadar Kurkumin.....	38
4.8 Analisis Data.....	38
4.8.1 Uji Normalitas.....	39
4.8.2 Uji Homogenitas.....	39
4.8.3 Uji-T Tidak Berpasangan.....	39



4.8.4 Uji Mann-Whitney.....	40
BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....	41
5.1 Ekstraksi.....	41
5.1.1 Maserasi.....	41
5.1.2 Remaserasi.....	42
5.2 Optimasi Fase Gerak.....	42
5.3 Kondisi Operasional HPLC.....	43
5.4 Validasi Metode.....	46
5.4.1 Selektivitas.....	46
5.4.2 Linearitas.....	50
5.4.3 <i>Limit of Detection</i> (LOD) dan <i>Limit of Quantitation</i> (LOQ).....	50
5.4.4 Akurasi dan Presisi.....	51
5.5 Penetapan Kadar Kurkumin.....	52
5.6 Analisis Statistik.....	53
5.6.1 Uji Normalitas.....	54
5.6.2 Uji Homogenitas.....	54
5.6.3 Uji Mann-Whitney.....	54
BAB 6. PEMBAHASAN.....	56
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian.....	56
6.2 Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian.....	69
6.3 Keterbatasan Penelitian.....	69
BAB 7. PENUTUP.....	70
7.1 Kesimpulan.....	70
7.2 Saran.....	70
DAFTAR PUSTAKA.....	71
LAMPIRAN.....	76

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Tabel persyaratan persen *recovery* yang ditetapkan AOAC 15

Tabel 2.2 Tabel batas %RSD *repeatability* yang ditetapkan AOAC 16

Tabel 2.3 Tabel Pemilihan Pelarut Berdasarkan Jenis Senyawa 21

Tabel 4.1 Tabel komposisi fase gerak 32

Tabel 5.1 Hasil Penimbangan Simplisia, Penimbangan Ekstrak dengan Bobot Tetap, dan Persen Rendemen Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) metode maserasi 41

Tabel 5.2 Hasil Penimbangan Simplisia, Penimbangan Ekstrak dengan Bobot Tetap, dan Persen Rendemen Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) metode remaserasi 42

Tabel 5.3 Tabel Hasil Optimasi Fase gerak 43

Tabel 5.4 Tabel Hasil Analisis SST pada Standar 36 ppm untuk Validasi Metode Linearitas, LOD dan LOQ, serta Akurasi dan Presisi 45

Tabel 5.5 Tabel Hasil Analisis SST pada Standar 36 ppm untuk Penetapan Kadar Ekstrak Kunyit 45

Tabel 5.6 Tabel Hasil Uji Selektivitas Sampel 46

Tabel 5.7 Tabel Hasil Waktu Retensi Standar Kurkumin 47

Tabel 5.8 Tabel Hasil Akurasi dan Presisi 52

Tabel 5.9 Tabel Hasil Penetapan Kadar pada Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica*) 53

Tabel 5.10 Tabel Hasil Uji Normalitas 54

Tabel 5.11 Tabel Hasil Uji Homogenitas 54

Tabel 5.12 Tabel Hasil Uji Mann-Whitney 55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Rimpang Kunyit 7

Gambar 2.2 Tanaman Kunyit Kering 8

Gambar 2.3 Struktur Senyawa Kurkumin 9

Gambar 2.4 Komponen HPLC 12

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian 24

Gambar 4.1 Diagram Alur Prosedur Penelitian 29

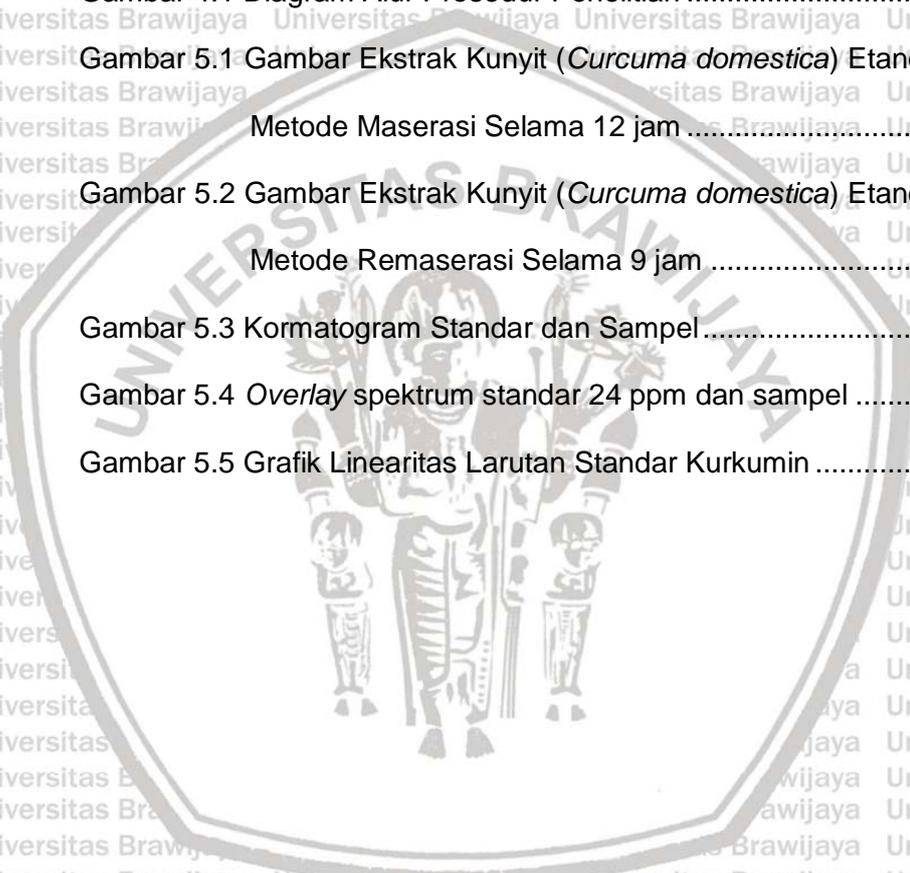
Gambar 5.1 Gambar Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica*) Etanol 96% dengan Metode Maserasi Selama 12 jam 41

Gambar 5.2 Gambar Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica*) Etanol 96% dengan Metode Remaserasi Selama 9 jam 42

Gambar 5.3 Kromatogram Standar dan Sampel 47

Gambar 5.4 Overlay spektrum standar 24 ppm dan sampel 49

Gambar 5.5 Grafik Linearitas Larutan Standar Kurkumin 50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Simplisia Rimpang Kunyit 76

Lampiran 2. Penimbangan Ekstrak Kunyit 77

Lampiran 3. Hasil Kromatogram dan Perhitungan 78

Lampiran 4. Hasil Overlay Spektrum 95

Lampiran 5. Perhitungan Penetapan Kadar 103

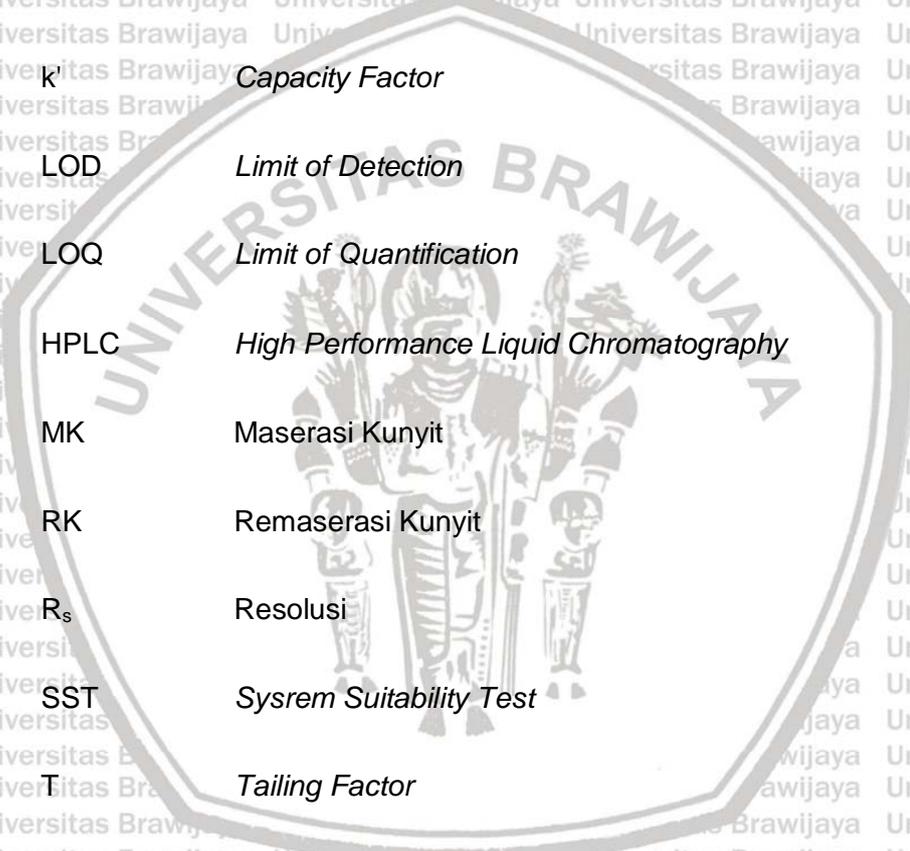
Lampiran 6. Spesifikasi Standar Kurkumin TCl yang digunakan 104

Lampiran 7. Analisis Statistik 105



DAFTAR SINGKATAN

AAG	Asam Asetat Glisial
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
CDER	Center for Drug Evaluation and Research
FHI	Farmakope Herbal Indonesia
ICH	International Council for Harmonisation
k'	Capacity Factor
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MK	Maserasi Kunyit
RK	Remaserasi Kunyit
R_s	Resolusi
SST	Sysrem Suitability Test
T	Tailing Factor
WFI	Water for Injection
WHO	World Health Organization





BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penggunaan obat herbal banyak dijumpai di masyarakat pada saat ini.

Obat herbal adalah salah satu bagian dari obat tradisional yang berasal dari tanaman atau bagian dari tanaman baik langsung dimanfaatkan, dalam bentuk simplisia, ekstrak ataupun produk jadi yang berfungsi untuk mencegah ataupun mengobati penyakit (WHO, 2019). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh lembaga *HEXA Research* tahun (2017) tentang analisa pasar obat tradisional pada industri farmasi beberapa tempat di dunia menunjukkan bahwa dari tahun 2014 hingga tahun 2016 pendapatan obat herbal pada industri farmasetika mengalami peningkatan. Diperkirakan pada tahun-tahun selanjutnya, yaitu 2017 hingga 2024 pendapatan tersebut akan terus mengalami peningkatan. Peningkatan pendapatan ini dikarenakan obat herbal memiliki harga yang lebih murah dibandingkan dengan obat-obatan konvensional. Salah satu senyawa yang diharapkan untuk digunakan secara luas adalah kurkumin yang dimanfaatkan sebagai antikanker karena meningkatnya prevalensi kanker dan mahalnya pengobatan kanker (HEXAResearch, 2017). Contoh tanaman yang mengandung kurkumin dan digunakan sebagai obat tradisional adalah rimpang tanaman kunyit.

Kunyit, dalam bahasa latin disebut *Curcuma domestica* atau *Curcuma longa*, merupakan salah satu dari banyak empon-empon asli Indonesia. Kunyit memiliki banyak kandungan metabolit sekunder, seperti kurkuminoid, terpenoid, flavonoid, senyawa fenol, steroid, dan lain-lain. Kurkuminoid merupakan kandungan metabolit sekunder utama pada kunyit. Macam-macam kurkuminoid dalam kunyit yang umum ditemukan adalah kurkumin,

demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin (Meng *et al.*, 2018). Kurkumin merupakan senyawa identitas pada rimpang kunyit (Kemenkes RI, 2017). Kurkumin sebagai senyawa tunggal diketahui bermanfaat untuk efek antioksidan karena memiliki gugus β -diketon pada strukturnya. Selain itu, efek sebagai hepatoprotektif juga diketahui dihasilkan oleh kurkumin karena aktivitas antiinflamasi pada hati dan efek antifibrosis hati. Kurkumin diketahui juga dapat bermanfaat untuk inflamasi kronis lain seperti inflamasi pada saluran pernapasan, inflamasi pada saluran cerna, dan inflamasi pada sendi. Kurkumin juga diteliti memiliki efek antivirus, seperti untuk melawan infeksi virus hepatitis B dan hepatitis C (Pulido-Moran *et al.*, 2016; Reyes-Gordillo *et al.*, 2017).

Penarikan senyawa kurkumin dapat dilakukan dengan metode ekstraksi. Ekstraksi merupakan teknik pemisahan senyawa aktif dari tanaman dengan pelarut tertentu dan prosedur terstandar untuk mendapatkan metabolit sekunder dari tanaman. Metode ekstraksi untuk kurkumin telah banyak dilakukan, diantaranya adalah pressurized liquid extraction, hidrodistilasi, diekstraksi cair-cair menggunakan n-heksan, soxhletasi, distilasi uap, sonikasi, perkolasi, ultrasonikasi, maserasi, dan lain-lain. Pemilihan metode ekstraksi perlu dilakukan dengan tepat untuk mendapatkan senyawa target yang diinginkan dan tanpa merusak senyawa tersebut secara kimia maupun fisika. Metode yang sering digunakan untuk ekstraksi adalah maserasi dikarenakan prosedur yang sangat mudah dilakukan namun memiliki kekurangan yaitu membutuhkan waktu ekstraksi yang lama (Azwainda, 2015; Meng *et al.*, 2018).

Penelitian tentang ekstraksi kurkumin dengan metode maserasi telah banyak dilakukan. Salah satunya adalah penelitian yang dilakukan oleh

Paulucci *et al.*, yang dipublikasikan pada tahun 2013. Penelitian yang dilakukan adalah melakukan optimasi parameter ekstraksi kurkumin pada rimpang kunyit dengan metode maserasi sehingga didapatkan kondisi optimal untuk melakukan ekstraksi kurkumin pada rimpang kunyit dengan metode maserasi adalah dengan waktu ekstraksi 12 jam dibandingkan 24 jam, dengan kecepatan 30 rpm, perbandingan solid/likuid 1/6, suhu 80°C, dan pelarut etanol 70% (Paulucci *et al.*, 2013). Pada penelitian lainnya disebutkan bahwa maserasi dengan durasi waktu 24 jam dengan pelarut aseton menunjukkan luas area zat kurkuminoid yang lebih besar dibandingkan dengan metode ekstraksi tunggal, ekstraksi sekuensial, soxhletasi, ataupun ekstraksi dengan air panas (Jansirani *et al.*, 2014). Alternatif untuk mengoptimalkan proses ekstraksi dengan metode maserasi adalah dengan penambahan pelarut baru pada jangka waktu tertentu atau disebut dengan remaserasi. Diketahui adanya adanya penambahan pelarut baru akan ada pergerakan solut menuju pelarut sehingga cara ini lebih efektif dibandingkan dengan penambahan pelarut sekaligus. Selain itu, penambahan pelarut baru saat proses ekstraksi dapat meningkatkan rendemen dari senyawa yang diinginkan (Rezki, *et al.*, 2015; Šibul, *et al.*, 2016).

Pada penelitian sebelumnya, dilakukan penelitian dengan membandingkan antara ekstraksi metode maserasi dan remaserasi dengan pelarut etanol 96% dan skrining fitokimia pada tanaman kuyit. Hasil menunjukkan bahwa jumlah rendemen tertinggi ekstrak yang didapatkan adalah dengan metode remaserasi dengan waktu yang dipersingkat dan kedua metode tidak mempengaruhi kandungan senyawa pada ekstrak (Ningsih, *et al.*, 2018). Namun, penetapan kadar kurkumin tidak dilakukan pada penelitian tersebut. Penetapan kadar dari senyawa aktif tanaman dapat

digunakan untuk mengetahui efektif atau tidaknya metode ekstraksi yang dilakukan. Penetapan kadar merupakan prosedur untuk mengukur konsentrasi suatu analit dalam sampel. Metode yang dapat digunakan untuk penetapan kadar kurkumin yang telah dilakukan antara lain dengan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromathography*) (Wichitnithad *et al.*, 2009), Spektrofotometri UV-Vis (Kadam *et al.*, 2018), UHPLC/MS-MS (*Ultra High Performance Chromatography-Double Mass Spectrometry*) (Ihsan, *et al.*, 2018) dan lain-lain. Penetapan kadar kurkumin dengan metode HPLC diketahui sering digunakan dikarenakan HPLC merupakan instrumen yang mudah digunakan dan dapat memisahkan kandungan kurkumin secara sensitif, presisi, dan akurat dari metabolit lain yang terdapat di dalam ekstrak kunyit dan hasilnya dapat langsung diketahui melalui proses komputerisasi (Dhole *et al.*, 2012; Ashraf and Sultan, 2017).

Berdasarkan uraian di atas belum banyak penelitian yang membandingkan kadar kurkumin pada ekstrak kunyit dengan perbedaan metode maserasi dan remaserasi untuk mengefisienkan waktu ekstraksi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang penetapan kadar kurkumin pada ekstrak kunyit dengan perbedaan metode ekstraksi maserasi dan metode remaserasi dengan waktu yang lebih singkat menggunakan instrumen HPLC untuk mengetahui metode ekstraksi yang optimal antara maserasi dan remaserasi pada ekstrak kunyit.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat perbedaan hasil penetapan kadar kurkumin pada ekstrak kunyit yang diekstraksi dengan metode maserasi selama 12 jam dengan metode remaserasi selama 9 jam dengan pergantian pelarut setiap 3 jam?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui hasil penetapan kadar kurkumin pada ekstrak kunyit yang diekstraksi dengan metode maserasi selama 12 jam dengan metode remaserasi selama 9 jam dengan pergantian pelarut setiap 3 jam.

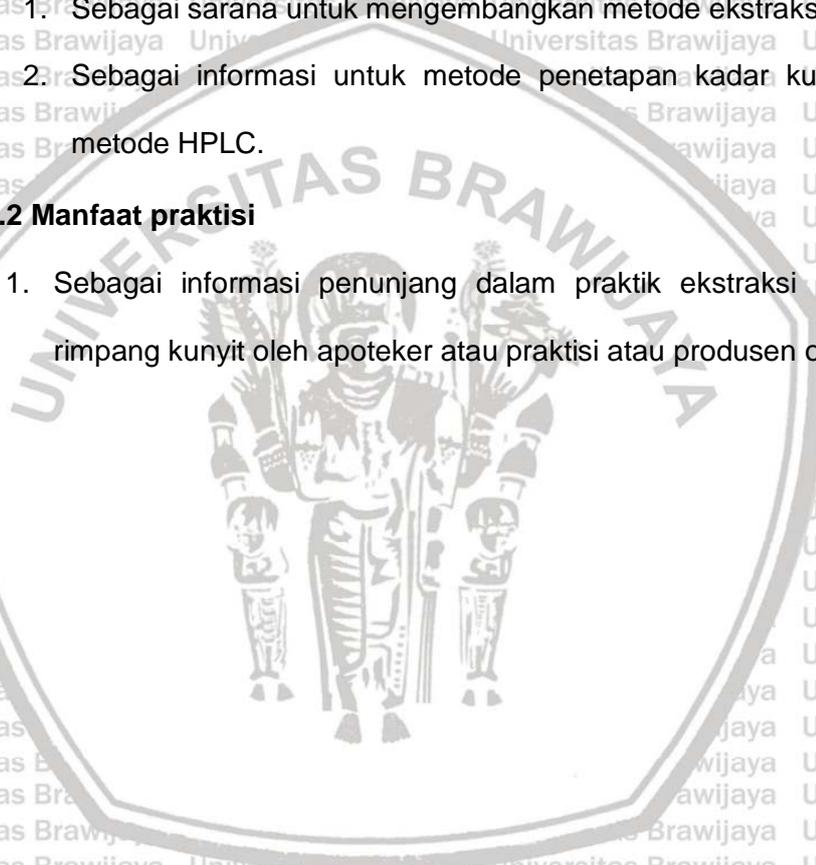
1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat akademik

1. Sebagai sarana untuk mengembangkan metode ekstraksi kurkumin.
2. Sebagai informasi untuk metode penetapan kadar kurkumin dengan metode HPLC.

1.4.2 Manfaat praktisi

1. Sebagai informasi penunjang dalam praktik ekstraksi kurkumin pada rimpang kunyit oleh apoteker atau praktisi atau produsen obat herbal.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Curcuma domestica* Rhizome (Rimpang Kunyit)

a. Pengertian

Kunyit adalah salah satu tanaman yang berasal dari Indonesia dan telah diketahui banyak manfaatnya sebagai tanaman obat. Kunyit merupakan jenis tanaman semak-semak dengan tinggi ± 70 cm, dengan memiliki batang semu, tegak bulat, serta membentuk rimpang, dengan batang berwarna hijau kekuningan. Bagian utama yang sering dimanfaatkan baik untuk kesehatan atau bahan masakan adalah rimpang atau umbi (Kementerian Kesehatan RI, 2011).

b. Taksonomi

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Viridiplantae

Infrakingdom : Streptophyta

Divisi : Embryophyta

Subdivisi : Spermatophyta

Kelas : Magnoliopsida

Superordo : Liliane

Ordo : Zingiberales

Famili : Zingiberaceae

Genus : *Curcuma* L.

Spesies : *Curcuma longa* L. sinonim *Curcuma domestica* Val. (ITIS

Standard Report Page: *Curcuma longa*, no date)

c. Rimpang Kunyit



Gambar 2.1 Rimpang Kunyit

Rizoma atau rimpang kunyit kunyit memiliki ruas-ruas yang dapat membentuk rimpun. Selain itu, rimpang kunyit berbentuk bulat memanjang dan biasanya memiliki cabang rimpang yang merupakan batang di dalam tanah. Rimpang kunyit dibagi menjadi rimpang induk (rimpang utama) atau disebut juga umbi kunyit dan tunas. Rimpang utama umumnya ditumbuhi tunas yang dapat tumbuh ke arah samping, mendatar, atau melengkung. Tunas pada kunyit umumnya banyak, tumbuh berbuku-buku pendek, lurus atau melengkung (Winarto, 2004).

Warna kulit dari rimpang kunyit umumnya kecoklatan atau berwarna terang agak kuning kehitaman. Warna umbi dari rimpang kunyit biasanya jingga kekuningan, jingga kemerahan hingga kuning jingga kecoklatan. Umbi kunyit memiliki bau yang khas serta rasa yang agak pahit dan pedas. Tunas pada tanaman kunyit akan berkembang terus-menerus membentuk cabang-cabang baru dan batang semu, sehingga akan membentuk sebuah rumpun. Lebar rumpun biasanya 24,10 cm. panjang rimpang bias mencapai 22,5 cm. tebal rimpang yang sudah berumur tua adalah 4,06 cm dan pada rimpang berumur muda 1,61 cm. Rimpang kunyit yang berumur tua yang biasanya dimanfaatkan sebagai obat (Winarto, 2004).

d. Pemerian simplisia kering

Simplisia kasar dari kunyit memiliki ciri-ciri, berwarna kuning jingga terkadang terlihat kemerahan atau kecokelatan. Memiliki bau yang khas, agak pahit, agak pedas yang dalam beberapa waktu akan menimbulkan

rasa tebal. Umumnya irisan dari ekstrak kering ini melintang, terasa ringan, rapuh dan biasanya berbentuk bulat atau bulat memanjang (Kemenkes RI, 2017). Sedangkan simplisia kunyit bubuk berwarna kuning hingga kecoklatan.



Gambar 2.2 Tanaman kunyit kering

e. Kandungan Senyawa Kimia dan Manfaat

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan senyawa kimia dari kunyit atau *turmeric* adalah kaya akan senyawa polifenol kurkuminoid seperti kurkumin (kurang lebih 80%), demetoksikurkumin (kurang lebih 12%), dan bisdemetoksikurkumin, protein, lemak, mineral, dan karbohidrat.

Kunyit juga mengandung minyak esensial yang didapatkan dengan cara distilasi *rhizome* dan mengandung senyawa α -phellandrene, sabinene, cineol, borneol, zingiberene, dan seskuiterpen (Ashraf and Sultan, 2017).

Berdasarkan keterangan dari Farmakope Herbal Indonesia Edisi II Tahun 2017, ekstrak kental rimpang kunyit memiliki kandungan minyak atsiri lebih dari sama dengan 3,10% v/b dan atau kurkumin lebih dari sama dengan 11,17% (Kemenkes RI, 2017).

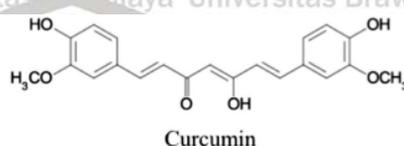
Manfaat dari tanaman kunyit antara lain memiliki aksi pada sistem GI sebagai gastroprotektan melawan iritasi. Biasanya juga dapat digunakan untuk mengobati dispepsia dan gastritis, aksi protektif terhadap sistem kardiovaskular, memiliki efek pada sistem syaraf biasanya antidepresan, antiinflamasi, efek antioksidan, antikarsinogenik (menginduksi apoptosis),

antimikroba, antikoagulan, antidiabetes, antifungi, dan antivirus (Ashraf and Sultan, 2017)

2.2 Kurkumin

Kurkumin merupakan komponen kimia yang penting dari kunyit.

Tergolong dalam kurkuminoids yang termasuk juga di dalamnya demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin yang merupakan kandungan dari kunyit. Struktur senyawa kurkumin adalah sebagai berikut :



Gambar 2.3 Struktur Senyawa Kurkumin

Kurkumin merupakan molekul yang simetris dengan nama IUPAC *(1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione* dan rumus kimia $C_{21}H_{20}O_6$ serta memiliki berat molekul 368,38. Kurkumin diketahui tidak larut dalam air dan mudah larut pada pelarut polar seperti DMSO, metanol, etanol, asetonitril, kloroform, etil asetat, dan lain-lain. Kurkumin sedikit larut dalam pelarut hidrokarbo/n seperti sikloheksana dan heksana. Penyerapan spektrum kurkumin terjadi paling kuat pada dua panjang gelombang, yaitu sinar tampak 410-430 nm dan sinar UV 265 nm dikarenakan kurkumin memiliki 2 bentuk yakni enol dan β -diketon. Pada penelitian sebelumnya, kurkumin dengan λ_{maks} 428 nm akan terdeteksi dalam bentuk enol, dan pada sinar UV 355 nm akan terdeteksi dalam bentuk β -diketon. Kurkumin diketahui tidak stabil pada pH yang tinggi yang akan menyebabkan degradasi, serta proses degradasi akan lebih cepat jika terpapar sinar matahari (Priyadarsini, 2014; Moussa *et al.*, 2017).

Kurkumin sering digunakan untuk terapi karena telah diuji memiliki banyak manfaat. Manfaat yang telah diuji antara lain dapat berpotensi dalam

penyembuhan penyakit liver, kanker, Alzheimer, Parkinson, dan AIDS. Efek yang ditimbulkan antara lain sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, dan antivirus. Walaupun kurkumin memiliki banyak manfaat, diketahui kurkumin memiliki bioavailabilitas yang rendah karena sukar larut dalam air (Javeri and Chand, 2016).

Analisis kurkumin telah banyak dilakukan baik secara kuantitatif maupun kualitatif. Metode yang telah dilakukan dalam analisis kurkumin antara lain:

(1) TLC (*Thin Layer Chromatography*), HPTLC (*High-Performance TLC*) dan kromatografi kolom, dengan menggunakan fase diam *silica gel* dan fase gerak antara lain: benzena, etil asetat, etanol, kloroform, asam asetat, n-heksan, and metanol. Biasanya metode ini digunakan untuk analisa secara kualitatif (Ashraf and Sultan, 2017). Hasil analisis kurkumin pada rimpang kunyit dengan pembanding kurkumin, serta dengan metode TLC dalam *silica gel* 60 F₂₅₄ diketahui dalam literatur yang dapat digunakan sebagai pembanding hasil penelitian (Kemenkes RI, 2017). Setelah didapatkan hasil analisis secara kualitatif, selanjutnya untuk analisis kuantitatif yaitu dengan alat densitometer. Metode perlakuan dengan TLC dan alat densitometer disebut *TLC-densitometry* atau KLT-densitometri. Diketahui dari penelitian yang dilakukan Wahyuni *et al* metode KLT-densitometri dapat digunakan secara efektif untuk mengukur senyawa kurkuminoid, termasuk di dalamnya adalah kurkumin (Wahyuni, *et al.*, 2018).

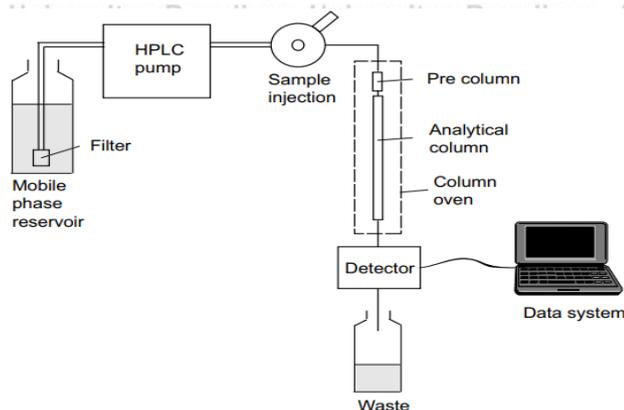
(2) HPLC (*High-Performance Liquid Chromathography*) merupakan metode yang umum digunakan dan membutuhkan instrumen yang sederhana dan merupakan metode yang cukup sensitif untuk penentuan kadar kurkuminoid dalam rimpang pada genus *Curcuma*. Selain itu, metode HPLC dinilai sensitif, presisi, dan akurat dalam determinasi kurkuminoid

dalam ekstrak rhizoma *C. domestica*. Umumnya metode ini digunakan untuk penetapan kadar kurkuminoid secara kuantitatif maupun kualitatif. Hasil karakterisasi dari kurkumin seperti waktu retensi, panjang gelombang berbeda-beda. Hasil ini tergantung pada kondisi HPLC yang digunakan terutama pemilihan fase gerak. Berdasarkan komperhensif *review* yang dilakukan oleh Ashraf and Sultan pada tahun 2017, panjang gelombang yang digunakan untuk deteksi kurkumin adalah pada gelombang UV 429-430 nm, umumnya kurkumin akan terdeteksi pada panjang gelombang 425 nm (Ashraf and Sultan, 2017).

(3) Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode yang cocok untuk melakukan kuantifikasi kurkumin di dalam ekstrak kunyit (Kadam *et al.*, 2018). Selain itu metode spektrofotometri UV-Vis juga dapat digunakan untuk analisis secara kualitatif suatu senyawa karena dapat mengabsorbansi senyawa pada panjang gelombang UV 160-375 nm dan pada sinar tampak menggunakan lampu tungsten dengan panjang gelombang 350-2500 nm. Hasil absorbansi selanjutnya akan dapat disajikan dalam bentuk spektrum (Hansen, *et al.*, 2012). Metode ini diketahui memiliki kelemahan apabila dibandingkan dengan HPLC dikarenakan tidak ada proses pemisahan pada spektrofotometer sehingga dapat meningkatkan nilai kurkumin, karena komponen kurkuminoid lainnya terdeteksi pada serapan maksimum yang sama (Kotra *et al.*, 2019)

2.3 HPLC (High Performance Liquid Chromathography)

HPLC (*High Performance Liquid Chromathography*) adalah salah satu instrumen untuk analisis senyawa kimia tertentu yang mampu menganalisis beberapa senyawa sekaligus karena kemampuannya untuk memisahkan senyawa satu dengan senyawa lainnya. 3 komponen utama dalam sistem HPLC adalah komponen untuk solven, kolom pemisahan, dan detektor.



Gambar 2.4 Komponen HPLC

Prinsip kerja dari pemisahan HPLC adalah dengan adanya fase diam dari kolom dan fase gerak yang akan dipompa masuk ke dalam kolom dengan kecepatan tertentu, umumnya 0,5-2,0 mL/menit. Senyawa yang memiliki kepolaran sama dengan fase diam akan tertahan lebih lama di dalam kolom dan senyawa yang lain akan terbawa oleh fase gerak berupa solven yang kemudian akan diarahkan kepada detektor. Detektor pada HPLC antara lain: (1) Detektor UV; 2) Fluorosens; (3) Elektrokimia (ECD); (4) *Refractive Index*, *Evaporative Light Scattering and Corona Discharge Detectors*; (5) PDA; dan (6) Kombinasi (Hansen, *et al.*, 2012).

HPLC digunakan oleh banyak peneliti, dikarenakan keunggulan HPLC yang akurat, presisi, dan *robust* untuk digunakan analisa kuantitatif dan cocok untuk menentukan obat pada preparasi farmasetika termasuk produk bahan alam. Selain itu, HPLC juga sangat cocok digunakan untuk determinasi obat dan metabolit pada material bahan alam (Hansen, *et al.*, 2012).

2.4 Validasi Metode

Validasi metode adalah proses dokumentasi atau proses untuk membuktikan bahwa metode analisis yang digunakan pada suatu studi dapat menunjukkan data analisis yang dapat diterima dan memenuhi persyaratan. Validasi metode sangat dibutuhkan dalam melakukan analisis kimia dikarenakan metode atau prosedur yang tervalidasi akan ada dokumen

instruksi khusus yang dapat dilakukan kembali sesuai prosedur yang sama dan hasil dari pengukuran dengan metode yang telah tervalidasi harus sama, sehingga data yang didapatkan lebih dipercaya. Proses validasi metode yang umum dilakukan adalah selektivitas, linearitas, akurasi, presisi, LOD, LOQ (Christian, *et al.*, 2014).

2.4.1 Selektivitas

Selektivitas adalah salah satu prosedur validasi yang ditujukan untuk mengukur sejauh mana metode penelitian dapat mengukur analit yang diinginkan di dalam matriks sampel yang dianalisis tanpa terganggu oleh komponen lain pada matriks sampel. Matriks adalah semua senyawa atau semua analit yang terdapat di dalam sampel kecuali analit yang diteliti dan matriks dapat menyebabkan gangguan saat pengukuran kadar dari analit yang diteliti (Christian, *et al.*, 2014). Data yang didapatkan dari validasi metode parameter selektivitas adalah nilai resolusi (R_s) (AOAC International, 2012).

Resolusi digunakan untuk mengetahui apakah *peak* (puncak) dari analit yang diinginkan telah terpisah dari *peak* lain yang mengikuti. Nilai resolusi didapatkan dengan rumus:

$$R_s = 2 (t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$$

dimana t_2 dan t_1 adalah waktu retensi dari *peak* analit dan *peak* terdekat, sedangkan W_1 dan W_2 adalah lebar *baseline* dari *peak* analit dan *peak* terdekat. Resolusi yang baik diketahui bernilai $> 1,5$ (AOAC International, 2012).

2.4.2 Linearitas

Studi linearitas merupakan salah satu prosedur validasi metode yang bertujuan untuk memastikan bahwa respon dari instrumen yang digunakan

dengan metode analisis yang telah ditentukan berbanding lurus dengan konsentrasi analit dalam rentang beberapa konsentrasi larutan. Studi ini membutuhkan setidaknya lima tingkat konsentrasi larutan standar dari analit dalam kisaran 50% hingga 150% dari konsentrasi analit target yang setidaknya harus diukur tiga kali. Data yang didapatkan dari linearitas adalah persamaan regresi $y = mx + b$, di mana x adalah konsentrasi analit standar yang digunakan (variabel independen) dan y adalah respon dari instrumen yang digunakan (variabel dependen) (Christian, *et al.*, 2014). Selain itu data yang didapatkan pada linearitas adalah koefisien korelasi (r). Koefisien korelasi tinggi sering direkomendasikan, yaitu dengan nilai $r > 0,99$ (AOAC International, 2012)

2.4.3 Akurasi

Akurasi atau keakuratan suatu prosedur analisis dapat diartikan sebagai kedekatan hasil tes yang diperoleh dari suatu prosedur dengan nilai sebenarnya. Berdasarkan tatalaksana ICH, akurasi harus ditetapkan minimal dengan 9 hasil pengukuran kadar dengan minimal 3 konsentrasi berbeda pada rentang tertentu. Data hasil uji akurasi adalah persen *recovery* dengan cara hasil uji jumlah analit dibandingkan dengan jumlah awal analit yang diketahui atau dapat dihitung dengan perbandingan antara rata-rata dari hasil uji jumlah analit dengan nilai sebenarnya (Hansen *et al.*, 2012). Rumus untuk menentukan persen *recovery* yaitu:

$$\%recovery = \frac{\text{Hasil uji jumlah analit}}{\text{Jumlah analit yang diketahui}} \times 100\%$$

Pada penelitian yang dilakukan oleh Murti *et al.* tahun (2019), uji akurasi dapat dilakukan dengan cara melarutkan larutan standar kurkumin dengan 3 konsentrasi berbeda (total 9 larutan) pada pelarut yang digunakan untuk analisis validasi metode parameter akurasi dan presisi (Murti *et al.*, 2019).

Berdasarkan *guideline* AOAC persyaratan persen *recovery* yang ditetapkan berdasarkan konsentrasi analit yang diuji. Persyaratan yang diizinkan berdasarkan *guideline* AOAC terlampir pada (Tabel 2.1) (AOAC International, 2016).

Tabel 2.1 Tabel persyaratan persen *recovery* yang ditetapkan AOAC

Konsentrasi analit	Batas %perolehan kembali (%)
100%	98–102
10%	97–103
1%	95–105
0,1%	90–107
0,01%	80–110
0,001%	60-115
0,0001%	40-120
0,00001%	
0,000001%	
0,0000001%	

2.4.4 Presisi

Presisi atau ketepatan prosedur analisis yang menunjukkan kedekatan nilai hasil pengujian seseorang ketika prosedur dilakukan berulang kali pada pengambilan sampel yang homogen. Presisi dapat dinyatakan *Relative Standard Deviation* (%RSD) dengan rumus (Hansen, *et al.*, 2012):

$$\%RSD = \frac{s}{m} \times 100\%$$

(dengan *s* adalah standar deviasi dan *m* adalah rata rata hasil pengukuran)

Presisi diketahui memiliki 3 level, yaitu: (1) *Repeatability*, di mana analisis yang melakukan uji presisi dengan peralatan yang sama dalam satu hari dan laboratorium yang digunakan sama. Berdasarkan dokumen ICH *repeatability* harus ditetapkan minimal dengan 9 hasil pengukuran kadar dengan minimal 3 konsentrasi berbeda pada rentang tertentu; (2) *Intermediate precision*, yaitu uji presisi dengan analisis uji berbeda, peralatan

yang digunakan berbeda, pada hari yang berbeda, dengan laboratorium yang sama; (3) *Reproducibility*, biasanya dilakukan untuk menunjukkan ketepatan prosedur pada laboratorium yang berbeda. Kriteria penerimaan untuk presisi bergantung pada jenis studi yang dilakukan. Pada QC farmasi %RSD yang dapat diterima adalah maksimal 1% sedangkan pada sampel biologis biasanya 15%-20% (Hansen, *et al*, 2012). Pada penelitian yang dilakukan oleh Murti *et al* tahun (2019), presisi dapat dilakukan dengan cara melarutkan larutan standar kurkumin dengan 3 konsentrasi berbeda (total 9 larutan) pada pelarut yang digunakan untuk analisis validasi metode parameter akurasi dan presisi (Murti *et al.*, 2019). Berdasarkan *guideline* AOAC diketahui batas %RSD pada presisi *repeatability* sebagai fungsi dari konsentrasi analit adalah sebagai berikut yang ditetapkan terlampir pada (Tabel 2.2) (AOAC International, 2016).

Tabel 2.2. Tabel batas %RSD *repeatability* yang ditetapkan AOAC

Konsentrasi	Batas %RSD, <i>repeatability</i> (%)
100%	1,3
10%	1,9
1%	2,7
0,1%	3,7
0,01%	5,3
0,001%	7,3
0,0001%	11
0,00001%	15
0,000001%	21
0,0000001%	30

2.4.5 LOD (*Limit of Detection*)

LOD merupakan jumlah analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi oleh instrumen namun belum dapat dikuantifikasi secara tepat (Hansen *et al*, 2012). LOD dapat dihitung berdasarkan standar deviasi dari respon instrumen dan *slope*. LOD dapat dihitung dengan rumus (ICH, 1995)

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

LOD = *Limit of Detection*

σ = Standar deviasi dari respon

S = *slope* dari kurva kalibrasi

Apabila nilai LOD dihitung berdasarkan kurva kalibrasi, maka nilai standar deviasi yang digunakan adalah standar deviasi dari nilai residual kurva kalibrasi atau standar deviasi dari *y-intercepts* dari kurva regresi (ICH, 1995).

2.4.6 LOQ (*Limit of Quantitation*)

LOQ merupakan jumlah analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif pada saat instrumen yang digunakan dapat mendeteksi analit dengan akurasi dan presisi yang baik (Hansen, *et al.*, 2012). LOQ dapat dihitung berdasarkan standar deviasi dari respon instrumen dan *slope*. LOQ dapat dihitung dengan rumus (ICH, 1995):

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

LOQ = *Limit of Quantification*

σ = Standar deviasi dari respon

S = *slope* dari kurva kalibrasi

Apabila nilai LOQ dihitung berdasarkan kurva kalibrasi, maka nilai standar deviasi yang digunakan adalah standar deviasi dari nilai residual kurva kalibrasi atau standar deviasi dari *y-intercepts* dari kurva regresi (ICH, 1995).

2.5 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu metode pemisahan, umumnya pemisahan metabolit sekunder pada tanaman, yang menggunakan pelarut tertentu dan

prosedur terstandar (Azwainda, 2015). Pemilihan pelarut atau solven tergantung pada tipe tanaman, bagian dari tanaman yang diekstrak, serta senyawa bioaktif yang diekstrak, dan tersedia atau tidaknya pelarut. Selain itu, pemilihan pelarut juga menjadi penting karena berdasarkan pada hukum *like dissolves like* dimana senyawa polar akan terlarut pada pelarut polar dan senyawa nonpolar akan terlarut pada pelarut nonpolar (Zhang, *et al.*, 2018).

Pelarut yang umum digunakan antara lain air, metanol, etanol yang merupakan pelarut polar untuk mengekstrak senyawa polar serta heksana, eter, kloroform dan diklorometana yang merupakan pelarut nonpolar untuk mengekstrak senyawa nonpolar. Faktor yang harus dipertimbangkan untuk pemilihan pelarut adalah (1) Selektif, yang artinya dapat mengekstrak senyawa aktif yang diinginkan dan tidak mempengaruhi hasil pengukuran; (2) Keamanan, yang artinya tidak beracun; (3) Harga semurah mungkin; (4) Reaktifitas pelarut, yang artinya pelarut tidak boleh bereaksi dengan ekstrak; (5) *Recovery*, pelarut yang dipilih harus dapat dipisahkan dari ekstrak; (6) Viskositas pelarut rendah agar memudahkan penetrasi ke dalam tanaman; (7) Titik didih pelarut dipilih yang serendah mungkin untuk mencegah degradasi senyawa aktif oleh panas (Azwainda, 2015; Abubakar and Haque, 2020).

Pemilihan metode ekstraksi juga harus dipertimbangkan. Pemilihan metode ekstraksi juga penting tergantung dari tujuan penggunaan ekstrak, terutama apabila digunakan untuk dikonsumsi manusia, harus mempertimbangkan pelarut dan metode yang aman saat hasil ekstraksi dikonsumsi (Abubakar and Haque, 2020). Faktor-faktor yang harus dipertimbangkan saat pemilihan metode ekstraksi antara lain:

- a) Stabilitas senyawa target ekstraksi saat dilakukan pemanasan. Apabila senyawa target tahan panas, dapat diekstraksi dengan metode Soxhlet

atau *microwave-assisted extraction*, sedangkan senyawa target yang tidak tahan panas dapat diekstraksi dengan metode maserasi atau perkolasi (Abubakar and Haque, 2020).

- b) Sifat dari pelarut. Apabila pelarut ekstraksi yang digunakan adalah air, dapat digunakan metode maserasi atau perkolasi dan apabila pelarut ekstraksi yang digunakan mudah menguap atau bersifat volatil, maka metode ekstraksi Soxhlet lebih tepat (Abubakar and Haque, 2020).
- c) Biaya obat atau harga obat. Biasanya obat akan lebih murah saat dijual apabila ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dan lebih mahal umumnya diekstrak dengan metode perkolasi (Abubakar and Haque, 2020).
- d) Lama ekstraksi. Apabila senyawa target diperlukan untuk terpapar dengan pelarut ekstraksi lebih lama dapat digunakan metode maserasi. Sedangkan apabila diinginkan waktu yang lebih singkat untuk ekstraksi, dapat digunakan metode ekstraksi dengan bantuan *microwave* atau ultrasonik (Abubakar and Haque, 2020).
- e) Volume akhir yang dibutuhkan. Apabila dibutuhkan untuk *tincture*, dapat digunakan teknik maserasi dan sedangkan produk yang terkonsentrasi dapat digunakan teknik perkolasi atau ekstraksi Soxhlet (Abubakar and Haque, 2020).
- f) Tujuan penggunaan. Ekstrak yang dimaksudkan untuk dikonsumsi oleh manusia umumnya dibuat dengan teknik maserasi, sedangkan produk yang dimaksudkan untuk ujian eksperimental umumnya digunakan metode lain selain maserasi (Abubakar and Haque, 2020).

Teknik ekstraksi yang sering digunakan adalah maserasi.

2.5.1 Maserasi

Maserasi merupakan salah satu teknik ekstraksi konvensional yang sangat mudah dilakukan, namun memiliki kekurangan terutama waktu ekstraksi yang lama (Zhang, *et al.*, 2018). Metode maserasi ini banyak digunakan untuk penelitian tanaman herbal yang terinspirasi dari pembuatan *wine*. Maserasi merupakan teknik ekstraksi dengan prosedur perendaman bahan tanaman, baik simplisia kasar ataupun bubuk pada wadah tertutup dengan pelarut yang telah dipilih berdasarkan pertimbangan-pertimbangan tertentu, salah satunya berdasarkan sifat senyawa yang akan diekstraksi. Biasanya perendaman pada metode maserasi ini dilakukan selama 3 hari dengan dilakukan pengadukan secara periodik, dan apabila dilakukan dalam botol maka botol harus dikocok untuk memastikan ekstraksi maksimal. Setelah direndam, hasil perendaman akan terbentuk filtrat dan rendemen yang kemudian disaring dengan cara filtrasi atau dekantasi. Langkah selanjutnya filtrat yang terbentuk dipisahkan dari pelarut dengan cara menguapkan pelarut, dapat dilakukan di dalam oven atau di atas penangas air. Maserasi cocok digunakan untuk senyawa tanaman yang termolabil (Azwainda, 2015; Abubakar and Haque, 2020).

Parameter ekstraksi yang perlu diperhatikan dalam proses ekstraksi antara lain:

1. Jenis Pelarut

Jenis pelarut yang dipilih menjadi parameter yang krusial dikarenakan prinsip dari maserasi adalah *like dissolve like*. Pelarut yang baik memiliki ciri-ciri: (1) Memiliki toksisitas yang rendah; (2) Mudah diuapkan pada suhu yang rendah; (3) Memiliki penyerapan yang cepat dari ekstrak; (4) Dapat bersifat sebagai pengawet; dan (5) Tidak bereaksi membentuk kompleks atau menyebabkan disosiasi. Selain itu, pemilihan pelarut

juga perlu mempertimbangkan: (1) Jumlah senyawa kimia yang diekstraksi; (2) Laju reaksi; (3) Berbagai macam senyawa yang diekstraksi; (4) Banyaknya senyawa penghambat yang mungkin ikut terekstraksi; (5) Potensi bahaya untuk kesehatan pada ekstrak (Pandey and Tripathi, 2014). Pemilihan pelarut berdasarkan jenis senyawa bioaktif yang diekstraksi terlampir pada (Tabel 2.3) (Azmir *et al.*, 2013)

Tabel 2.3. Tabel Pemilihan Pelarut Berdasarkan Jenis Senyawa

Air	Etanol	Metanol	Kloroform	Diklorometanol	Eter
Antosianin	Tanin	Antosianin	Terpenoid	Terpenoid	Alkaloid
Tanin	Polifenol	Terpenoid	Flavonoid		Terpenoid
Saponin	Flavonol	Saponin			
Terpenoid	Terpenoid	Tanin			
	Alkaloid	Flavon			
		Polifenol			

Berdasarkan penelitian sebelumnya, kondisi maserasi kurkumin dari kunyit dengan perbedaan pelarut menggunakan etanol 70%, etanol 80% dan etanol 96% yang diekstraksi pada suhu ruang dengan pengadukan dengan kecepatan 226 rpm selama 1 jam dengan lama 24 jam, perbandingan serbuk dan pelarut 1:6 yang kemudian residu diremaserasi sebanyak 2 kali menunjukkan hasil kadar kurkumin pada etanol 96% > etanol 80% > etanol 70% (Ihsan *et al.*, 2018).

2. Kecepatan pengadukan

Pengadukan pada proses maserasi ditujukan untuk meningkatkan lama kontak antara sampel dengan pelarut sehingga dapat mengoptimalkan proses ekstraksi (Prasetya *et al.*, 2020). Pada penelitian yang telah dilakukan, diketahui semakin tinggi kecepatan pengadukan akan meningkatkan tumbukan sehingga waktu kontak antara sampel dengan pelarut dan akan meningkatkan proses perpindahan senyawa target pada pelarut (Kriswiyanti and Fadilah, 2007).

3. Perbandingan serbuk dan pelarut

Apabila jumlah pelarut yang digunakan semakin banyak, diketahui jumlah rendemen yang dihasilkan akan semakin tinggi. Hal ini dikarenakan pelarut yang banyak akan menyebabkan proses pengeluaran senyawa target berjalan lebih baik. Namun, pada tingkat tertentu proses pengeluaran senyawa target menjadi tidak efektif dikarenakan larutan yang digunakan telah jenuh (Rifai *et al.*, 2018).

Perbandingan serbuk dan pelarut yang ideal adalah 1:10 (Pandey and Tripathi, 2014). Pada penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa kondisi optimal untuk maserasi kurkumin dari kunyit selama 12 jam dengan kecepatan pengadukan 30 rpm, perbandingan serbuk dan pelarut 1:6, pada suhu 80°C, dan dengan pelarut etanol 70% (Paulucci *et al.*, 2013)

4. Suhu

Suhu merupakan parameter yang berperan signifikan dalam proses maserasi pada senyawa fenolik. Diketahui secara teori bahwa semakin tinggi suhu yang digunakan untuk proses ekstraksi akan menyebabkan jaringan pada tumbuhan melunak dan yang selanjutnya setiap sel akan pecah. Akibatnya, senyawa target akan lebih mudah terekstraksi pada pelarut (Sulaiman *et al.*, 2017). Namun, pada beberapa senyawa apabila suhu yang digunakan terlalu tinggi, senyawa tersebut akan mengalami degradasi. Umumnya metode maserasi menggunakan teknik ekstraksi dingin tanpa adanya proses pemanasan (Abubakar and Haque, 2020).

5. Lama waktu ekstraksi

Peningkatan lama waktu maserasi dapat menyebabkan peningkatan nilai rendemen dan kadar total senyawa fenolik. Hal ini dikarenakan semakin lama waktu ekstraksi yang dilakukan akan mengakibatkan

kontak antara sampel dengan pelarut akan semakin tinggi sehingga terjadi proses ekstraksi terus menerus. Namun, pada titik tertentu pelarut akan mengalami kejenuhan sehingga proses reaksi terhenti (Prasetya *et al.*, 2020).

2.5.2 Remaserasi

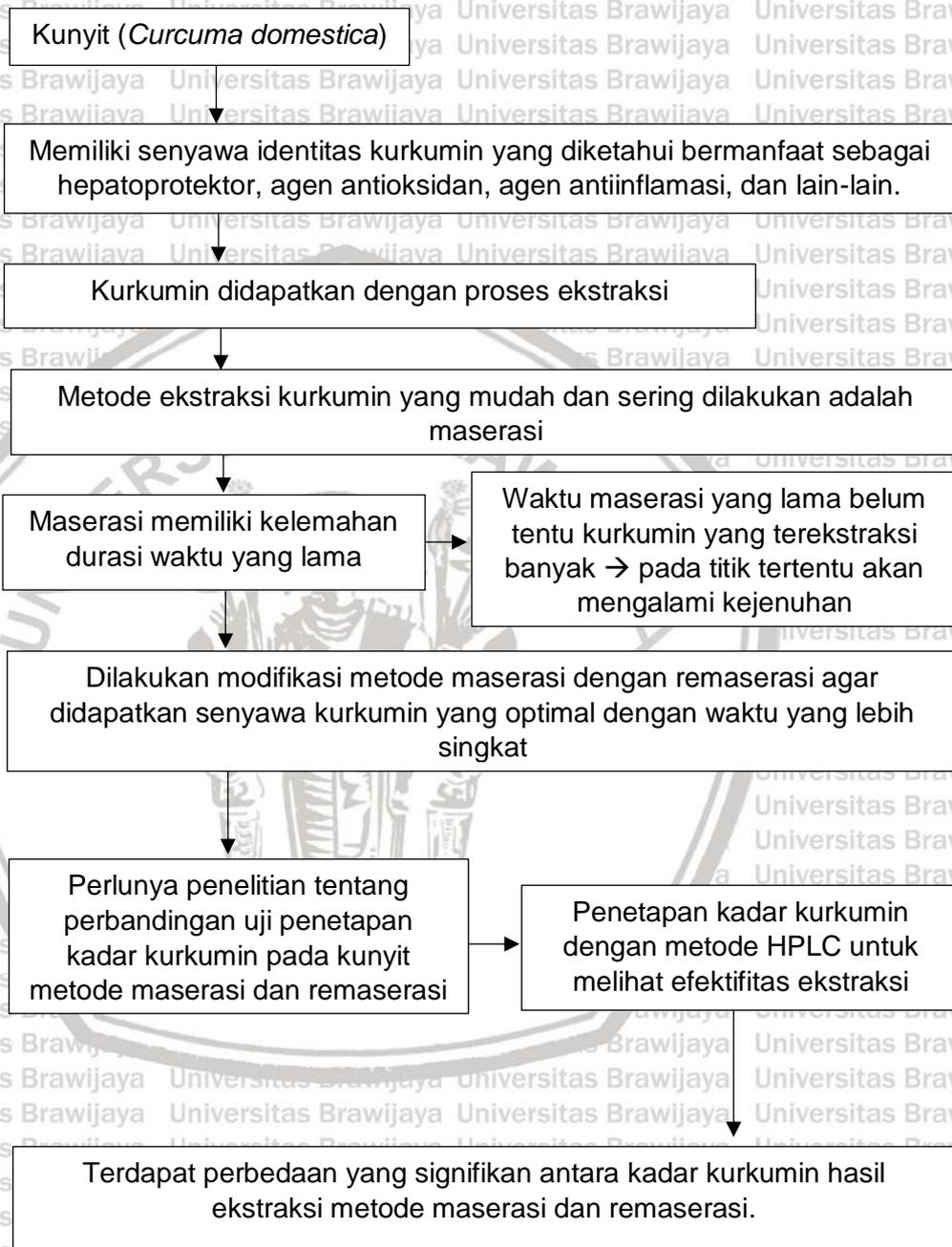
Remaserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang umum digunakan. Prinsip dari remaserasi adalah adanya pergantian solven atau pelarut pada waktu tertentu. Remaserasi merupakan salah satu teknik untuk optimasi ekstraksi maserasi. Diketahui bahwa teknik remaserasi bertujuan untuk memaksimalkan rendemen senyawa target (Šibul *et al.*, 2016). Adanya penambahan pelarut baru dapat menghasilkan *driving force* (berupa perbedaan pelarut) yang lebih besar sehingga terjadi perpindahan solut ke dalam pelarut yang lebih besar. Akibatnya konsentrasi solut akan meningkat dan menyebabkan (Rezki *et al.*, 2015).

Berdasarkan penjabaran tentang ekstraksi maka dapat dilakukan modifikasi studi perbandingan antara ekstraksi dengan metode maserasi dengan total waktu 12 jam dan remaserasi dengan waktu yang dipersingkat dengan total waktu 9 jam serta pergantian pelarut setiap 3 jam. Parameter ekstraksi lainnya ditetapkan dengan kondisi sama yaitu proses ekstraksi dengan pelarut etanol 96% pada suhu ruang, perbandingan serbuk dan pelarut 1:6, kecepatan pengadukan 452 rpm selama 30 menit.

BAB 3

KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Obat herbal menjadi salah satu pilihan pengobatan yang banyak dipilih oleh masyarakat pada saat ini karena harganya yang lebih murah dibandingkan obat konvensional (HEXAResearch, 2017). Kunyit (*Curcuma domestica*) merupakan salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat tradisional di beberapa negara. Kunyit digunakan sebagai obat tradisional karena memiliki manfaat yang banyak. Bagian dari tanaman kunyit yang banyak dimanfaatkan adalah rimpang. Rimpang kunyit diketahui memiliki senyawa indentitas yaitu kurkumin yang telah banyak diteliti memiliki beberapa manfaat antara lain sebagai antiinflamasi, antioksidan dan hepatoprotektor (Pulido-Moran *et al.*, 2016). Senyawa kurkumin dapat ditarik dari rimpang kunyit dengan cara ekstraksi. Salah satu metode ekstraksi yang sering dan mudah dilakukan adalah dengan metode maserasi. Metode maserasi memiliki kekurangan yaitu durasi waktu ekstraksi yang cukup lama untuk ekstraksi yang optimal dan waktu ekstraksi yang lama belum tentu optimal dalam penarikan kurkumin karena bisa jadi terjadi titik jenuh (Azwainda, 2015). Berdasarkan studi sebelumnya diketahui 12 jam dengan pelarut etanol 70%, suhu 80°C, perbandingan serbuk dan pelarut 1:6 dan kecepatan pengadukan 30 rpm merupakan waktu optimal dalam maserasi senyawa kurkumin dalam rimpang kunyit (Paulucci *et al.*, 2013). Studi lainnya menunjukkan bahwa kadar kurkumin dengan pelarut etanol 96% > etanol 80% > etanol 70% dengan parameter ekstraksi lainnya proses pengadukan 226 rpm, perbandingan serbuk dan pelarut 1:6, pada suhu ruang, selama 24 jam dan diremaserasi 2 kali (Ihsan *et al.*, 2018). Agar proses ekstraksi lebih optimal, dilakukan modifikasi dengan remaserasi yang diketahui dapat meningkatkan nilai rendemen pada senyawa target karena adanya solut yang terus menerus bergerak pada pelarut karena penambahan pelarut baru (Rezki *et al.*, 2015;

Sibul *et al.*, 2016). Diketahui pada penelitian sebelumnya, ekstraksi metode remaserasi meningkatkan jumlah rendemen ekstrak dibandingkan metode maserasi, namun belum dilakukan penelitian kuantitatif kadar kurkumin (Ningsih, *et al.*, 2018). HPLC diketahui merupakan salah satu instrumen yang dapat digunakan untuk menetapkan kadar kurkumin dalam sampel. HPLC diketahui mudah digunakan dan dapat memisahkan kandungan kurkumin secara sensitif, presisi, dan akurat dari senyawa lain yang terdapat di dalam ekstrak kunyit dan hasilnya dapat langsung diketahui melalui proses komputer (Ashraf and Sultan, 2017). Belum adanya penelitian yang melaporkan tentang perbandingan penetapan kadar kurkumin dari kunyit dengan variasi metode maserasi dan remaserasi.

3.2 Hipotesis Penelitian

Terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar kurkumin hasil ekstraksi metode maserasi dan remaserasi.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan merupakan penelitian eksperimental.

Hal ini dikarenakan akan dilakukan uji perbedaan hasil penetapan kadar kurkumin dikarenakan variasi metode maserasi dan remaserasi selama ekstraksi. Sampel yang digunakan adalah simplisia tanaman kunyit (*Curcuma domestica*) sedangkan metode uji penetapan kadar dilakukan dengan HPLC.

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi : Ekstrak kunyit

Sampel : Ekstrak kunyit hasil ekstraksi metode maserasi dan remaserasi dari simplisia rimpang kunyit yang mengandung kurkumin.

Sampel yang digunakan adalah ekstrak kunyit yang didapatkan dari hasil ekstraksi metode maserasi kurkumin dari serbuk simplisia kunyit.

Simplisia yang digunakan didapatkan dari Materia Medika Batu dengan surat determinasi untuk memastikan keaslian tanaman.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Perbedaan metode ekstraksi (maserasi dan remaserasi)

Variabel terikat : Kadar kurkumin pada ekstrak kunyit

Variabel kontrol : Kondisi HPLC, jenis pelarut, perbandingan solid/likuid, suhu ekstraksi, kecepatan pengadukan, lama waktu ekstraksi.

4.4 Lokasi dan Penelitian

Ekstraksi dan pengukuran kadar kurkumin dilakukan di Laboratorium Kimia Sarjana Farmasi FKUB selama bulan Januari-Maret 2021.

4.5 Bahan dan Alat

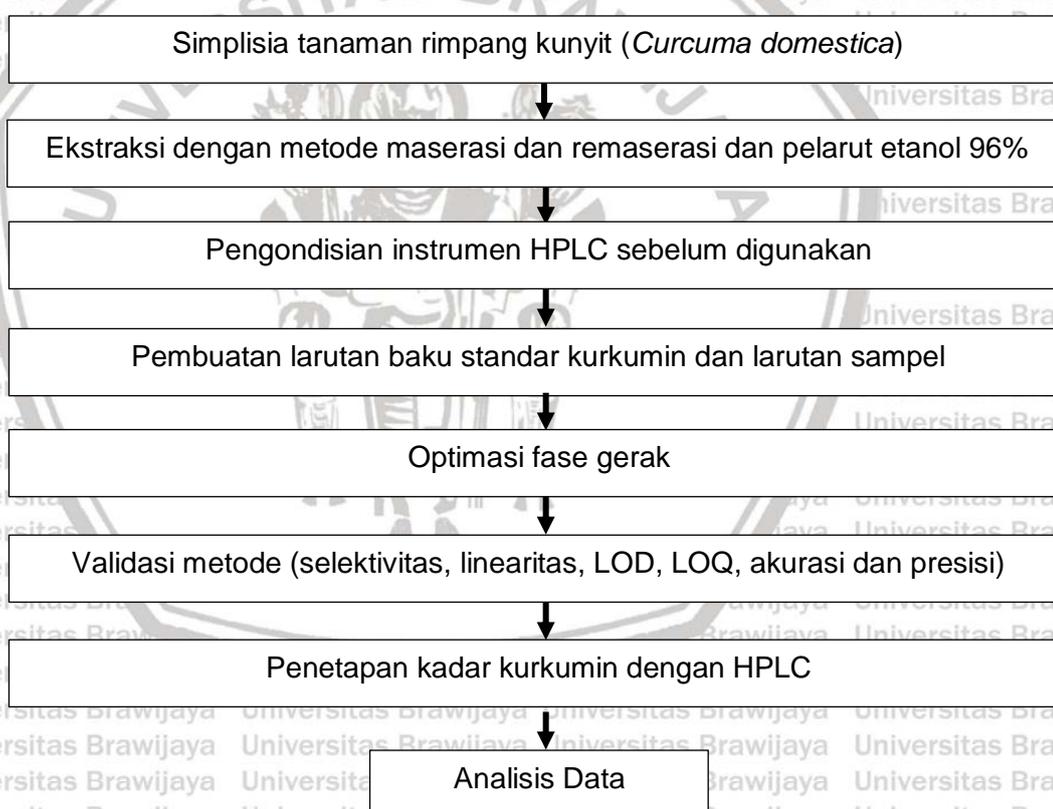
Bahan yang dibutuhkan antara lain standar kurkumin yang didapatkan dari *Tokyo Chemical Industry* (TCI) (kemurnian > 97%), sampel ekstrak rimpang kunyit sesuai kriteria, etanol 96% PA dengan merk SMART-LAB, *Acetonitrile gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv® Reag. Ph Eur.*, *Methanol for liquid chromatography LiChrosolv®*, dan *Water for Injection* Generik, *membrane filter nylon axiva* 0,45 µm untuk penyaringan fase gerak sebelum digunakan, *syringe*, *syringe filter ValuePrep™* 25 mm dengan membran *nylon* 0,2 µm. Alat yang digunakan adalah HPLC merk Shimadzu® *i-series LC-2030 LT* yang terdiri dari *touch screen LCD display*, *degasser* vakum, pompa kuarterner (LC-20AD), *degasser* (DGU-10A), sampel manual (SIL 20AC) dan detektor SPD-20AV *photodiode array* (PDA) (Shimadzu®, Kyoto, Jepang) dengan kolom Shim-pack VP-ODS (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Diikuti komputer Lenovo yang telah terinstal *software* Labsolution. Neraca analitik Ohaus Pioneer PX224/E *ExCal Analytical Balance*, pH meter merk TOA DKK HM30R, peralatan gelas dengan merk PYREX seperti labu ukur, pipet volume, corong buchner, *beaker glass* dan lain-lain untuk preparasi larutan standar dan sampel.

4.6 Definisi Istilah

1. Tanaman rimpang kunyit yang digunakan berasal dari Batu Materia Medica (BMM) berupa simplisia yang dipanen pada bulan Februari 2021.

2. Ekstrak tanaman rimpang kunyit merupakan ekstrak yang didapatkan dengan metode ekstraksi maserasi selama 12 jam dan remaserasi selama 9 jam dengan pergantian pelarut setiap 3 jam dengan etanol 96%.
3. Ekstrak tanaman dengan metode ekstraksi maserasi dilakukan dengan 3 kali replikasi dengan kode MK1, MK2 dan MK3 dengan MK merupakan kependekan dari Maserasi Kunyit.
4. Ekstrak tanaman dengan metode ekstraksi remaserasi dilakukan dengan 3 kali replikasi dengan kode RK1, RK2 dan RK3 dengan RK merupakan kependekan dari Remaserasi Kunyit.

4.7 Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alur Prosedur Penelitian

4.7.1 Ekstraksi

4.7.1.1 Ekstraksi Metode Maserasi

1. Simplisia kunyit (*Curcuma domestica*) diayak dengan ayakan no. mesh 18.

2. Hasil ayakan ditimbang sebanyak 50 g sebanyak 3x dengan neraca analitik.
3. Masing-masing hasil penimbangan direndam pada etanol 96% dengan perbandingan solid:pelarut 1:6 (300 mL) pada wadah tertutup rapat dan dijauhkan dari sinar matahari secara langsung.
4. Masing-masing hasil perendaman diaduk dengan *overhead stirrer* selama ± 30 menit dengan kecepatan 452 rpm.
5. Masing-masing rendaman didiamkan selama 12 jam pada suhu ruang dan dalam wadah yang tertutup rapat serta terhindar dari sinar matahari secara langsung.
6. Setelah didiamkan selama 12 jam, filtrat dan rendemen masing-masing dipisahkan dengan kain saring lalu dengan kertas saring Whattman.
7. Masing-Masing filtrat yang didapatkan dilakukan evaporasi pelarut dengan *rotary evaporator* pada kecepatan 40 rpm dan suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.
8. Ekstrak kental hasil evaporasi dikeringkan pada oven pada suhu 40°C hingga diperoleh bobot tetap (perbedaan 2 kali penimbangan berturut-turut setelah dikeringkan selama 1 jam tidak lebih dari 0,25%).
9. Didapatkan ekstrak MK1, MK2, dan MK3.
10. Dilakukan perhitungan % rendemen ekstrak dengan rumus:

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot tetap ekstrak yang didapatkan (g)}}{\text{Bobot awal simplisia (g)}} \times 100\%$$

4.7.1.2 Ekstraksi Metode Remaserasi

1. Simplisia kunyit (*Curcuma domestica*) diayak dengan ayakan no. mesh 18.
2. Hasil ayakan ditimbang sebanyak 50 g sebanyak 3x dengan neraca analitik.

3. Masing-masing hasil penimbangan direndam pada etanol 96% dengan perbandingan solid:pelarut total 1:6. Perendaman pertama dilakukan masing-masing dalam 100 mL etanol 96% pada wadah tertutup rapat dan dijauhkan dari sinar matahari secara langsung.
4. Masing-masing hasil perendaman diaduk dengan *overhead stirrer* selama ± 30 menit dengan kecepatan 452 rpm.
5. Masing-masing rendaman didiamkan selama 3 jam pada suhu ruang dan dalam wadah yang tertutup rapat serta terhindar dari sinar matahari secara langsung.
6. Setelah didiamkan selama 3 jam, dilakukan penyaringan dengan kain saring pada masing-masing rendaman sehingga didapatkan residu dan filtrat. Filtrat kemudian disimpan pada wadah tertutup rapat dan dihindarkan pada cahaya matahari secara langsung.
7. Masing-masing residu dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali setiap 3 jam (total waktu ekstraksi adalah 9 jam), dengan penambahan pelarut etanol 96% pada remaserasi 1 dan 2 masing-masing adalah 100 mL.
8. Setelah dilakukan ekstraksi, filtrat dan rendemen masing-masing dipisahkan dengan kain saring lalu dengan kertas saring Whattman.
9. Masing-masing filtrat yang didapatkan dilakukan evaporasi pelarut dengan *rotary evaporator* pada kecepatan 40 rpm dan suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.
10. Ekstrak kental hasil evaporasi dikeringkan pada oven pada suhu 40°C hingga diperoleh bobot tetap (perbedaan 2 kali penimbangan berturut-turut setelah dikeringkan selama 1 jam tidak lebih dari 0,25%).
11. Didapatkan ekstrak RK1, RK2, dan RK3.
12. Dilakukan perhitungan % rendemen ekstrak dengan rumus:

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot tetap ekstrak yang didapatkan (g)}}{\text{Bobot awal simplisia (g)}} \times 100\%$$

4.7.2 Optimasi Fase Gerak

Fase gerak dioptimasi dengan rincian pada (Tabel 4.1)

Tabel 4.1 Tabel komposisi fase gerak

No.	Komposisi	pH	Metode Pembuatan
1	Asetonitril:AAG:Air 50:1:49	2,96	Dicampurkan diluar dalam satu wadah
2	Asetonitril:AAG:Air 50:1:49	3,05	Dicampurkan diluar dalam satu wadah
3	Asetonitril:AAG 1% dalam air 45:55	2,66	Dibedakan menjadi dua botol berbeda dan pencampuran oleh HPLC

Fase gerak dalam satu wadah dipreparasi dengan cara:

1. Asetonitril 250 mL dimasukkan ke dalam *beaker glass*.
2. Disiapkan *Water for Injection* sebanyak 245 mL pada *beaker glass* lain.
3. Disiapkan asam asetat glasial sebanyak 5 mL, kemudian dimasukkan ke dalam *Water for Injection* dan diaduk.
4. Asetonitril dicampurkan dengan campuran asam asetat glasial dan air kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer*.
5. Dilakukan pengukuran pH kemudian didiamkan selama 10 menit dan dilakukan pengukuran pH kembali.
6. Setelah itu dilakukan penyaringan dengan corong *buchner* dan *membrane filter* 0,45 µm.
7. Filtrat dimasukkan pada tabung lainnya yang berisi pompa HPLC.

Fase gerak dalam dua botol berbeda dipreparasi dengan cara:

1. Asetonitril 500 mL dimasukkan ke dalam tabung yang berisi pompa HPLC.
2. Disiapkan *Water for Injection* sebanyak 495 mL dan Asam Asetat Glasial 5 mL.
3. Asam Asetat glasial dimasukkan ke dalam *Water for Injection* dan diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 5 menit.

4. Dilakukan pengukuran pH kemudian didiamkan selama 10 menit dan dilakukan pengukuran pH kembali.
5. Setelah itu dilakukan penyaringan dengan corong *buchner* dan *membrane filter* 0,45 μm .
6. Filtrat dimasukkan pada tabung lainnya yang berisi pompa HPLC.

4.7.3 Pengondisian HPLC

1. Instrumen HPLC dan komputer yang telah terpasang *software* Labsolution dihidupkan.
2. Dilakukan cuci kolom dengan metanol selama 1 jam.
3. Dilakukan pembuatan metode untuk penjalanan instrumen dengan rincian:

Fase gerak = sesuai (Tabel 4.1)

Metode = sesuai (Tabel 4.1)

Suhu kolom = 30°C

Laju alir = 1 mL/menit

Waktu *running* = 15 menit

Volume injeksi = 20 μL

Panjang gelombang = 190-800 nm

Waktu *Purging* = 15 menit fase gerak asetonitril, 15 menit AAG 1% dalam air (total 30 menit) untuk metode pencampuran oleh HPLC dan 15 menit untuk metode pencampuran luar.

4. Dilakukan *auto purge* pada injektor.
5. Dilakukan *baseline check* untuk mengetahui kestabilan detektor hingga terdapat notifikasi *pass*.
6. Apabila telah terdapat notifikasi *pass* dilakukan *System Suitability Test* (SST) dengan cara menginjeksikan larutan standar sebanyak 6 kali.

4.7.4 Preparasi Larutan Standar

4.7.4.1 Preparasi Larutan Standar untuk Validasi Metode

1. Standar kurkumin ditimbang 15 mg kemudian dilarutkan pada labu ukur 250 mL dan ditambahkan metanol hingga batas tanda.
2. Didapatkan larutan induk kurkumin 60 ppm.
3. Larutan induk 60 ppm dipipet sebanyak 2, 4, 6, 8, dan 9 mL dengan pipet volume dan masing-masing dilarutkan pada labu ukur 10 mL dengan metanol hingga batas tanda.
4. Didapatkan 5 larutan standar dengan konsentrasi 12, 24, 36, 48, dan 54 ppm.
5. Masing-masing larutan standar diambil menggunakan *syringe* dan disaring dengan *syringe filter* 0,2 μ m dan dimasukkan ke dalam vial HPLC dengan volume \pm 1,5 mL.

4.7.4.2 Preparasi Larutan Standar untuk Penetapan Kadar

1. Standar kurkumin ditimbang 10 mg kemudian dilarutkan pada labu ukur 10 mL dan ditambahkan metanol hingga batas tanda sehingga didapatkan larutan induk kurkumin 1000 ppm.
2. Larutan induk 1000 ppm dipipet 3 mL dengan pipet volume kemudian dimasukkan labu ukur labu ukur 25 mL dan ditambahkan metanol hingga batas tanda sehingga didapatkan larutan induk kurkumin 120 ppm.
3. Larutan induk 120 ppm dipipet sebanyak 1, 2, 3, 4 dan 5 mL dengan pipet volume dan masing-masing dilarutkan pada labu ukur 10 mL dengan metanol hingga batas tanda.
4. Didapatkan 5 larutan standar dengan konsentrasi 12, 24, 36, 48, dan 60 ppm.

5. Masing-masing larutan standar diambil menggunakan *syringe* dan disaring dengan *syringe filter* 0,2 μm dan dimasukkan ke dalam vial HPLC dengan volume $\pm 1,5$ mL.

4.7.5 Preparasi Larutan Sampel

1. Masing-masing ekstrak (ekstrak hasil maserasi dan remaserasi) ditimbang sebanyak 10 mg dengan neraca analitik.
2. Masing-masing hasil penimbangan dilarutkan pada labu ukur 10 mL dengan penambahan metanol hingga batas tanda sehingga didapatkan larutan induk untuk sampel MK1, MK2, MK3, RK1, RK2, dan RK3.
3. Masing-masing larutan induk sampel dipipet sebanyak 1 mL dan dilarutkan pada labu ukur 10 mL dengan penambahan metanol hingga batas tanda dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.
4. Didapatkan larutan uji sampel MK1, MK2, MK3, RK1, RK2, dan RK3 (total 18 larutan).
5. Masing-masing larutan uji sampel diambil menggunakan *syringe* dan disaring dengan *syringe filter* 0,2 μm dan dimasukkan ke dalam vial HPLC dengan volume $\pm 1,5$ mL (total 18 vial).

4.7.6 Validasi Metode

4.7.6.1 Selektivitas

1. Masing-masing vial larutan standar dengan konsentrasi 12, 24, 36, 48 dan 60 ppm dan larutan uji sampel dimasukkan ke dalam *tray* HPLC.
2. Vial yang telah dimasukkan kemudian diinjeksikan dengan kondisi HPLC yang telah ditentukan.
3. Setelah waktu *running* selesai, kemudian dilakukan analisis data dengan *software* LabSolution.
4. Didapatkan data kromatogram, waktu retensi, resolusi dan spektrum UV.

5. Dilakukan analisis selektivitas

4.7.6.2 Linearitas

1. Vial larutan standar dengan konsentrasi 12, 24, 36, 48 dan 54 ppm dimasukkan ke dalam tray HPLC
2. Vial yang telah dimasukkan kemudian diinjeksikan dengan kondisi HPLC yang telah ditentukan.
3. Setelah waktu *running* selesai, kemudian dilakukan analisis data dengan software LabSolution.
4. Didapatkan data kromatogram, waktu retensi dan area.
5. Dilakukan pengolahan data untuk linearitas menggunakan software *Microsoft Excel*.
6. Didapatkan persamaan regresi, nilai R, dan kurva kalibrasi.
7. Dilakukan analisis linearitas.

4.7.6.3 Limit of Detection (LOD)

LOD ditentukan berdasarkan kurva kalibrasi dengan cara dimasukkan ke dalam rumus:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

LOD = *Limit of Detection*

σ = Standar deviasi dari respon

S = *slope* dari kurva kalibrasi

4.7.6.4 Limit of Quantitation (LOQ)

LOQ ditentukan berdasarkan kurva kalibrasi dengan cara dimasukkan ke dalam rumus:

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

LOQ = *Limit of Quantitation*

σ = Standar deviasi dari respon

S = *slope* dari kurva kalibrasi

4.7.6.5 Akurasi dan Presisi

1. Standar kurkumin ditimbang 15 mg kemudian dilarutkan pada labu ukur 250 mL dan ditambahkan metanol hingga batas tanda.
2. Didapatkan larutan induk kurkumin 60 ppm.
3. Larutan induk 60 ppm dipipet sebanyak 4, 5, dan 6 mL dengan pipet volume dan masing-masing dilarutkan pada labu ukur 10 mL dengan metanol hingga batas tanda (dilakukan replikasi sebanyak 3 kali pada masing-masing konsentrasi).
4. Didapatkan 3 larutan uji untuk akurasi dan presisi dengan konsentrasi 24, 30 dan 36 ppm dengan 3 kali replikasi (total 9 larutan).
5. Masing-masing larutan standar diambil menggunakan *syringe* dan disaring dengan *syringe filter* 0,2 μm dan dimasukkan ke dalam vial HPLC dengan volume $\pm 1,5$ mL (total 9 vial).
6. Masing-masing dimasukkan ke dalam *tray* HPLC.
7. Vial yang telah dimasukkan kemudian diinjeksikan dengan kondisi HPLC yang telah ditentukan.
8. Setelah waktu *running* selesai, kemudian dilakukan analisis data dengan software LabSolution.
9. Didapatkan data kromatogram, waktu retensi dan area.
10. Dilakukan pengolahan data untuk akurasi dan presisi menggunakan software *Microsoft Excel*.
11. Nilai akurasi diperoleh dengan rumus:

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{Konsentrasi analit yang didapatkan}}{\text{Konsentrasi analit awal yang diketahui}} \times 100\%$$

12. Dilakukan analisis akurasi.

13. Nilai presisi diperoleh dengan rumus:

$$\%RSD = \frac{s}{m} \times 100\%$$

(dengan s adalah standar deviasi dan m adalah rata-rata hasil pengukuran)

14. Dilakukan analisis presisi.

4.7.6.6 Penetapan Kadar Kurkumin

1. Masing-masing vial larutan standar dengan konsentrasi 12, 24, 36, 48, dan 60 ppm serta larutan sampel sebanyak 18 vial dimasukkan ke dalam tray HPLC.

2. Vial yang telah dimasukkan kemudian diinjeksikan dengan kondisi HPLC yang telah ditentukan.

3. Setelah waktu *running* selesai, kemudian dilakukan analisis data dengan software LabSolution.

4. Didapatkan data kromatogram, waktu retensi dan area, spektrum UV.

5. Dilakukan pengolahan data menggunakan software Microsoft Excel.

6. Didapatkan persamaan regresi yang kemudian hasil area sampel masing-masing dimasukkan ke dalam persamaan regresi dan didapatkan data konsentrasi (ppm).

7. Dilakukan analisis kadar dan diubah menjadi satuan %b/b.

4.8 Analisis Data

Data hasil penetapan kadar yang diperoleh, kemudian dianalisis secara statistik menggunakan aplikasi JASP 0.14.1.0 dan IBM SPSS Statistics

23 untuk membuktikan kebenaran dari hipotesis yang diambil. Uji yang

dilakukan pada penelitian ini adalah uji-t tidak berpasangan karena hanya ada

dua kelompok perlakuan. Syarat yang diperlukan untuk melakukan uji-t tidak

berpasangan adalah data yang didapatkan harus terdistribusi normal dan

varian data homogen. Maka, sebelum melakukan uji-t tidak berpasangan, maka harus dilakukan uji normalitas Shapiro-Wilk dan uji homogenitas varian Levenes. Apabila data yang didapatkan tidak normal dan atau tidak homogen maka perlu dilakukan uji alternatif yaitu uji nonparametrik. Uji nonparametrik untuk uji-t tidak berpasangan adalah uji Mann-Whitney.

4.8.1 Uji Normalitas

Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui distribusi dari populasi data yang didapatkan terdistribusi secara normal atau tidak. Uji normalitas juga akan menentukan jenis uji statistik yang ditentukan (parametrik atau nonparametrik). Uji normalitas yang digunakan adalah Shappiro-Wilk. Taraf kepercayaan yang digunaan adalah 95%, sehingga populasi data dikatakan terdistribusi normal apabila hasil tes adalah nilai signifikansi $p > 0,05$.

4.8.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas bertujuan untuk mengetahui populasi data dari sampel yang didapatkan bersifat homogen atau tidak. Uji homogenitas juga akan menentukan jenis uji statistik yang ditentukan (parametrik atau nonparametrik). Uji homogenitas yang digunakan adalah Levene's test. Taraf kepercayaan yang digunaan adalah 95%, sehingga populasi data dikatakan terdistribusi normal apabila hasil tes adalah nilai signifikansi $p > 0,05$.

4.8.3 Uji-T Tidak Berpasangan

Uji-t tidak berpasangan merupakan uji parametrik yang digunakan untuk menganalisis perbandingan kadar kurkumin yang dilakukan dengan dua metode berbeda yaitu maserasi dan remaserasi. Uji-t berpasangan dilakukan apabila terdapat dua kelompok variabel yang tidak berpasangan pada penelitian yang dilakukan. Taraf kepercayaan yang digunaan adalah 95%, sehingga data dikatakan berbeda signifikan apabila nilai signifikansi $p < 0,05$.

4.8.4 Uji Mann-Whitney

Uji Mann-Whitney merupakan alternatif uji nonparametrik dari uji-t tidak berpasangan (digunakan apabila data tidak terdistribusi normal dan atau tidak homogen). Taraf kepercayaan yang digunakan adalah 95%, sehingga data dikatakan berbeda signifikan apabila nilai signifikansi $p < 0,05$.



BAB 5

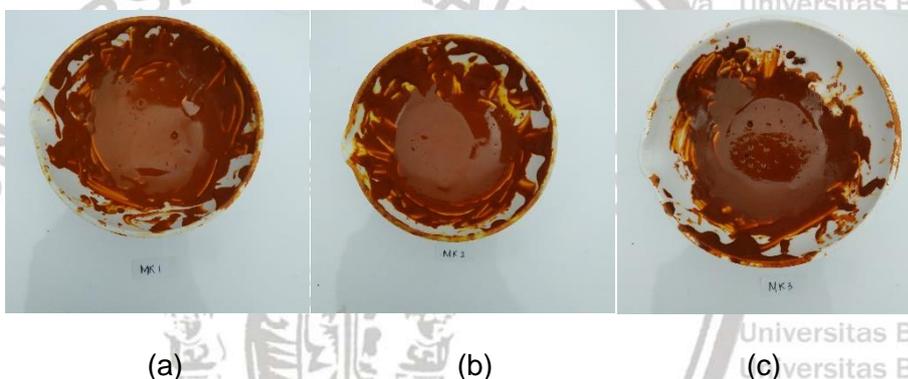
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan dua metode yaitu maserasi dan remaserasi dengan masing-masing dilakukan tiga kali replikasi.

5.1.1 Maserasi

Hasil ekstrak metode maserasi yang didapatkan dengan bobot tetap terlampir pada (Gambar 5.1). Hasil penimbangan simplisia, penimbangan ekstrak dengan bobot tetap, dan % rendemen ekstrak terlampir pada (Tabel 5.1).



Gambar 5.1 Gambar Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica*) Etanol 96% dengan Metode Maserasi Selama 12 jam (a) MK1 (b) MK2 (c) MK3

Keterangan : ketiga ekstrak berwarna oranye gelap cenderung kecoklatan, berbau khas dan berkonsistensi sangat kental

Tabel 5.1 Hasil Penimbangan Simplisia, Penimbangan Ekstrak dengan Bobot Tetap, dan Persen Rendemen Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) metode maserasi

Sampel	Bobot Simplisia (g)	Bobot tetap ekstrak (g)	% Rendemen	Rata-rata %Rendemen	%RSD
MK1	50,0035	3,3073	6,6%	7,10 ± 0,436 %	6,139%
MK2	50,0015	3,6525	7,3%		
MK3	50,0013	3,6795	7,4%		

Keterangan: MK1 = Maserasi Kunyit 1, MK2 = Maserasi Kunyit 2, MK3 = Maserasi Kunyit 3

5.1.2 Remaserasi

Hasil ekstrak metode remaserasi yang didapatkan dengan bobot tetap terlampir pada (Gambar 5.2). Hasil penimbangan simplisia, penimbangan ekstrak dengan bobot tetap, dan % rendemen terlampir pada (Tabel 5.2).



(a)

(b)

(c)

Gambar 5.2 Gambar Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica*) Etanol 96% dengan Metode Remaserasi Selama 9 jam (a) RK1 (b) RK2 (c) RK3

Keterangan : ketiga ekstrak berwarna oranye gelap cenderung kecoklatan, berbau khas dan berkonsistensi sangat kental

Tabel 5.2 Hasil Penimbangan Simplisia, Penimbangan Ekstrak dengan Bobot Tetap, dan Persen Rendemen Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) metode remaserasi

Sampel	Bobot Simplisia (g)	Bobot tetap ekstrak (g)	% Rendemen	Rata-rata %Rendemen	%RSD
RK1	50,0013	2,9111	5,8%	7,13 ± 1,159 %	16,248%
RK2	50,0010	3,8349	7,7%		
RK3	50,0003	3,972	7,9%		

Keterangan: RK1 = Remaserasi Kunyit 1, RK2 = Remaserasi Kunyit 2, RK3 = Remaserasi Kunyit 3

5.2 Optimasi Fase Gerak

Hasil optimasi fase gerak diketahui terlampir pada (Tabel 5.5), Optimasi ini bertujuan untuk mengetahui fase gerak yang baik dalam melakukan pemisahan senyawa target. Pemisahan yang baik diketahui dari nilai resolusi. Resolusi (R_s) yang baik berdasarkan *guideline* AOAC adalah $R_s > 1,5$ (AOAC International, 2012).

Tabel 5.3 Tabel Hasil Optimasi Fase Gerak

Optimasi ke-	pH	Label	λ_{maks} (nm)	Waktu retensi	Resolusi
1	2,965	Standar 30 ppm	427	6,010 menit	12,371
		RK1	427	6,004 menit	1,576
2	3,050	Standar 30 ppm	427	6,562 menit	12,64
		RK1	427	6,556 menit	1,569
3	2,660	Standar 30 ppm	428	12,731 menit	26,237
		RK1	427	12,712 menit	1,733

5.3 Kondisi Operasional HPLC

Validasi metode analisis dan penetapan kadar kurkumin dalam ekstrak rimpang kunyit dilakukan dengan metode low pressure gradient dan terdiri dari fase gerak C dan D. Fase gerak C terdiri dari *Water for Injection* yang ditambahkan dengan acetic glacial acid gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv® hingga pH 2,660 yang telah disaring dengan filter Nylon Axiva 0.45 μm dan fase gerak D terdiri dari Acetonitrile gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv® Reag. Ph. Eur. Laju allir yang digunakan adalah 1 mL/menit dengan perbandingan fase gerak C: fase gerak D adalah 55:45. Kolom HPLC yang digunakan diletakkan dengan posisi reverse-phased dan suhu diatur pada 30°C. Detektor yang digunakan adalah detektor SPD-20AV *photodiode array* (PDA) (Shimadzu®, Kyoto, Jepang) dan diatur pada panjang gelombang analisis 190 nm-800 nm. Suhu autosampler dikondisikan pada 15°C. Lama waktu menjalankan HPLC untuk setiap sampel adalah 15 menit.

HPLC merk Shimadzu® i-series LC-2030 LT yang digunakan dioperasikan dengan *software* Labsolution yang terpasang pada personal computer. Sebelum dilakukan analisis pada standar kurkumin dan sampel, kolom HPLC dibersihkan dengan methanol gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv® Reag. Ph. Eur. selama 1 jam. Setelah kolom dibersihkan dilakukan pembersihan injektor (*autopurge*) dengan fase gerak

selama 30 menit. Setelah dilakukan *autopurge* dilakukan *baseline check* untuk melihat kestabilan dari detektor.

Setelah dilakukan *baseline check*, *System Suitability Test* (SST) dibutuhkan untuk mengetahui akurasi dan presisi dari sistem HPLC yang digunakan dengan melihat dari beberapa parameter seperti (CDER, 1994):

- a) *Capacity factor* (k') merupakan parameter untuk mengetahui kemampuan kolom dalam mempertahankan sampel pada fase diam terhadap fase gerak. Umumnya nilai k' yang direkomendasikan adalah > 2 .
- b) Presisi dari injeksi berulang yang dinyatakan dalam RSD untuk mengetahui kemampuan analisis HPLC pada saat sampel dianalisis termasuk di dalamnya adalah kondisi kolom dan kondisi lingkungan sistem HPLC. Nilai RSD yang direkomendasikan adalah $\leq 1\%$ untuk jumlah sampel ≥ 5 .
- c) Resolusi (R_s) merupakan parameter untuk menghitung baik atau tidaknya dua puncak terpisah saat proses pemisahan dalam kolom termasuk untuk mengetahui pemisahan dari pengotor yang mungkin mengganggu. Nilai R_s yang direkomendasikan adalah > 2 antara puncak yang diinginkan dengan puncak yang mungkin mengganggu.
- d) *Tailing factor* (T) merupakan parameter untuk mengetahui simetris atau tidaknya puncak yang ditargetkan. Apabila nilai T tinggi dapat menurunkan keakuratan dari hasil data dikarenakan tidak dapat dijelaskan kapan puncak akan berhenti. Nilai T yang direkomendasikan adalah ≤ 2 .
- e) *Theoretical plate number* (N) merupakan parameter untuk mengukur efisiensi kolom dengan mengetahui berapa banyak puncak yang dapat

terdeteksi setiap waktu *running* dari kromatogram. Umumnya nilai $N > 2000$.

Hasil dari SST dengan $n = 6$, terlampir pada (Tabel 5.4) dan (Tabel 5.5).

Tabel 5.4 Tabel Hasil Analisis SST pada Standar 36 ppm untuk Validasi Metode Linearitas, LOD dan LOQ, serta Akurasi dan Presisi

No.	Waktu retensi (menit)	Area	k'	Rs	T	N	RSD waktu retensi	RSD area
1.	12,737	5263449	8,477	18,398	1,289	6026	0,001%	0,009%
2.	12,716	5341686	8,537	27,474	1,274	6063		
3.	12,717	5361608	8,167	28,044	1,262	6070		
4.	12,720	5389126	8,115	25,714	1,255	6096		
5.	12,742	5378062	8,382	18,472	1,247	6103		
6.	12,759	5384538	8,459	25,443	1,241	6134		
Rata-rata	12,732	5353078	8,356	23,924	1,261	6082		

Tabel 5.5 Tabel Hasil Analisis SST pada Standar 36 ppm untuk Penetapan Kadar Ekstrak Kunyit

No.	Waktu retensi (menit)	Area	k'	Rs	T	N	RSD waktu retensi	RSD area
1.	12,556	6485966	8,459	18,912	1,210	6622	0,001%	0,005%
2.	12,543	6558345	8,473	18,711	1,200	6576		
3.	12,551	6546267	8,452	18,601	1,192	6597		
4.	12,549	6560638	8,488	18,795	1,188	6578		
5.	12,522	6576953	8,411	18,702	1,183	6559		
6.	12,519	6584300	8,286	18,503	1,178	6579		
Rata-rata	12,540	6552078	8,428	18,704	1,192	6585		
1.	12,662	6402457	8,519	19,096	1,216	6682	0,003%	0,010%
2.	12,626	6511581	8,460	18,695	1,202	6668		
3.	12,620	6595855	7,983	18,936	1,197	6700		
4.	12,599	6531930	8,400	18,905	1,193	6725		
5.	12,577	6535645	8,431	18,970	1,188	6706		
6.	12,553	6536423	8,383	18,782	1,185	6714		
Rata-rata	12,606	6518982	8,363	18,897	1,197	6699		

5.4 Validasi Metode

5.4.1 Selektivitas

Selektivitas merupakan salah satu parameter validasi metode untuk menganalisis sejauh mana metode analisis yang digunakan dapat memisahkan senyawa target dari pengotor yang mungkin terukur saat dilakukan pengukuran serta memastikan bahwa senyawa target dapat terukur dengan membandingkan sampel yang diuji dengan standar. Data untuk memastikan bahwa senyawa target telah terpisah dari senyawa lain yang terdapat pada sampel adalah resolusi. Resolusi yang baik berdasarkan *guideline* AOAC adalah $R_s > 1,5$ (AOAC International, 2012). Rentang waktu retensi standar pada beberapa konsentrasi adalah 12,472-12,564 menit. Sedangkan rentang rata-rata waktu retensi sampel adalah 12,442-12,516 menit.

Tabel 5.6 Tabel Hasil Uji Selektivitas Sampel

Sampel	λ_{maks} (nm)	Replikasi	Waktu retensi (menit)	Rata-rata waktu retensi (menit)	Resolusi	Rata-rata resolusi
MK1	427	1	12,499	12,475	1,848	1,849
	427	2	12,471		1,847	
	427	3	12,456		1,852	
MK2	427	1	12,439	12,442	1,857	1,860
	427	2	12,446		1,858	
	427	3	12,440		1,864	
MK3	427	1	12,446	12,442	1,858	1,858
	427	2	12,437		1,858	
	427	3	12,442		1,858	
RK1	427	1	12,537	12,516	1,839	1,843
	427	2	12,515		1,842	
	427	3	12,495		1,848	
RK2	427	1	12,473	12,453	1,846	1,8493
	427	2	12,446		1,850	
	427	3	12,439		1,852	
RK3*	427	1	12,552	12,548	1,849	1,8477
	427	2	12,549		1,847	
	427	3	12,544		1,847	

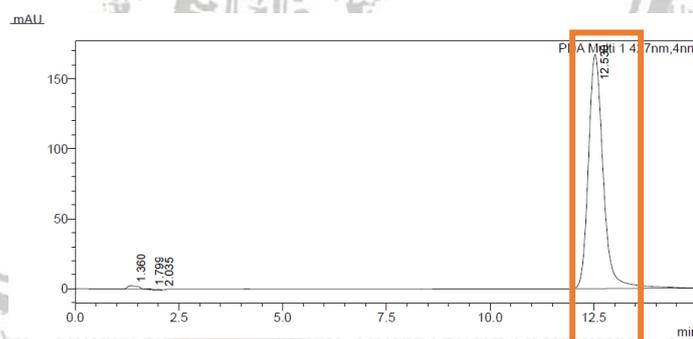
Keterangan: *: dilakukan di hari yang berbeda

Tabel 5.7 Tabel Hasil Waktu Retensi Standar Kurkumin

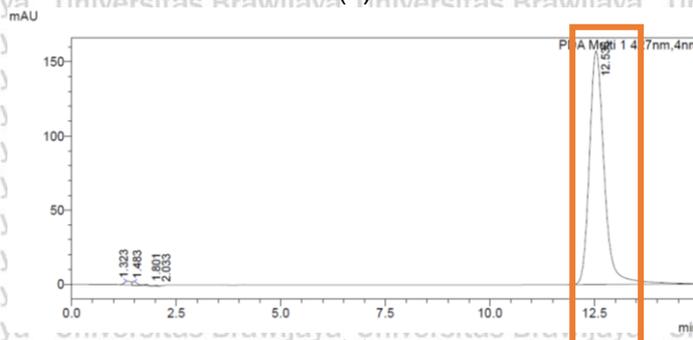
Nama	λ_{maks} (nm)	Replikasi	Waktu Retensi (menit)	Rata-rata Waktu Retensi (menit)
Standar 12 ppm	427	-	12,526	12,526
Standar 24 ppm	427	-	12,530	
Standar 36 ppm	427	-	12,523	
Standar 48 ppm	427	-	12,526	
Standar 60 ppm	427	-	12,523	
Standar 12 ppm*	427	-	12,564	12,514
Standar 24 ppm*	427	-	12,536	
Standar 36 ppm*	427	-	12,514	
Standar 48 ppm*	427	-	12,486	
Standar 60 ppm*	427	-	12,472	

Keterangan: *: dilakukan di hari yang berbeda

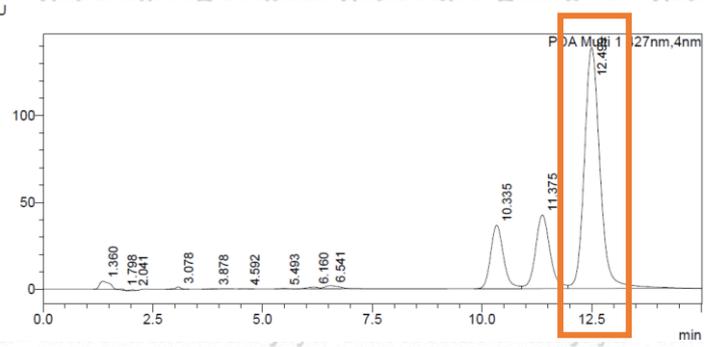
Selain itu, pada uji selektivitas dapat dilihat pula spesifisitas metode, yakni untuk mengetahui kemampuan metode dengan mengukur antara analit standar dengan sampel untuk membuktikan bahwa senyawa yang diharapkan benar-benar ada. Data yang didapatkan dengan cara membandingkan secara visual antara spektrum atau kromatogram antara standar dengan sampel (United States Pharmacopeia, 2006).



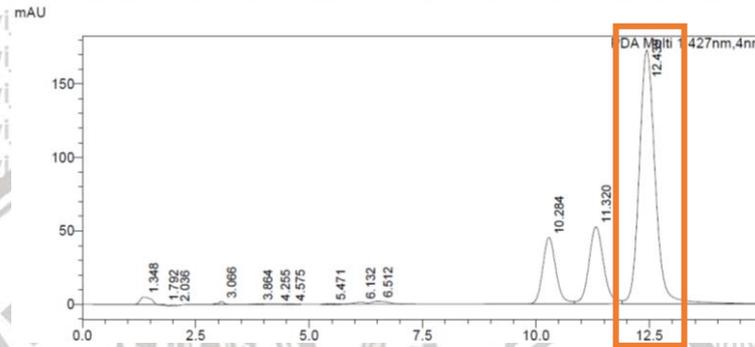
(a)



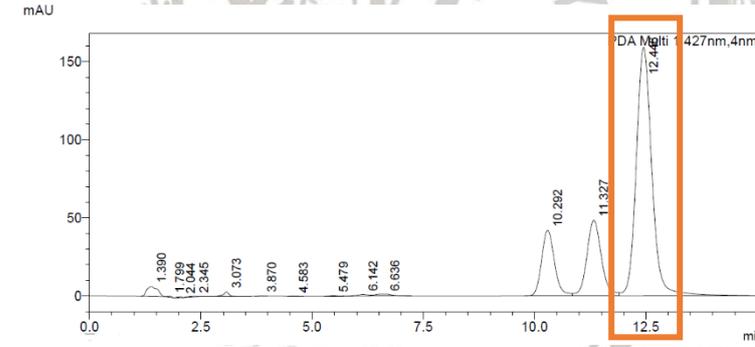
(b)



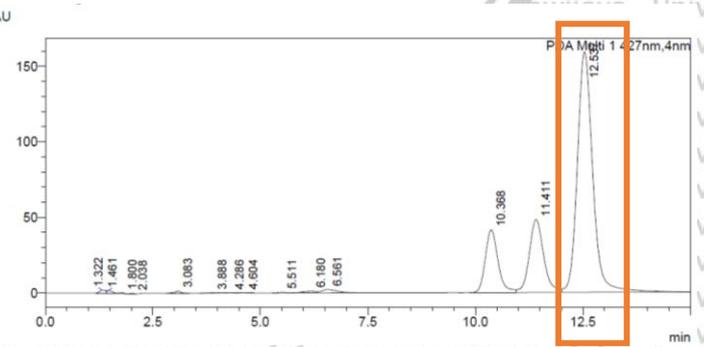
(c)



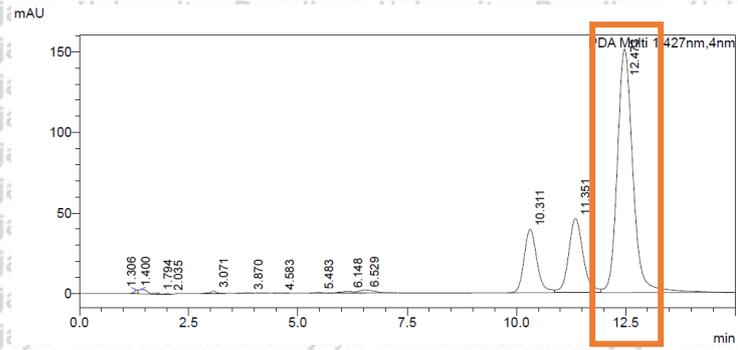
(d)



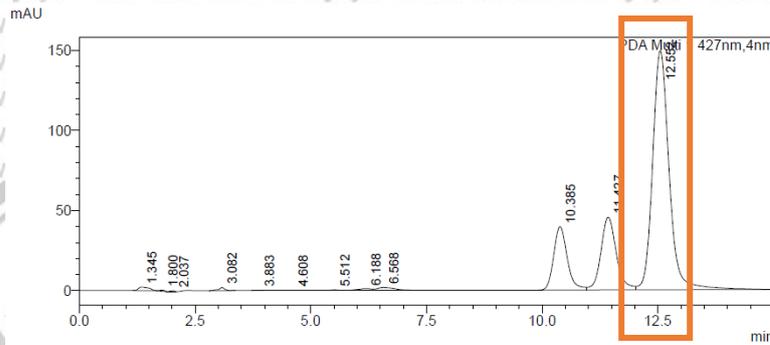
(e)



(f)

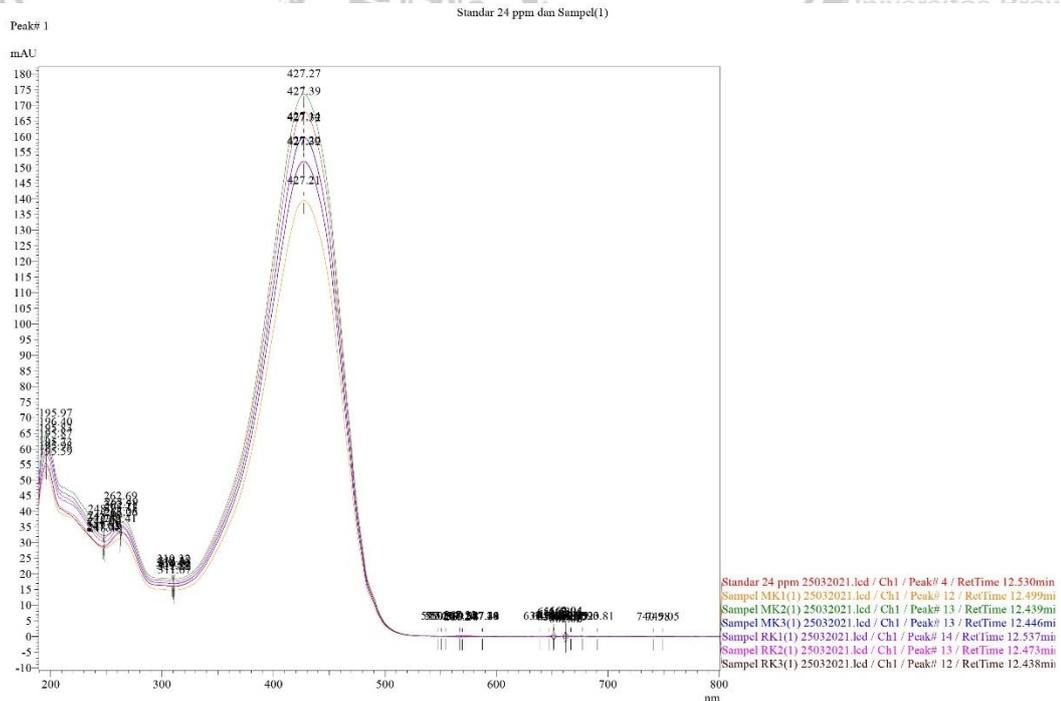


(g)



(h)

Gambar 5.3 Kromatogram dari (a) Standar 24 ppm (b) Standar 24 ppm pada beda hari untuk pengukuran RK3 (c) Sampel MK1 (d) Sampel MK2 (e) Sampel MK3 (f) Sampel RK1 (g) Sampel RK2 (h) Sampel RK3

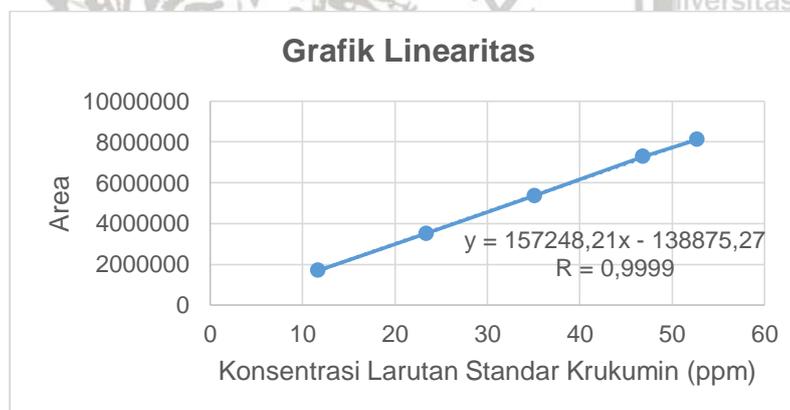


Gambar 5.4 Overlay spektrum standar 24 ppm dan sampel

5.4.2 Linearitas

Linearitas merupakan salah satu parameter validasi metode yang bertujuan untuk mengetahui respon dari instrumen yang digunakan dengan metode analisis yang telah ditentukan berbanding lurus dengan konsentrasi analit dalam rentang beberapa konsentrasi. Data yang didapatkan adalah persamaan regresi dan koefisien korelasi. Persyaratan untuk koefisien korelasi berdasarkan AOAC adalah $r > 0,99$.

Linearitas diperoleh dengan cara menginjeksikan 5 larutan standar kurkumin dengan konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi larutan standar kurkumin yang diinjeksikan untuk uji linearitas yaitu 12 ppm, 24 ppm, 36 ppm, 48 ppm, dan 54 ppm dan didapatkan persamaan regresi $y = 157248,21x - 138875,27$ dengan nilai koefisien korelasi $r = 0,9999$.



Gambar 5.5 Grafik Linearitas Larutan Standar Kurkumin dengan Konsentrasi 12 ppm, 24 ppm, 36 ppm, 48 ppm, dan 54 ppm

5.4.3 *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantitation (LOQ)*

Nilai LOD didapatkan berdasarkan perhitungan dari persamaan linearitas dengan menggunakan nilai standar deviasi dari garis regresi dengan rumus yang telah ditentukan. Nilai LOD dan LOQ yang didapatkan

berturut-turut adalah 0,875 ppm dan 2,653 ppm. Perhitungan LOD dan LOQ dapat dilihat pada lampiran 3.

5.4.4 Akurasi dan Presisi

Akurasi merupakan kedekatan nilai hasil dengan nilai sebenarnya, dinyatakan dengan persen *recovery* atau persen perolehan kembali. Presisi merupakan kedekatan nilai hasil analisis ketika kondisi telah diatur dan data yang didapatkan adalah persen RSD. Hasil akurasi dan presisi yang dilakukan adalah pada hari yang sama (*repeatability*) dengan membuat 3 level konsentrasi yaitu 24 ppm, 30 ppm, dan 36 ppm dengan faktor koreksi kurkumin 97% sehingga didapatkan konsentrasi sebenarnya adalah 23,44 ppm, 29,29 ppm, dan 35,15 ppm. Masing-masing konsentrasi dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Berdasarkan lampiran (Tabel 5.8) rata-rata persen perolehan kembali untuk konsentrasi 24 ppm adalah 98,72%, sedangkan pada konsentrasi 30 ppm adalah 99,57%, dan pada konsentrasi 36 ppm adalah 99,32%. Rentang persen perolehan kembali yang didapatkan adalah 98,72%-99,57%. Hasil persen perolehan kembali yang didapatkan kemudian dibandingkan dengan persyaratan dari AOAC tahun 2016 yang terlampir pada (Tabel 2.1). Berdasarkan konsentrasi yang digunakan untuk uji akurasi, rentang persyaratan persen perolehan kembali yang ditentukan adalah 98-102%. Diketahui pada lampiran (Tabel 5.8) nilai persen RSD untuk konsentrasi 24 ppm adalah 0,54%, pada konsentrasi 30 ppm adalah 1,07%, dan pada konsentrasi 36 ppm adalah 1,15%. Hasil nilai presisi yang didapatkan kemudian dibandingkan dengan persyaratan dari AOAC tahun 2016 yang terlampir pada (Tabel 2.2). Pada konsentrasi yang telah ditetapkan, rentang persyaratan persen RSD yang ditentukan adalah 1,3%.

Tabel 5.8 Tabel Hasil Akurasi dan Presisi

No.	Kons. sebenarnya (ppm)	Area	Kons. Hasil (ppm)	%recovery (%)	Rata-rata %recovery	%RSD
1.	23,44	3485603	23,05	98,33	98,72%	0,54%
		3491709	23,09	98,50		
		3522517	23,28	99,34		
2.	29,29	4452771	29,20	99,69	99,57%	1,07%
		4394952	28,83	98,44		
		4493020	29,46	100,57		
3.	35,15	5298393	34,58	98,37	99,32%	1,15%
		5333731	34,80	99,01		
		5421066	35,36	100,59		

5.5 Penetapan Kadar Kurkumin

Penetapan kadar dilakukan pada ekstrak kunyit dengan perbedaan metode ekstraksi, yaitu maserasi dan remaserasi. Preparasi sampel yang dilakukan adalah dengan menimbang sebanyak 10 mg pada masing-masing ekstrak (n = 3). Masing-masing ekstrak yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam 10 mL metanol dan kemudian diambil 1 mL dan diencerkan hingga volume 10 mL. Pengenceran dilakukan masing-masing sebanyak 3x untuk replikasi. Hasil larutan yang didapatkan kemudian diinjeksikan ke dalam HPLC untuk dianalisis dan data yang didapatkan adalah area. Area dari masing-masing penginjeksian dimasukkan ke dalam persamaan garis regresi sehingga didapatkan kadar kurkumin dalam sampel. Data hasil penetapan kadar terlampir pada (Tabel 5.9)

Tabel 5.9 Tabel Hasil Penetapan Kadar pada Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica*)

N o.	Sampel	Hasil Timbang (mg)	Persamaan Regresi	Area	Kons. Larutan Uji (ppm)	Kandungan kurkumin perolehan kembali (mg)	%b/b kurkumin (%)	Rata-rata %b/b kurkumin	%RSD (%)
1.	MK1	10,1		3439521	19,77	1,98	19,57	19,74 ± 0,20 %	1,007
				3513523	20,16	2,02	19,96		
				3463008	19,89	1,99	19,70		
2.	MK2	10,4		4213753	23,88	2,39	22,96	22,62 ± 0,32 %	1,416
				4090419	23,23	2,32	22,33		
				4132704	23,45	2,35	22,55		
3.	MK3	10,4	y = 188242,46x - 281870,89 dengan r = 0,9997	3881789	22,12	2,21	21,27	21,17 ± 0,11 %	0,536
				3837943	21,89	2,19	21,04		
				3866140	22,04	2,20	21,19		
4.	RK1	10,4		3970699	22,59	2,26	21,72	21,45 ± 0,33 %	1,552
				3845314	21,92	2,19	21,08		
				3939063	22,42	2,24	21,56		
5.	RK2	10,1		3743094	21,38	2,14	21,17	21,61 ± 0,38 %	1,771
				3858684	22,00	2,20	21,78		
				3877381	22,10	2,21	21,88		
6.	RK3	10,4	y = 180760,17x - 225484,6 dengan r = 0,9986	3712716	21,22	2,12	20,40	20,66 ± 0,31 %	1,506
				3830828	21,85	2,18	21,01		
				3745799	21,40	2,14	20,57		

5.6 Analisis Statistik

Analisa statistik untuk data yang telah didapatkan menggunakan aplikasi JASP versi 0.14.1.0. Nilai *aplha* (α) yang digunakan adalah 5% dengan taraf kepercayaan 95%.

5.6.1 Uji Normalitas

Hasil pengolahan data uji normalitas Shappiro-Wilk penetapan kadar kurkumin pada ekstrak kunyit dari dua kelompok metode ekstraksi (maserasi dan remaserasi) terlampir pada (Tabel 5.10). Populasi data dikatakan normal apabila hasil uji menunjukkan nilai $p > 0,05$ (Hui, 2019).

Tabel 5.10 Tabel Hasil Uji Normalitas

Kelompok Data	Nilai signifikansi (p)	Keterangan
Maserasi	0,378	Normal
Remaserasi	0,431	Normal

5.6.2 Uji Homogenitas

Hasil pengolahan data uji homogenitas Levene penetapan kadar kurkumin pada ekstrak kunyit dari dua kelompok metode ekstraksi (maserasi dan remaserasi) terlampir pada (Tabel 5.11). Populasi data dikatakan homogen apabila hasil uji menunjukkan nilai $p > 0,05$ (Hui, 2019).

Tabel 5.11 Tabel Hasil Uji Homogenitas

Data	Nilai signifikansi (p)	Keterangan
Kadar Kurkumin	0,044	Tidak homogen

5.6.3 Uji Mann-Whitney

Pada penelitian ini, uji statistika yang digunakan adalah uji nonparametrik Mann-Whitney dikarenakan data yang diperoleh tidak memenuhi syarat untuk uji parametrik. Data yang didapatkan terdistribusi normal, namun tidak homogen. Hasil uji Mann-Whitney dari pengolahan data kadar kurkumin dengan dua kelompok sampel (maserasi dan remaserasi) terlampir pada (Tabel 5.12). Apabila hasil uji menunjukkan nilai $p > 0,05$ berarti tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok 1 dan kelompok 2 dan apabila hasil uji menunjukkan nilai $p < 0,05$ berarti terdapat perbedaan signifikan antara kelompok 1 dan kelompok 2 (Hui, 2019).

Tabel 5.12 Tabel Hasil Uji Mann-Whitney

Data	Nilai signifikansi (p)	Keterangan
Kadar Kurkumin	1,000	Tidak berbeda signifikan

Berdasarkan hasil uji deskriptif, diketahui nilai rata-rata dari kelompok maserasi adalah $21,175 \pm 0,420$ %b/b. Sedangkan nilai rata-rata dari kelompok remaserasi adalah $21,242 \pm 0,177$ %b/b.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian yang telah dilakukan adalah tentang penetapan kadar kurkumin pada ekstrak rimpang kunyit dengan perbedaan metode ekstraksi maserasi dan remaserasi dengan waktu yang dipersingkat bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar kurkumin dengan membandingkan metode ekstraksi maserasi dan remaserasi. Remaserasi dipilih karena remaserasi adalah salah satu teknik alternatif yang digunakan untuk mengoptimalkan metode maserasi satu tahap. Metode ekstraksi dengan penambahan pelarut baru diketahui lebih efektif dikarenakan dapat menyebabkan solut berpindah pada solven secara terus menerus dan dapat mengurangi jumlah pengotor yang mungkin ikut terekstraksi (Rezki *et al.*, 2015; Šibul *et al.*, 2016). Diharapkan adanya perbedaan metode ekstraksi dapat menyebabkan kadar kurkumin berbeda apabila dibandingkan. Secara garis besar penelitian yang dilakukan meliputi tahap ekstraksi, pengondisian HPLC, *system suitability test*, validasi metode analisis, penetapan kadar, dan analisis statistik.

Proses ekstraksi kurkumin dilakukan dengan cara dingin yakni pada suhu ruang dengan perbandingan solid:pelarut 1:6 dan dengan etanol 96% dengan metode maserasi satu tahap dan remaserasi tiga tahap. Pemilihan pelarut ekstraksi didasarkan pada sifat dari senyawa target. Kurkumin diketahui merupakan senyawa yang hampir tidak larut dalam air dan sangat larut pada pelarut polar salah satunya adalah etanol. Etanol juga sering digunakan untuk ekstraksi karena dapat menghemat biaya, sebab kurkumin dapat benar-benar larut dalam etanol sehingga kebutuhan etanol untuk

ekstraksi sedikit. Penelitian sebelumnya, dilakukan oleh Ihsan *et al* (2018) yang menganalisis kadar kurkumin pada ekstrak etanol kunyit dengan berbagai perbandingan, menunjukkan bahwa kadar kurkumin yang tertinggi adalah pada ekstrak dengan etanol 96% dibandingkan dengan 80% dan 70% (FAO, 2004; Ihsan *et al*, 2018; Priyadarsini, 2014).

Proses yang terjadi selama proses ekstraksi adalah adanya difusi pelarut ke dalam pusat padatan, kemudian solut akan larut pada pelarut yang telah masuk ke dalam pusat padatan dan selanjutnya akan berdifusi ke permukaan partikel. Setelah mencapai permukaan partikel, solut akan berdifusi dari permukaan partikel menuju pelarut yang ada di sekeliling partikel (Setford *et al.*, 2017). Oleh karena itu, pemilihan pelarut menjadi hal penting saat melakukan ekstraksi karena adanya proses larutnya senyawa target ke dalam solven (*like dissolve like*) saat proses ekstraksi (Zhang *et al*, 2018). Selain itu, berdasarkan segi keamanan untuk ekstraksi yang ditujukan untuk obat tradisional, etanol atau etil alkohol termasuk aman secara umum menurut FDA. Pada proses ekstraksi juga dilakukan proses pengadukan yang bertujuan untuk meningkatkan kontak serbuk simplisia dengan pelarut, dan apabila kontak semakin banyak, maka akan semakin banyak senyawa target yang terlarut dalam pelarut (Salamah and Widyasari, 2015). Proses ekstraksi pada penelitian ini dilakukan pada wadah yang tertutup dan terhindar dari sinar matahari secara langsung. Hal ini dikarenakan proses degradasi kurkumin akan lebih cepat apabila terpapar sinar matahari (Priyadarsini, 2014)

Hasil yang didapatkan pada penelitian ini adalah ekstrak kental yang terlampir pada (Gambar 5.1) dan (Gambar 5.2). Didapatkan pula hasil % rendemen ekstrak dari MK1, MK2, MK3, RK1, RK2, dan RK3 berturut-turut adalah 6,6%; 7,3%; 7,4%; 5,8%; 7,7%; dan 7,9% sehingga rata-rata rendemen yang didapatkan pada proses ekstraksi maserasi adalah $7,10 \pm$

0,436 % dan pada proses ekstraksi remaserasi adalah $7,13 \pm 1,159$ %.

Diketahui nilai RSD pada proses maserasi adalah 6,139% dan pada proses remaserasi adalah 16,248%. Data dikatakan presisi apabila nilai RSD < 2% (Wichitnithad *et al.*, 2009). Rendemen merupakan perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000). Rendemen memberikan gambaran tentang jumlah penarikan senyawa target pada zat (Vifta *et al.*, 2017). Hal yang dapat mempengaruhi nilai rendemen secara umum adalah jenis pelarut, ukuran partikel, metode ekstraksi, lamanya proses ekstraksi, kontak area, suhu dan lama waktu kontak antara zat dengan pelarut (Salamah *et al.*, 2017; Setford *et al.*, 2017). Nilai rendemen pada masing-masing metode diketahui tidak memenuhi persyaratan presisi. Hal ini, bisa jadi disebabkan karena adanya filtrat yang tertinggal pada kain saring dan kertas saring yang jumlahnya tidak sama. Hal lain yang dapat menyebabkan tidak presisi adalah replikasi ekstraksi yang dilakukan kurang, karena semakin banyak replikasi semakin baik presisinya.

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Pauluci *et al.* (2013) yang melakukan ekstraksi pada kunyit dengan variasi parameter ekstraksi menunjukkan pada lama waktu ekstraksi 12 jam dan kecepatan pengadukan 30 rpm, perbandingan solid/pelarut 1/6, suhu 50°C, pelarut etanol 96% menunjukkan hasil rendemen zat terlarut adalah 5,0% dan apabila kecepatan ditingkatkan menjadi 70 rpm rendemen zat terlarutnya adalah 5,6% (Paulucci *et al.*, 2013). Pada penelitian yang dilakukan, ekstraksi metode maserasi dilakukan selama 12 jam, dengan kecepatan pengadukan 452 rpm selama 30 menit, perbandingan solid/pelarut 1/6, suhu ruang, pelarut etanol 96% mendapatkan hasil rata-rata rendemen 7,10%. Sedangkan metode remaserasi dengan parameter ekstraksi yang sama, hanya berbeda lama

waktu ekstraksi diubah menjadi 9 jam dan diganti pelarut setiap 3 jam mendapatkan hasil rata-rata rendemen 7,13%. Hal ini menunjukkan bahwa rendemen ekstrak kunyit dengan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi selama 12 jam dibandingkan remaserasi selama 9 jam hasilnya hampir sama dan menggunakan metode ekstraksi dingin tanpa pemanasan dan meningkatkan kecepatan pengadukan dapat meningkatkan nilai rendemen ekstrak dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Paulucci *et al* (2013).

Pengondisian HPLC perlu dilakukan agar proses analisis yang dilakukan dapat optimal dan efektif. Kromatografi yang digunakan adalah kromatografi fase terbalik dengan fase diam (silika) cenderung nonpolar. Optimasi yang diperlukan dalam hal ini adalah pemilihan fase gerak. Pada kromatografi fase terbalik, pelarut polar cenderung dipilih, namun juga harus memperhatikan kelarutan pada senyawa target karena senyawa yang cenderung nonpolar akan tertahan lebih lama pada fase diam karena memiliki afinitas yang lebih tinggi pada fase diam dan senyawa yang cenderung polar akan terelusi terlebih dahulu karena memiliki afinitas yang lebih rendah pada fase diam (Kumar *et al*, 2013). Selain itu, faktor pemilihan fase gerak adalah kemurnian (lebih baik dipilih pelarut dengan kemampuan analisis HPLC), viskositas (agar laju alir yang melalui kolom tetap terjaga, dipilih yang serendah mungkin), dan tidak merusak pada komponen sistem HPLC (Agrahari *et al*, 2013). Pelarut yang dipilih untuk digunakan sebagai fase gerak adalah asetonitril, air, dan asam asetat glasial.

Asetonitril merupakan pelarut yang sering digunakan sebagai fase gerak untuk HPLC dikarenakan asetonitril memiliki viskositas yang rendah, tidak mengganggu analisis, tidak merusak komponen HPLC dan murni. Selain itu, asetonitril merupakan salah satu pelarut yang bersifat polar dan dapat

melarutkan kurkumin agar dapat terelusi (Agrahari *et al*, 2013; Priyadarsini, 2014). Sedangkan asam asetat glasial digunakan sebagai pembuat suasana asam saat analisis. Diketahui pada kromatografi fase terbalik umumnya menggunakan pH antara 2-7,5. Hal ini dikarenakan pada pH asam dapat menekan proses interaksi ionisasi pada silanol pada permukaan kolom yang berbasis silika. pH pada fase gerak dapat digunakan sebagai kontrol retensi, selektivitas dan membantu meningkatkan pemisahan dan resolusi dari senyawa target. Asam asetat glasial dipilih dikarenakan merupakan salah satu pelarut yang umum digunakan untuk kromatografi dan tidak menimbulkan kerusakan pada komponen HPLC (Agrahari *et al*, 2013; Dolan, 2017). Selain itu, kurkumin diketahui dapat larut dalam asam asetat glasial dan lebih stabil pada pH rendah daripada pH tinggi (National Center for Biotechnology Information, 2021; Priyadarsini, 2014).

Setelah pemilihan pelarut untuk fase gerak, dilakukan optimasi metode untuk komposisi fase gerak yang akan digunakan. Tujuan dari optimasi metode adalah untuk mengetahui komposisi fase gerak yang dapat memisahkan senyawa target dengan baik dari pengotor atau senyawa lainnya. Pemisahan yang baik diketahui dari nilai resolusi. Resolusi (R_s) yang baik berdasarkan *guideline* AOAC adalah $R_s > 1,5$ (AOAC International, 2012). Optimasi fase gerak yang pertama dilakukan dengan metode pencampuran semua fase gerak pada satu botol yang merupakan modifikasi dari artikel yang ditulis oleh Hastati *et al* tahun (2015) dengan judul *Determination Of The Curcumin Pigment In Extract Curcuma domestica Val From South Sulawesi, Indonesia, By High Performance Liquid Chromatography*. Perbandingan fase gerak yang digunakan adalah asetonitril:asam asetat glasial:air 50:1:49 dengan pH pada optimasi pertama adalah 2,965. Didapatkan nilai resolusi pada standar dan sampel berturut-turut 12,371 dan 1,576. Sedangkan pada

optimasi kedua dilakukan dengan perbandingan fase gerak sama dan pH diubah menjadi 3,050 didapatkan nilai resolusi pada standar dan sampel berturut-turut 12,64 dan 1,569. Hasil resolusi pada optimasi pertama dan optimasi kedua pada sampel diketahui memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan. Namun, dikarenakan nilai resolusi yang terlalu dekat dengan persyaratan ($> 1,5$) ditakutkan apabila dilakukan *running* HPLC pada hari yang berbeda serta dikarenakan fase gerak yang harus dibuat baru setiap harinya dapat menyebabkan nilai resolusi berubah menjadi lebih kecil dan tidak memenuhi persyaratan. Oleh karena itu, dilakukan optimasi ketiga dengan perubahan komposisi fase gerak yang merupakan modifikasi dari artikel yang ditulis oleh Kurniawan tahun (2012) dengan judul artikel *Determination Of Curcumin In Capsule Containing Curcuma xanthorrhiza Roxb. Extracts By High Performance Liquid Chromatography*. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril (fase gerak A) dan asam asetat glasial 1% dalam air (fase gerak B) yang telah disaring dengan filter nylon 0,45 μm dengan perbandingan asetonitril:asam asetat glasial 1% dalam air (pH 2,660) 45:55. Kedua fase gerak ini dimasukkan ke dalam botol yang berbeda sehingga perbandingan fase gerak dijalankan oleh instrumen HPLC. Hasil menunjukkan resolusi standar dan sampel berturut-turut 26,237 dan 1,733. Nilai resolusi pada optimasi ketiga menunjukkan nilai yang lebih baik daripada optimasi pertama dan optimasi kedua, sehingga fase gerak ini dipilih untuk penetapan kadar kurkumin.

Selain fase gerak, laju alir juga merupakan salah satu faktor yang cukup penting dalam menentukan metode analisis dengan HPLC. Laju alir menunjukkan efisiensi dari pemisahan kolom. Apabila laju alir terlalu rendah analit akan tertahan lama di dalam kolom dan apabila laju alir terlalu tinggi akan mengurangi efisiensi kolom karena akan menyebabkan adsorpsi analit

pada fase diam menyebabkan beberapa sampel tertinggal dan akan mengakibatkan pelebaran pita pada hasil (Chemistry LibreTexts, 2020). Pada penelitian yang dilakukan, laju alir yang digunakan adalah 1 mL/menit dan menunjukkan hasil pemisahan yang baik. Selain laju alir, faktor lain pada HPLC yang penting adalah suhu kolom. Suhu kolom diketahui cukup mempengaruhi waktu retensi dikarenakan semakin meningkatnya suhu maka akan meningkatkan proses pelarutan senyawa sehingga dapat mempercepat proses elusi dan menurunkan nilai waktu retensi dan menjaga presisi dari waktu retensi saat analisis (Dong, 2005). Pada penelitian ini, suhu yang digunakan adalah 30°C dan menunjukkan hasil pemisahan yang baik. Sebelum melakukan analisis selanjutnya, perlu dilakukan *purging* yang bertujuan untuk membersihkan injektor dengan fase gerak dan dilakukan *baseline check* untuk melihat kestabilan detektor yang digunakan.

System suitability test (SST) merupakan uji yang dilakukan untuk melihat apakah HPLC yang digunakan dapat melakukan analisis secara akurat dan presisi dengan parameter-parameter tertentu yang telah dipersyaratkan. SST dilakukan dengan cara melakukan replikasi injeksi larutan standar pada kondisi HPLC yang telah ditentukan dengan jumlah replikasi yang disarankan ≥ 5 . Parameter pertama yang dianalisis adalah *capacity factor* (k) yang ditujukan untuk mengetahui kemampuan kolom dalam mempertahankan sampel pada fase diam terhadap fase gerak dan nilai k yang direkomendasikan adalah > 2 . Parameter kedua yang dianalisis adalah presisi yang dinyatakan dalam RSD untuk mengetahui kemampuan analisis HPLC pada saat sampel dianalisis termasuk di dalamnya adalah kondisi kolom dan kondisi lingkungan sistem HPLC dan nilai RSD yang direkomendasikan adalah $\leq 1\%$. Parameter ketiga yang dianalisis adalah resolusi (R_s),

merupakan parameter untuk menghitung baik atau tidaknya dua puncak terpisah saat proses pemisahan dalam kolom termasuk untuk mengetahui pemisahan dari pengotor yang mungkin mengganggu dan nilai R_s yang direkomendasikan adalah > 2 antara puncak yang diinginkan dengan puncak yang mungkin mengganggu. Parameter keempat yakni *tailing factor* (T) merupakan parameter untuk mengetahui simetris atau tidaknya puncak yang ditargetkan dan nilai T yang direkomendasikan adalah ≤ 2 . Apabila nilai T tinggi dapat menurunkan keakuratan dari hasil data dikarenakan tidak dapat dijelaskan kapan puncak akan berhenti. Parameter kelima yang dianalisis yakni *theoretical plate number* (N) merupakan parameter untuk mengukur efisiensi kolom dengan mengetahui berapa banyak puncak yang dapat terdeteksi setiap waktu *running* dari kromatogram dan umumnya nilai $N > 2000$ (CDER, 1994). Pada penelitian yang dilakukan, SST dilakukan replikasi injeksi sebanyak 6x pada konsentrasi standar 36 ppm yang hasilnya terlampir pada (Tabel 5.4) dan (Tabel 5.5). Setelah dianalisis dengan literatur yang didapatkan, parameter uji SST yang dilakukan telah memenuhi syarat yang ditentukan sehingga analisis selanjutnya dapat dilakukan.

Validasi metode merupakan suatu proses yang dilakukan dengan parameter-parameter tertentu untuk mengonfrimasi bahwa metode yang digunakan layak digunakan untuk analisis selanjutnya (AOAC International, 2012). Pada penelitian ini, validasi metode bertujuan untuk mengonfirmasikan bahwa metode HPLC yang dijalankan layak digunakan untuk analisis penetapan kadar kurkumin pada ekstrak rimpang kunyit. Parameter validasi metode analisis yang dilakukan adalah selektivitas, linearitas, LOD, LOQ, akurasi dan presisi.

Selektivitas merupakan parameter validasi metode untuk menganalisis sejauh mana metode analisis yang digunakan dapat memisahkan senyawa

target dari pengotor yang mungkin terukur saat dilakukan pengukuran serta memastikan bahwa senyawa target dapat terukur dengan membandingkan sampel yang diuji dengan standar. Data untuk memastikan bahwa senyawa target telah terpisah dari senyawa lain yang terdapat pada sampel adalah resolusi. Resolusi yang baik berdasarkan *guideline* AOAC adalah $R_s > 1,5$ (AOAC International, 2012). Pada dokumen lain seperti pada *United States of Pharmacopoeia* selektivitas juga dinyatakan dengan spesifisitas, yaitu menilai ada atau tidaknya analit target pada sampel yang mungkin mengandung pengotor atau komponen matriks dengan data yang disajikan berupa kromatogram dengan puncak analit yang diberi label (United States Pharmacopoeia, 2006). Data hasil selektivitas terlampir pada (Tabel 5.6) yang menunjukkan nilai resolusi rata-rata hasil replikasi MK1, MK2, MK3, RK1, RK2, dan RK3 berturut-turut 1,8493; 1,860; 1,858; 1,843; 1,8493; 1,8477 yang artinya bahwa nilai resolusi memenuhi syarat yang ditentukan oleh AOAC *International*. Hal ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan dapat secara selektif memisahkan analit dari komponen lain yang ada pada sampel. Serapan maksimum kurkumin diketahui pada literatur adalah pada cahaya tampak 410-430 nm, pada cahaya UV 265 nm (Priyadarsini, 2014). Diketahui pula pada (Tabel 5.6) dan (Tabel 5.7), panjang gelombang maksimum pada standar kurkumin dan analit pada sampel adalah sama yaitu 427 nm pada waktu retensi rata-rata hasil replikasi MK1, MK2, MK3, RK1, RK2, dan RK3 berturut-turut 12,475; 12,442; 12,442; 12,516; 12,453; 12,548 menit dan pada standar rata-rata waktu retensi adalah 12,526 dan 12,514 menit. Selain itu, diketahui dari *overlay* spektrum antara standar dan sampel yang terlampir pada (Gambar 5.4) diketahui memiliki spektrum yang mirip. Hal ini dapat diartikan bahwa metode yang digunakan dapat secara spesifik mengidentifikasi kurkumin pada sampel ekstrak kunyit. Pengamatan secara

visual dengan membandingkan waktu retensi kromatogram yang telampir pada (Gambar 5.3) menunjukkan nilai yang mirip. Sehingga uji parameter selektivitas memenuhi syarat yang ditentukan.

Linearitas merupakan salah satu parameter validasi metode yang bertujuan untuk mengetahui respon dari instrumen yang digunakan dengan metode analisis yang telah ditentukan berbanding lurus dengan konsentrasi analit dalam rentang beberapa konsentrasi. Persyaratan untuk koefisien korelasi berdasarkan AOAC adalah $r > 0,99$ (AOAC International, 2012). Pada penelitian ini, linearitas diperoleh dengan cara menginjeksikan 5 larutan standar kurkumin dengan konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi larutan standar kurkumin yang digunakan untuk uji linearitas yaitu 12 ppm, 24 ppm, 36 ppm, 48 ppm, dan 54 ppm dan didapatkan persamaan regresi $y = 157248,21x - 138875,27$ dengan nilai koefisien korelasi $r = 0,9999$. Hal ini dapat disimpulkan bahwa uji linearitas memenuhi syarat yang telah ditentukan oleh AOAC, artinya respon instrumen yang digunakan berbanding lurus dengan konsentrasi analit.

LOD merupakan jumlah analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi oleh instrumen namun belum dapat dikuantifikasi secara tepat dan LOQ merupakan jumlah analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif pada saat instrumen yang digunakan dapat mendeteksi analit dengan akurasi dan presisi yang baik (Hansen, *et al.*, 2012). Nilai LOD didapatkan berdasarkan perhitungan dari persamaan linearitas $y = 157248,21x - 138875,27$ dengan $r = 0,9999$. Berdasarkan rumus yang telah ditentukan, nilai LOD dan LOQ yang didapatkan berturut-turut adalah 0,875 ppm dan 2,653 ppm.

Akurasi merupakan kedekatan nilai hasil dengan nilai sebenarnya, yang dinyatakan dengan persen *recovery* atau persen perolehan kembali.

Presisi merupakan kedekatan nilai hasil analisis ketika kondisi telah diatur dan data yang didapatkan adalah persen RSD. Akurasi dilakukan dengan cara menginjeksikan larutan dengan konsentrasi berbeda yaitu 24 ppm sebagai konsentrasi 80%, 30 ppm sebagai konsentrasi 100%, dan 36 ppm sebagai konsentrasi 120%. Ketiga konsentrasi ini masing-masing direplikasi sebanyak 3x sehingga didapatkan sembilan data yang akan diolah untuk akurasi presisi sesuai ketentuan pada AOAC (*Appendix F*) tahun 2016. Hasil respon instrumen yang didapatkan kemudian dimasukkan ke dalam persamaan kurva regresi $y = 157248,21x - 138875,27$ dengan nilai $r = 0,9999$. Hasil persen *recovery* yang didapatkan terlampir pada (Tabel 5.8). Diketahui rata-rata persen *recovery* untuk konsentrasi 24, 30, 36 ppm berturut-turut adalah 98,72%, 99,57% dan 99,32%, sehingga rentang persen perolehan kembali yang didapatkan adalah 98,72%-99,57%. Hasil yang didapatkan kemudian dibandingkan dengan persyaratan dari AOAC tahun 2016 (Tabel 2.1). Syarat persen *recovery* pada rentang konsentrasi 24-36 ppm berdasarkan tabel AOAC adalah 98-102%. Maka dapat disimpulkan bahwa hasil uji akurasi memenuhi persyaratan dan dapat dikatakan metode yang digunakan akurat. Berdasarkan lampiran (Tabel 5.8) nilai persen RSD untuk konsentrasi 24, 30, dan 36 ppm berturut-turut adalah 0,54%, 1,07%, dan 1,15%. Hasil nilai presisi yang didapatkan kemudian dibandingkan dengan persyaratan dari AOAC tahun 2016 (Tabel 2.2). Syarat persen RSD pada rentang konsentrasi 24-36 ppm berdasarkan tabel AOAC adalah $< 1,3\%$. Maka dapat disimpulkan bahwa hasil uji presisi memenuhi persyaratan dan dapat dikatakan metode yang digunakan presisi.

Setelah validasi metode dilakukan, langkah selanjutnya adalah melakukan penetapan kadar kurkumin pada ekstrak kunyit. Penetapan kadar

dilakukan menggunakan instrumen HPLC karena diketahui dapat secara efektif memisahkan senyawa pada sampel dan cocok digunakan untuk memisahkan senyawa baik organik maupun anorganik (Abubakar and Haque, 2020). Pelarut yang digunakan untuk preparasi standar dan sampel adalah metanol. Metanol dipilih sebagai pelarut karena curcumin sangat larut dalam metanol (FAO, 2004; Priyadarsini, 2014). Hasil kadar %b/b kurkumin rata-rata dari kelompok maserasi adalah $21,175 \pm 0,420$ %. Sedangkan kadar %b/b kurkumin rata-rata dari kelompok remaserasi adalah $21,242 \pm 0,177$ %.

Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (FHI) tahun 2017 edisi 2, ekstrak kental rimpang kunyit adalah ekstrak yang terbuat dari rimpang *Curcuma longa* dan mengandung minyak atsiri $\geq 3,10\%$ v/b dan atau kurkumin $\geq 11,17\%$ (Kemenkes RI, 2017). Berdasarkan FHI, maka penetapan kadar dengan metode ekstraksi pada penelitian ini memenuhi persyaratan. Penelitian sebelumnya tentang penetapan kadar kurkumin pada ekstrak etanol 95% kunyit yang diukur dengan HPLC adalah pada rentang 14-25% (Green *et al.*, 2008). Pada literatur lain menyebutkan bahwa kadar kurkumin pada ekstrak etanol rimpang kunyit yang diukur dengan HPLC adalah 8,55-15,88% (Pothitirat *et al.*, 2007). Literatur lain juga menyebutkan kadar kurkumin pada ekstrak metanol yang diekstrak dengan sonikator kadar kurkumin yang diukur dengan *Preparative Liquid Chromatography* (PLC) adalah pada rentang 79.14 ± 0.10 hingga 165.34 ± 0.08 mg/g (kurang lebih 7,9-16,5 % b/b) (Poudel *et al.*, 2019) Perbedaan kandungan kurkumin ini disebabkan oleh proses ekstraksi yang berbeda, seperti metode ekstraksi, ukuran dan tingkat kekeringan bahan, pelarut yang digunakan, tempat tumbuh tanaman dan lain-lain (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

Perbandingan kadar kurkumin antara ekstrak yang didapatkan dengan proses maserasi dan remaserasi kemudian diuji statistik. Terdapat dua kelompok perlakuan yakni ekstraksi dengan metode maserasi dan metode remaserasi, maka uji yang digunakan adalah uji-t tidak berpasangan dengan alternatif uji nonparametrik Mann-Whitney. Hasil nilai signifikansi dari uji normalitas adalah 0,378 dan 0,431 ($> 0,05$) yang menunjukkan data terdistribusi normal. Sedangkan nilai signifikansi dari uji homogenitas adalah 0,044 ($< 0,05$) yang menunjukkan data tidak homogen. Persyaratan untuk melakukan uji-t tidak berpasangan adalah data harus terdistribusi normal dan homogen. Pada penelitian ini, data terdistribusi normal, namun tidak homogen maka menggunakan alternatif uji Mann-Whitney. Hasil nilai signifikansi dari uji Mann-Whitney adalah $> 1,000$ ($> 0,05$) yang berarti kadar kurkumin hasil maserasi dan remaserasi tidak berbeda signifikan. Hipotesis yang dinyatakan dalam penelitian ini adalah terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar kurkumin hasil ekstraksi metode maserasi dan remaserasi. Berdasarkan hasil uji statistik, maka hipotesis penelitian ditolak. Hal yang menyebabkan tidak berbeda signifikan bisa jadi dikarenakan parameter ekstraksi yang dilakukan sama, seperti seperti pelarut yang digunakan, suhu, kecepatan pengadukan sama, dan lama waktu ekstraksi yang hanya selisih 3 jam sehingga jumlah kurkumin yang terkestraksi memiliki kadar yang hampir sama. Pada studi sebelumnya, yang melakukan penelitian tentang ekstraksi kurkumin secara multi-tahap pada rimpang kunyit, diketahui kadar kurkumin pada ekstraksi rimpang kunyit tiga tahap dan ekstraksi dua tahap dengan parameter ekstraksi yang sama tidak menunjukkan beda yang terlalu besar (Rezki *et al.*, 2015).

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian

Penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan dasar untuk penelitian uji aktivitas kurkumin. Penelitian ini dapat juga digunakan sebagai dasar produsen obat herbal yang menggunakan bahan dasar kunyit (*Curcuma domestica*) untuk mengefisienkan waktu ekstraksi dengan kandungan kurkumin yang tetap baik. Selain itu, penelitian ini juga dapat dimanfaatkan sebagai dasar untuk penetapan kadar kurkumin pada ekstrak kunyit dengan instrumen HPLC dan parameter-parameter seperti fase gerak, laju alir, suhu kolom, dan lain-lain yang telah tervalidasi.

6.3 Keterbatasan Penelitian

1. Penelitian ini hanya menggunakan variabel bebas perbedaan metode ekstraksi saja (maserasi dan remaserasi), tidak mengaitkan dengan parameter ekstraksi lain seperti jenis pelarut, konsentrasi pelarut, perbandingan solid/pelarut, kecepatan dan lama pengadukan, suhu pengeringan ekstrak dan atau penambahan metode ekstraksi lainnya seperti perkolasi, soxhletasi, dan lain-lain.
2. Penelitian ini tidak mengukur kadar senyawa kurkuminoid lainnya seperti demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin yang juga merupakan senyawa yang cukup penting untuk aktivitas farmakologi pada obat herbal ekstrak kunyit.

BAB 7**PENUTUP****7.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa kadar kurkumin pada ekstrak kunyit dengan metode maserasi selama 12 jam adalah $21,175 \pm 0,420$ %b/b. Sedangkan bahwa kadar kurkumin pada ekstrak kunyit dengan metode remaserasi setiap 3 jam dengan total waktu 9 jam adalah $21,242 \pm 0,177$ %b/b. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara metode ekstraksi maserasi 12 jam dibandingkan dengan metode remaserasi dengan total waktu 9 jam dengan pergantian pelarut sebanyak 3 kali.

7.2 Saran

1. Dapat dilakukan penelitian dengan model yang sama, yaitu membandingkan metode maserasi dan remaserasi, namun dengan lama waktu ekstraksi yang berbeda.
2. Dapat dilakukan penelitian dengan model yang sama, yaitu membandingkan metode maserasi dan remaserasi dengan tanaman yang sama dengan tambahan senyawa lain seperti demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin.
3. Dapat dilakukan penelitian dengan penambahan variabel bebas lainnya seperti perbedaan parameter ekstraksi (perbedaan jenis pelarut, konsentrasi pelarut, perbandingan solid/likuid, kecepatan pengadukan, suhu pengeringan, wilayah panen, kondisi geografis dan lain-lain).
4. Melakukan konsep penelitian yang sama dengan perbedaan tanaman lain yang mengandung kurkumin.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, A. R. and Haque, M. 2020. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 12(1). doi: 10.4103/jpbs.JPBS_175_19.
- Agrahari, V., Bajpai, M. and Nanda, S. 2013. Essential Concepts of Mobile Phase Selection for Reversed Phase HPLC. *Research J. Pharm. and Tech.*, 6(5), pp. 459–464.
- AOAC International. 2012. Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals. *AOAC Official Methods of Analysis*.
- AOAC International. 2016. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *AOAC Official Methods of Analysis*.
- Ashraf, K. and Sultan, S. 2017. A comprehensive review on *Curcuma longa* Linn.: Phytochemical, pharmacological, and molecular study. *International Journal of Green Pharmacy*, 11(4), pp. S671–S685.
- Azmir, J. *et al.* 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), pp. 426–436. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- Azwainda. 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03), pp. 3–8. doi: 10.4172/2167-0412.1000196.
- CDER. 1994. *Validation of chromatographic methods, Analytical Instrumentation Handbook, Third Edition*. CMC 3. doi: 10.1201/9780849390395.ch31.
- Chemistry LibreTexts. 2020. *High Performance Liquid Chromatography*. Available at: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography) (Accessed: 26 April 2021).
- Christian, G. D., Dasgupta, P. K. and Schug, K. A. 2014. *Analytical Chemistry*. 7th edn. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Dhole, S. M., Khedekar, P. B. and Amnerkar, N. D. 2012. Comparison of UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods for the determination of repaglinide in tablets. *Pharmaceutical Methods*, 3(2), pp. 68–72. doi: 10.4103/2229-4708.103875.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan.
- Dolan, J. W. 2017. *Back to Basics: The Role of pH in Retention and Selectivity, LCGC North America* 35(1). Available at: <https://www.chromatographyonline.com/view/back-basics-role-ph-retention-and-selectivity> (Accessed: 25 April 2021).
- Dong, M. W. 2005. How to be more successful with HPLC analysis: Practical aspects in HPLC operation in *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Elsevier Inc., pp. 255–271. doi: 10.1016/S0149-6395(05)80053-4.

FAO. 2004. Curcumin. *Chemical and Technical Assessment*, 1(8), pp. 1–8.

Green, C. E. et al. 2008. Extraction, Processing, and Storage Effects on Curcuminoids and Oleoresin Yields from *Curcuma longa* L. Grown in Jamaica. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), pp. 3664–3670. doi: 10.1021/jf073105v.

Hansen, S., Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K. 2012. *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*. 2nd edn. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd. doi: 10.1002/9781119953647.

HEXAResearch. 2017. *Global Herbal Medicine Market Size, Value, 2014-2024 | Industry Report*. Available at: <https://www.hexaresearch.com/research-report/global-herbal-medicine-market> (Accessed: 17 April 2021).

Hui, E. G. M. 2019. *Learn R for applied statistics: With data visualizations, regressions, and statistics*. New York: Apress. doi: 10.1007/978-1-4842-4200-1.

Ihsan, B. R. P., Nurhayati, I. P. and Maysaroh, I. 2018. Validasi Metode Ultra High Performance Chromatography Double Mass Spectrometry (UHPLC-MS / MS) untuk Analisis Kurkumin pada Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma longa*) dengan Berbagai Perbandingan Method Validation of Ultra High Performance Chromatography-D. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, 4(1), pp. 29–34.

International Conference on Harmonisation. 1995. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology 2(November 1994), pp. 1070–1072. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00861-7.

ITIS *Standard Report Page: Curcuma longa*. no date. Available at: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=42394#null (Accessed: 15 August 2020).

Jansirani, D. et al. 2014. Comparative evaluation of various extraction methods of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, (4), pp. 286–288.

Javeri, I. and Chand, N. 2016. *Curcumin, Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-802147-7.00031-0.

Kadam, P. V et al. 2018. Standardization and quantification of curcumin from *Curcuma longa* extract using UV visible spectroscopy and HPLC. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), pp. 1913–1918.

Kemendes RI. 2017. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi 2*. 2nd edn. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.

Kementerian Kesehatan RI. 2011. *Formularium obat herbal asli Indonesia volume 1*. Jakarta: Perpustakaan Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Kotra, V. S. R., Satyabanta, L. and Goswami, T. K. 2019. A critical review of analytical methods for determination of curcuminoids in turmeric. *Journal of Food Science and Technology*, 56(12), pp. 5153–5166. doi: 10.1007/s13197-019-03986-1.

Kriswiyanti, E. and Fadilah. 2007. Pengaruh Kecepatan Putar Pengadukan dan Suhu Operasi pada Ekstraksi Tanin dari Jambu Mete dengan Pelarut Aseton', *Ekuilibrum*, 6(1), pp. 33–38.

Kumar, A., Sunil, J. and Yadav, G. 2013. Recent Analytical Method Developed by RP-HPLC. *Global Journal of Pharmacology*, 7(3), pp. 232–240. doi: 10.5829/idosi.gjp.2013.7.3.7579.

Meng, F.-C. *et al.* 2018. Turmeric: A Review of Its Chemical Composition, Quality Control, Bioactivity, and Pharmaceutical Application in *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*. Elsevier Inc., pp. 299–350. doi: 10.1016/b978-0-12-811518-3.00010-7.

Moussa, Z., Chebl, M. and Patra, D. 2017. Fluorescence of tautomeric forms of curcumin in different pH and biosurfactant rhamnolipids systems: Application towards on-off ratiometric fluorescence temperature sensing. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 173(January), pp. 307–317. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.06.011.

Murti, Y. B. *et al.* 2019. UV-Vis Spectroscopy to Enable Determination of the Dissolution Behavior of Solid Dispersions Containing Curcumin and Piperine. *Journal of Young Pharmacists*, 11(1), pp. 26–30. doi: 10.5530/jyp.2019.11.6.

National Center for Biotechnology Information. 2021. *PubChem Compound Summary for CID 969516, Curcumin*. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>. (Accessed: 27 April 2021).

Ningsih, A. W., Nurrosyidah, I. H. and Hisbiyah, A. 2018. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) Terhadap Rendemen dan Skrining Fitokimia. *Journal of Pharmaceutical-care Anwar Medika*, 2(2), pp. 49–57. doi: 10.36932/jpcam.v2i2.27.

Pandey, A. and Tripathi, S. 2014. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 115(25), pp. 115–119.

Paulucci, V. P. *et al.* 2013. Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(1), pp. 94–100. doi: 10.1590/S0102-695X2012005000117.

Pothitirat, W., Gritsanapan, W. and Brantner, A. H. 2007. Variation of curcuminoids and free radical scavenging activity of rhizome extracts of *Curcuma longa* in Thailand. *Planta Med. (Abstract)*, 73(9), p. 223. doi: 10.1055/s-2007-987004.

Poudel, A., Pandey, J. and Lee, H. K. 2019. Geographical discrimination in curcuminoids content of turmeric assessed by rapid UPLC-DAD validated analytical method. *Molecules*, 24(9). doi: 10.3390/molecules24091805.

Prasetya, I. W. G. A., Putra, G. . G. and Wrasati, L. P. 2020. Pengaruh Jenis Pelarut dan Waktu Maserasi terhadap Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai Sumber Antioksidan. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 8(1), pp. 150–159. doi: 10.24843/jrma.2020.v08.i02.p02.

Priyadarsini, K. I. 2014. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12), pp. 20091–20112. doi: 10.3390/molecules191220091.

Pulido-Moran, M. *et al.* 2016. Curcumin and health. *Molecules*, 21(3), pp. 1–22. doi: 10.3390/molecules21030264.

Reyes-Gordillo, K. *et al.* 2017. Hepatoprotective Properties of Curcumin in *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. Elsevier, pp. 687–704. doi: 10.1016/B978-0-12-804274-8.00049-7.

Rezki, R. S., Anggoro, D. and Siswarni. 2015. EKSTRAKSI MULTI TAHAP KURKUMIN DARI KUNYIT (*Curcuma domestica* Valet) MENGGUNAKAN PELARUT ETANOL. *Jurnal Teknik Kimia USU*, 4(3), pp. 29–34.

Rifai, G., Widarta, I. W. R. and Nocianitri, K. A. 2018. Pengaruh Jenis Pelarut Dan Rasio Bahan Dengan Pelarut Terhadap Kandungan Senyawa Fenolik Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea Americana* Mill.). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 7(2), pp. 22–32.

Salamah, N., Rozak, M. and Al Abror, M. 2017. Pengaruh metode penyarian terhadap kadar alkaloid total daun jembirit (*Tabernaemontana sphaerocarpa* BL) dengan metode spektrofotometri visibel. *Pharmaciana*, 7(1), p. 113-122.

Salamah, N. and Widyasari, E. 2015. AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL DAUN KELENGKENG (*Euphoria longan* (L) Steud.) DENGAN METODE PENANGKAPAN RADIKAL 2,2'-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL. *Pharmaciana*, 5(1), pp. 25–34.

Setford, P. C. *et al.* 2017. Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of process modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 69, pp. 106–117. doi: 10.1016/j.tifs.2017.09.005.

Šibul, F. S. *et al.* 2016. Optimization of extraction conditions for secondary biomolecules from various plant. *Hemijaska Industrija*, 70(4), pp. 473–483. doi: 10.2298/HEMIND150531053S.

Sulaiman, I. S. C. *et al.* 2017. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemistry Central Journal*, 11(1). doi: 10.1186/s13065-017-0285-1.

United States Pharmacopeia. 2006. *The National Formulary: NF-25*. Washington DC: United States Pharmacopeial Convention.

Vifta, R. L., Wansyah, M. A. and Hati, A. K. 2017. Perbandingan Total Rendemen dan Skrining Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) secara Mikrodilusi. *Journal of Science and Application Technology*, 2(1), pp. 87–93. doi: 10.35472/281450.

Wahyuni, D. S. C., Artanti, A. N. and Rinanto, Y. 2018. Quantitative analysis of Curcuminoid collected from different location in Indonesia by TLC-Densitometry and its antioxidant capacity. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 349(1). doi: 10.1088/1757-899X/349/1/012015.

WHO. 2019. *WHO Traditional Medicine*. Available at: <https://www.who.int/intellectualproperty/topics/traditional/en/> (Accessed: 17 April 2021).

Wichitnithad, W. *et al.* 2009. A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochemical Analysis*, 20(4), pp. 314–319. doi: 10.1002/pca.1129.

Winarto, W. P. 2004. *Khasiat & Manfaat Kunyit*. Jakarta: AgroMedia Pustaka.

Available at: <https://books.google.co.id/books?id=IQUZ5Hc1xogC&printsec=frontcover> (Accessed: 24 August 2020).

Zhang, Q. W., Lin, L. G. and Ye, W. C. (2018) 'Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review', *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 13(1), pp. 1–26. doi: 10.1186/s13020-018-0177-x.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Simplisia Rimpang Kunyit



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR

DINAS KESEHATAN

UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU

Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396, e-mail: materiamedicabatu@jatimprov.go.id

KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 114/ 102.7-A/ 2021
 Sifat : Biasa
 Perihal : **Determinasi Tanaman Kunyit**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : SOFIA SALSABILA
 NIM : 175070501111013
 Fakultas : KEDOKTERAN, UNIVERSITAS BRAWIJAYA

1. Perihal determinasi tanaman kunyit

Kingdom : Plantae
 Divisi : Spermatophyta
 Sub divisi : Angiospermae
 Kelas : Monocotyledonae
 Bangsa : Zingiberales
 Suku : Zingiberaceae
 Marga : Curcuma
 Jenis : *Curcuma longa* L.
 Sinonim : *C. domestica* Val. = *C. domestica* Rumph. = *C. longa* Auct
 Nama Umum : Kuning (Gayo), kunyit (Alas), hunik (Batak), under (Nias), kunyit (Lampung), kunyit (Melayu), kunyir (Sunda), kunir (Jawa Tengah), temo koneng (Madura), kunit (Banjar), dio (Panihing), kunyit (Sasak), huni (Bima), koneh (Flores), kumeh (Alor), kunik (Roti), hunik kunir (Timor), uinida (Talaud), alawaha (Gorontalo), kuni (Toraja), kunyi (Makassar), unyi (Bugis), kunin (Seram Timur), unin(Ambon).

Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15a-109a-110b-111b-112a-113b-116a-119b-120b-128b-129a-130b-132a.

2. Morfologi : Habitus semak, tinggi ±70 cm. Batang semu, tegak, bulat, membentuk rimpang, hijau kekuningan. Daun tunggal, lanset memanjang, helai daun tiga sampai delapan, ujung dan pangkal runcing, tepi rata, panjang 20-40 cm, lebar 8-12.5 cm, pertulangan menyirip, hijau pucat. Bunga majemuk, berambut, bersisik, tangkai panjang 16-40 cm, mahkota panjang ±3 cm, lebar ±1.5 cm, kuning, kelopak silindris, bercangap tiga, tipis, ungu, pangkal daun pelindung putih, ungu. Akar serabut, coklat muda.

3. Bagian yang digunakan : Rimpang.

4. Penggunaan : Penelitian tugas akhir.

5. Daftar Pustaka

- Anonim. 2006. *Serial Tanaman Obat "Kunyit"*. BPOM, Jakarta.
- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 04 Februari 2021

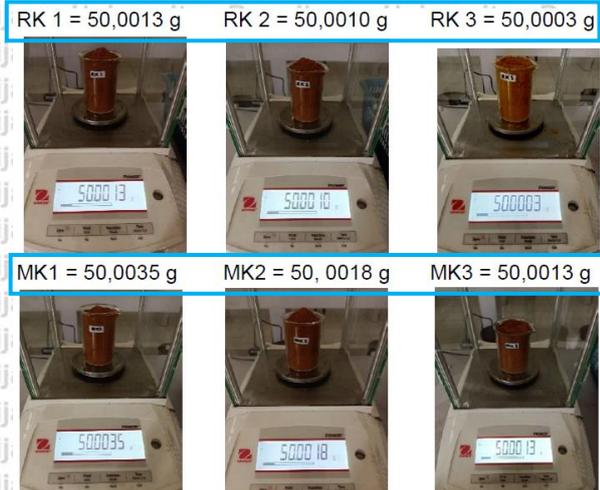
KEPALA UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU

ACHMAD MABRUR, SKM, M.Kes.
 DINAS KESEHATAN
 NIP. 19680203 199203 1 004

Gambar 1. Surat Determinasi Tanaman Kunyit



Gambar 2. Simplicia rimpang kunyit



Gambar 3. Hasil penimbangan simplicia

Lampiran 2. Penimbangan Ekstrak Kunyit

Sampel	Tanggal 15 Maret 2021			Tanggal 15 Maret 2021			%	Tanggal 15 Maret 2021			Rendemen (%)	
	Jam	Cw+Eks (g)	Ekstrak (g)	Jam	CW+eks (g)	Ekstrak (g)		Jam	CW+eks (g)	Ekstrak (g)		
RK 1	9.43	53,2014	2,9265	10.54	53,1881	2,9132	0,45	12.46	53,1860	2,9111	0,07	5,8
RK 2	9.39	35,2614	3,848	10.57	35,2518	3,8384	0,25	12.41	35,2483	3,8349	0,09	7,7
RK 3	9.40	56,8114	3,9886	10.53	56,7986	3,9758	0,32	12.39	56,7948	3,972	0,10	7,9
MK 1	9.41	44,5769	3,3267	10.57	44,5651	3,3149	0,35	12.38	44,5575	3,3073	0,23	6,6
MK 2	9.42	44,7405	3,6684	10.54	44,7288	3,6567	0,32	12.39	44,7246	3,6525	0,11	7,3
MK 3	9.38	65,0383	3,6931	10.59	65,0284	3,6832	0,27	12.42	65,0247	3,6795	0,10	7,4

Gambar 4. Hasil penimbangan bobot tetap

Perhitungan SD

Sampel	RK1	RK2	RK3	MK1	MK2	MK3	Rata-rata Rendemen RK	Rata-rata Rendemen MK
Rendemen (%)	5,8	7,7	7,9	6,6	7,3	7,4		
SD	1,159			0,436			7,13%	7,10%
%RSD (%)	16,248			6,139				

Contoh perhitungan rendemen

Rumus:

$$\%Rendemen = \frac{\text{Bobot tetap ekstrak yang didapatkan (g)}}{\text{Bobot awal simplisia (g)}} \times 100\%$$

$$\%Rendemen = \frac{2,9111 \text{ g}}{50,0013 \text{ g}} \times 100\% = 5,8\%$$

Contoh perhitungan % susut

$$\%Susut = \frac{\text{Bobot awal} - \text{Bobot akhir}}{\text{Bobot awal}} \times 100\%$$

$$\%Susut = \frac{2,9132 - 2,9111}{2,9132} \times 100\% = 0,07\%$$

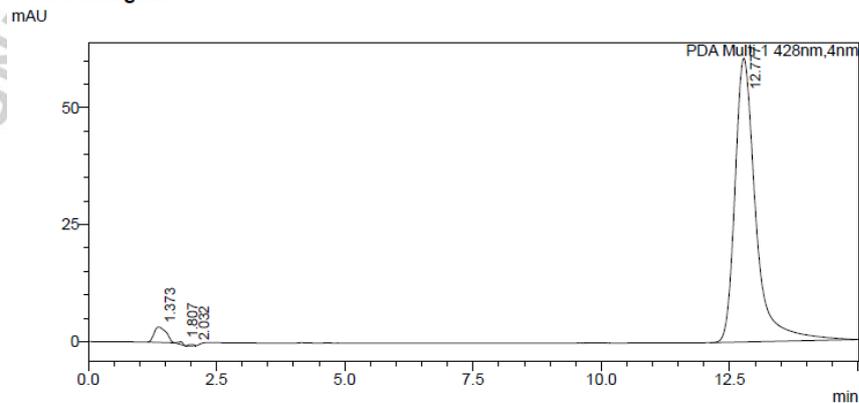
Lampiran 3. Hasil Kromatogram dan Perhitungan

(Hasil Uji Linearitas)

<Sample Information>

Sample Name : Standar 12 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Data Filename : Standar 12 ppm 23032021.lcd
 Method Filename : metode8-23032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin23032021.lcb
 Vial # : 3-10
 Injection Volume : 20 uL
 Sample Type : Unknown

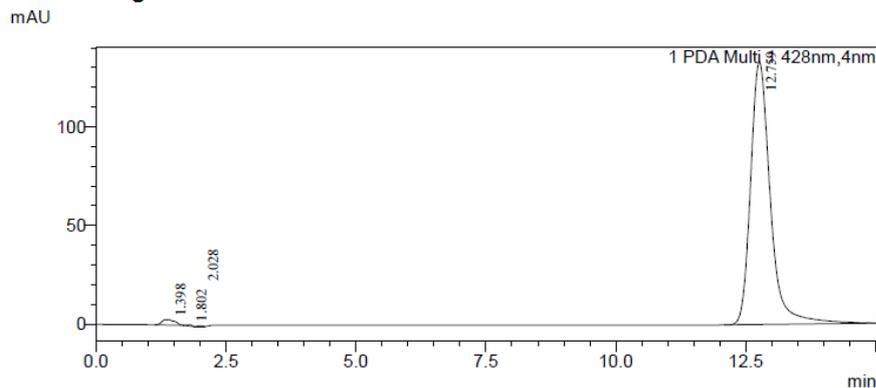
<Chromatogram>



<Sample Information>

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : Standar 24 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Tray# : 3
 Vial# : 11
 Injection Volume : 20
 Data File : Standar 24 ppm 23032021.lcd
 Method File : metode8-23032021.lcm

<Chromatogram>

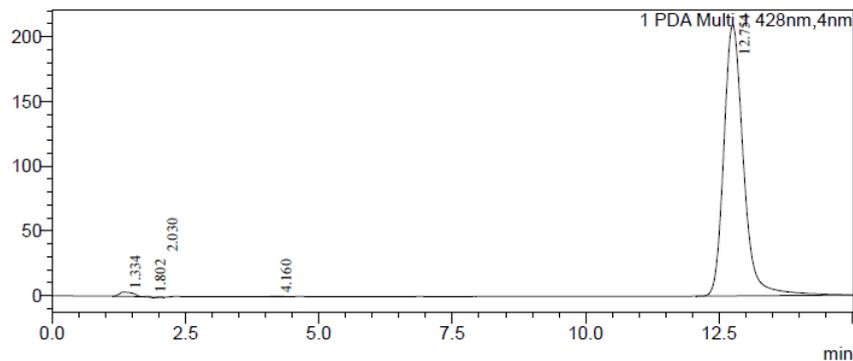


<Sample Information>

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : Standar 36 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Tray# : 3
 Vial# : 12
 Injection Volume : 20
 Data File : Standar 36 ppm 23032021.lcd
 Method File : metode8-23032021.lcm

<Chromatogram>

mAU

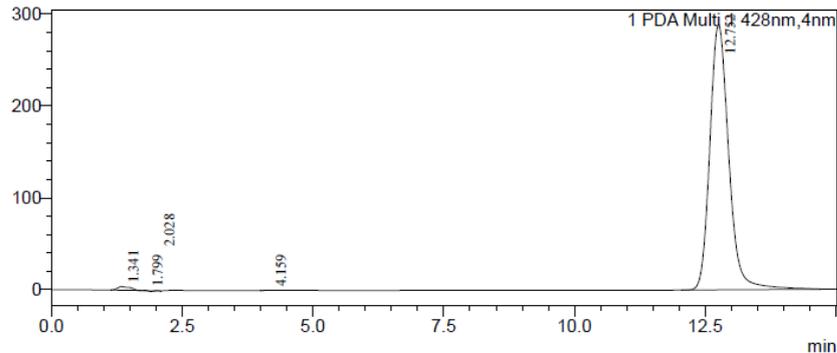


<Sample Information>

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : Standar 48 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Tray# : 3
 Vial# : 13
 Injection Volume : 20
 Data File : Standar 48 ppm 23032021.lcd
 Method File : metode8-23032021.lcm

<Chromatogram>

mAU

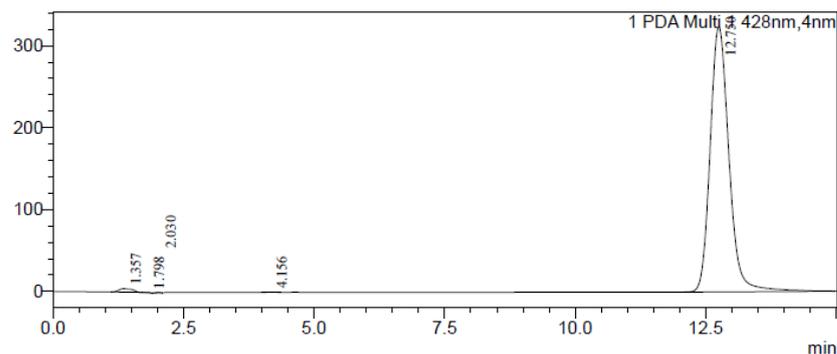


<Sample Information>

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : Standar 54 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Tray# : 3
 Vial# : 14
 Injection Volume : 20
 Data File : Standar 54 ppm 23032021.lcd
 Method File : metode8-23032021.lcm

<Chromatogram>

mAU



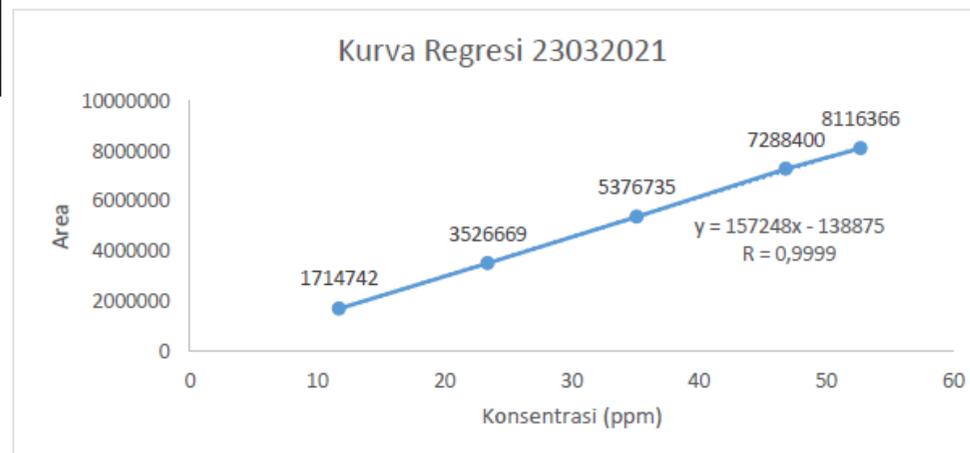
Hasil Analisis Perhitungan Uji Linearitas

Analisa Kurva Kalibrasi

Waktu retensi (min)	Kons (ppm)	Area
12,777	11,7176	1714742
12,759	23,4352	3526669
12,754	35,1528	5376735
12,752	46,8704	7288400
12,750	52,7292	8116366

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,999906256
R Square	0,999812521
Adjusted R Square	0,999750028
Standard Error	41714,55505
Observations	5



ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	2,78396E+13	2,78396E+13	15998,79862	1,08954E-06
Residual	3	5220312308	1740104103		
Total	4	2,78448E+13			

	<i>df</i>	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept		-138875,2683	46181,04118	-3,007192232	0,05733963	-285843,9522	8093,415597	-285843,9522	8093,415597
X Variable 1		157248,2087	1243,202918	126,4863575	1,08954E-06	153291,7821	161204,6352	153291,7821	161204,6352

Perhitungan LOD dan LOQ

Perhitungan LOD dan LOQ menggunakan standar deviasi y -intercept (respon analitik)

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \sigma}{\text{slope}} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \times \sigma}{\text{slope}}$$

dengan rumus σ yaitu:

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

σ : simpangan baku respon analitik
 y : respon detektor (area)
 y_i : hasil dari nilai x yang dimasukkan pada persamaan regresi
 n : jumlah konsentrasi yang digunakan

Pers. Regresi $\rightarrow y = 157248,209 x - 138875,268$

x	y	y_i	(y- y_i)	(y- y_i) ²
11,7176	1714742	1703696,341	11045,65854	122006572,5
23,4352	3526669	3546267,951	-19598,95122	384118888,9
35,1528	5376735	5388839,561	-12104,56098	146520396,4
46,8704	7288400	7231411,171	56988,82927	3247726661
52,7292	8116366	8152696,976	-36330,97561	1319939789
$\sum(y-y_i)^2$				5220312308

$$n = 5$$

$$(n - 2) = 3$$

$$\sigma = 41714,55505$$

$$\text{LOD} = 0,875418757$$

$$\text{LOQ} = 2,652784112$$

Contoh perhitungan y_i

$$x = 11,7176 \rightarrow y_i = (157248,209 \times 11,7176) - 138875,268$$

$$y_i = 1703696,341$$

Contoh perhitungan (y- y_i)

$$y - y_i = 1714742 - 1703696,341 = 11045,65854$$

Contoh perhitungan (y- y_i)²

$$(y - y_i)^2 = (11045,65854)^2 = 122006572,5$$

Contoh perhitungan σ

$$\sigma = \sqrt{\frac{5220312308}{3}} = 41714,55505$$

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times 41714,55505}{157248,209} = 0,875418757$$

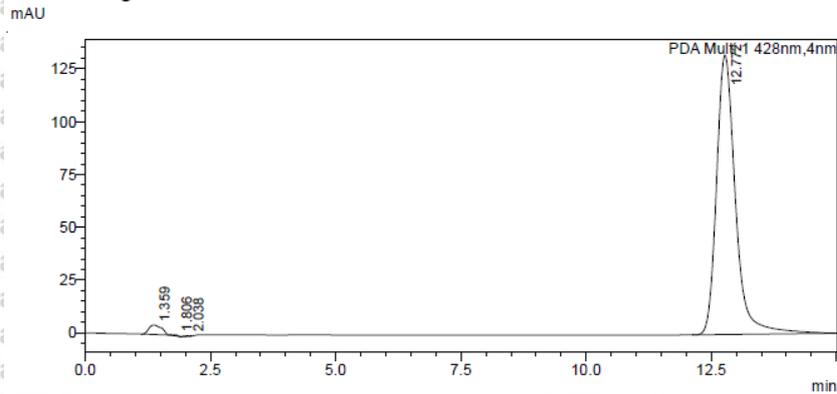
$$\text{LOQ} = \frac{10 \times 41714,55505}{157248,209} = 2,652784112$$

(Hasil Uji Akurasi dan Presisi)

<Sample Information>

Sample Name : AP1 Sampel 24 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Data Filename : AP1 Sampel 24 ppm 23032021.lcd
 Method Filename : metode8-23032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin23032021.lcb
 Vial # : 3-19
 Injection Volume : 20 uL
 Sample Type : Unknown

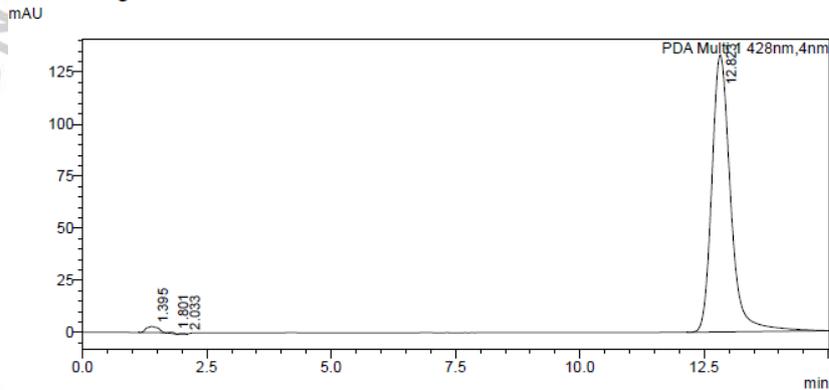
<Chromatogram>



<Sample Information>

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : AP2 Sampel 24 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Tray# : 3
 Vial# : 20
 Injection Volume : 20
 Data File : AP2 Sampel 24 ppm 23032021.lcd
 Method File : metode8-23032021.lcm

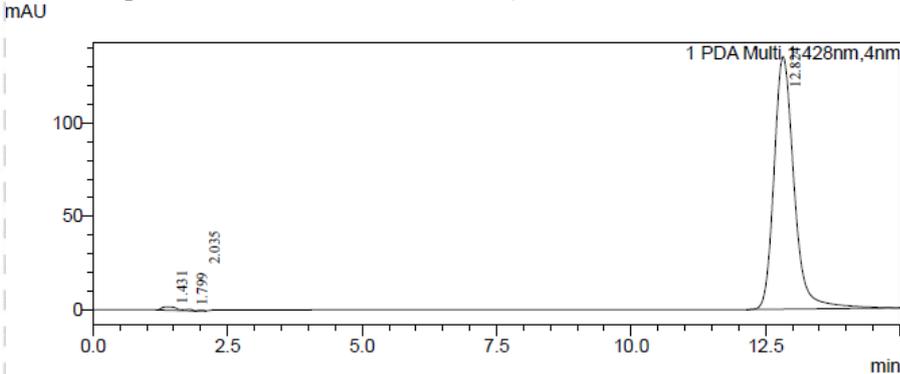
<Chromatogram>



<Sample Information>

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : AP3 Sampel 24 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Tray# : 3
 Vial# : 21
 Injection Volume : 20
 Data File : AP3 Sampel 24 ppm 23032021.lcd
 Method File : metode8-23032021.lcm

<Chromatogram>

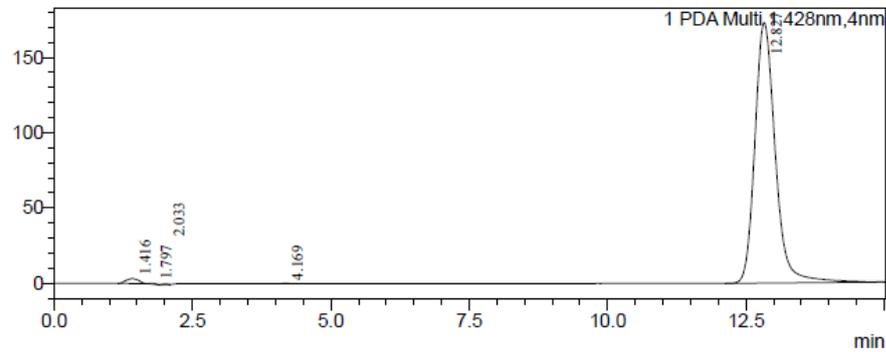


<Sample Information>

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : AP1 Sampel 30 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Tray# : 3
 Vial# : 22
 Injection Volume : 20
 Data File : AP1 Sampel 30 ppm 23032021.lcd
 Method File : metode8-23032021.lcm

<Chromatogram>

mAU

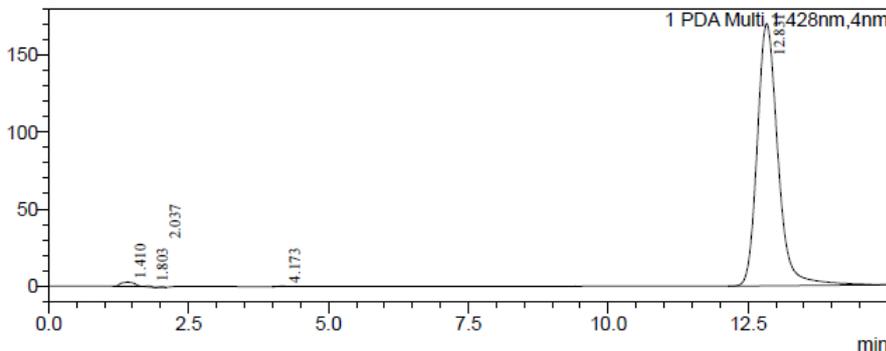


<Sample Information>

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : AP2 Sampel 30 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Tray# : 3
 Vial# : 23
 Injection Volume : 20
 Data File : AP2 Sampel 30 ppm 23032021.lcd
 Method File : metode8-23032021.lcm

<Chromatogram>

mAU

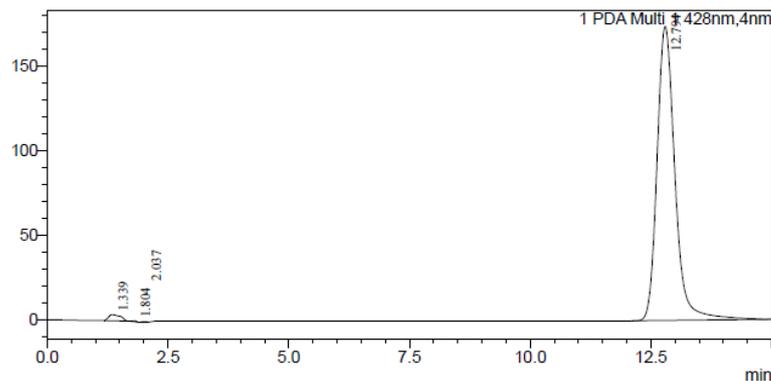


<Sample Information>

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : AP3 Sampel 30 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Tray# : 3
 Vial# : 24
 Injection Volume : 20
 Data File : AP3 Sampel 30 ppm 23032021.lcd
 Method File : metode8-23032021.lcm

<Chromatogram>

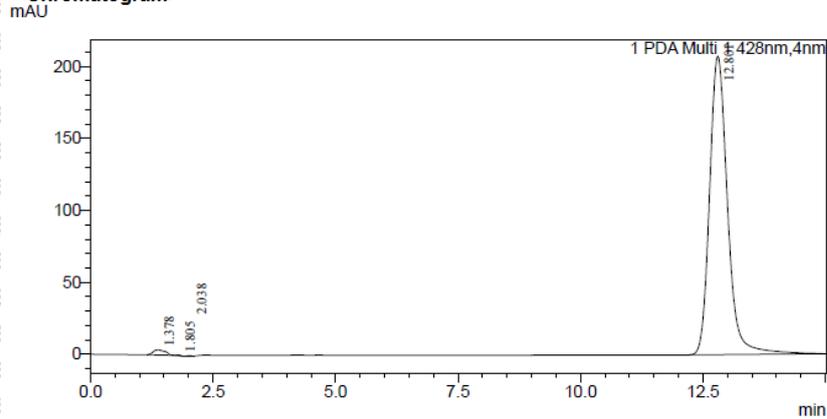
mAU



<Sample Information>

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : AP1 Sampel 36 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Tray# : 3
 Vial# : 25
 Injection Volume : 20
 Data File : AP1 Sampel 36 ppm 23032021.lcd
 Method File : metode8-23032021.lcm

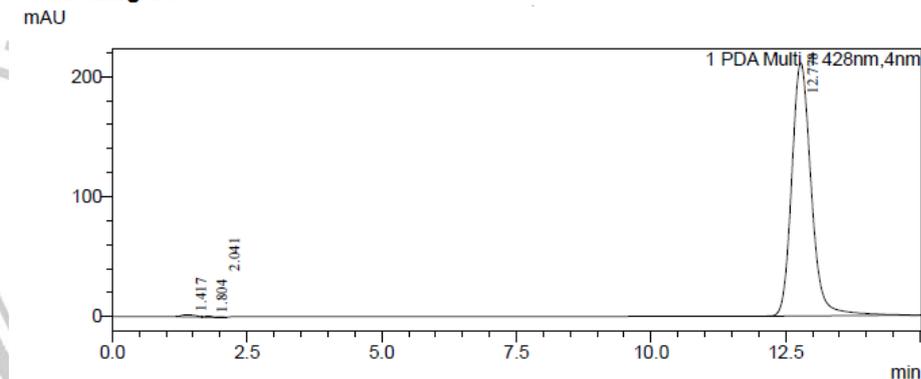
<Chromatogram>



<Sample Information>

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : AP2 Sampel 36 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Tray# : 3
 Vial# : 26
 Injection Volume : 20
 Data File : AP2 Sampel 36 ppm 23032021.lcd
 Method File : metode8-23032021.lcm

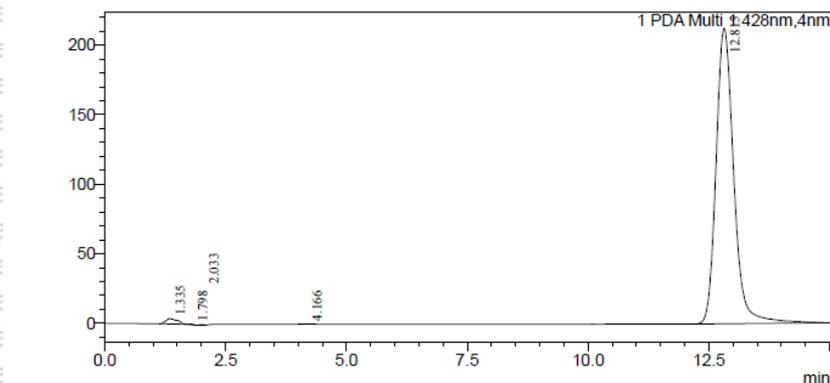
<Chromatogram>



<Sample Information>

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : AP3 Sampel 36 ppm 23032021
 Sample ID : 23032021
 Tray# : 3
 Vial# : 27
 Injection Volume : 20
 Data File : AP3 Sampel 36 ppm 23032021.lcd
 Method File : metode8-23032021.lcm

<Chromatogram>



Hasil Analisis Perhitungan Uji Linearitas

Akurasi 24 ppm (80%) --> Akurat dan Presisi

Bobot penimbangan kurkumin = 0,0151 gram
 Bobot kurkumin = 0,014647 gram
 Konsentrasi sebenarnya = 23,44 ppm

No.	Waktu Retensi (min)	Area	Kons (ppm)	%Recovery (%)	%RSD (%)
1	12,772	3485603	23,04941	98,33366	0,54376
2	12,823	3491709	23,08824	98,49931	
3	12,824	3522517	23,28416	99,33515	
Rata-rata				98,72271	

Akurasi 30 ppm (100%) --> Akurat dan Presisi

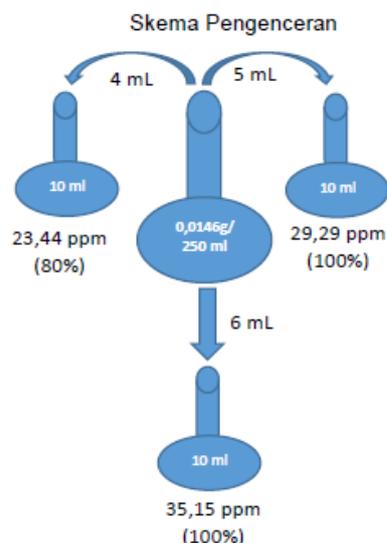
Bobot penimbangan kurkumin = 0,0151 gram
 Bobot kurkumin = 0,014647 gram
 Konsentrasi sebenarnya = 29,29 ppm

No.	Waktu Retensi (min)	Area	Kons (ppm)	%Recovery (%)	%RSD (%)
1	12,827	4452771	29,19999	99,69270	1,07496
2	12,831	4394952	28,83230	98,43735	
3	12,794	4493020	29,45595	100,56657	
Rata-rata				99,56554	

Akurasi 36 ppm (120%) --> Akurat dan Presisi

Bobot penimbangan kurkumin = 0,0151 gram
 Bobot kurkumin = 0,014647 gram
 Konsentrasi sebenarnya = 35,15 ppm

No.	Waktu Retensi (min)	Area	Kons (ppm)	%Recovery (%)	%RSD (%)
1	12,801	5298393	34,57762	98,37160	1,15022
2	12,778	5333731	34,80234	99,01094	
3	12,815	5421066	35,35774	100,59101	
Rata-rata				99,32451	



Contoh Perhitungan %Recovery

Rumus:

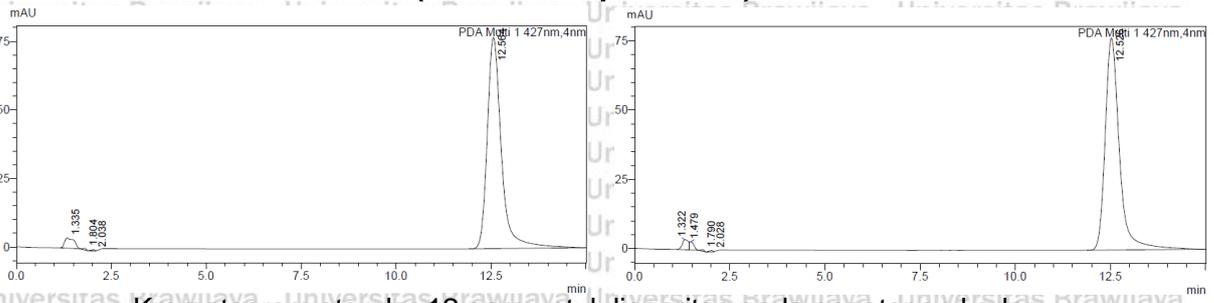
$$\%Recovery = \frac{\text{Konsentrasi analit yang didapatkan}}{\text{Konsentrasi analit awal yang diketahui}} \times 100\%$$

$$\%Recovery = \frac{23,04941 \text{ ppm}}{23,44 \text{ ppm}} \times 100\% = 98,33\%$$

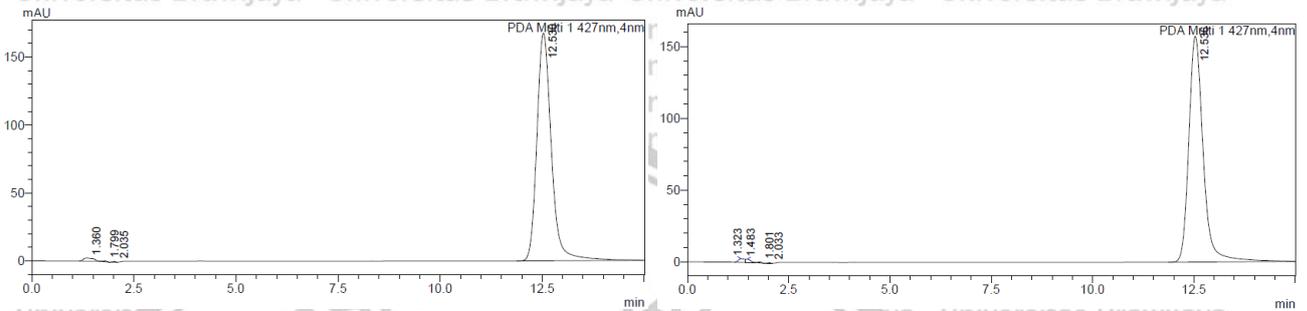
Contoh Perhitungan %RSD pada Microsoft Excel

$$\%RSD = \frac{STDEV(23,0491; 23,08824; 23,28416)}{AVERAGE(23,0491; 23,08824; 23,28416)} \times 100\% = 0,54\%$$

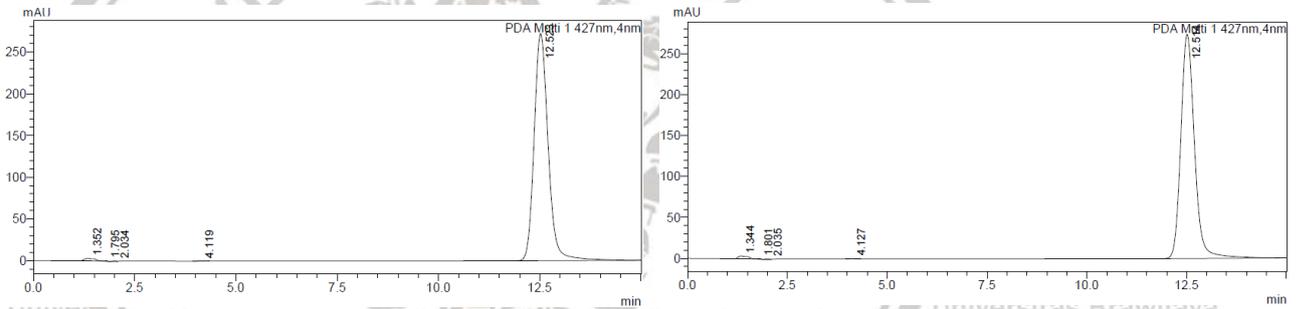
(Hasil Penetapan Kadar)



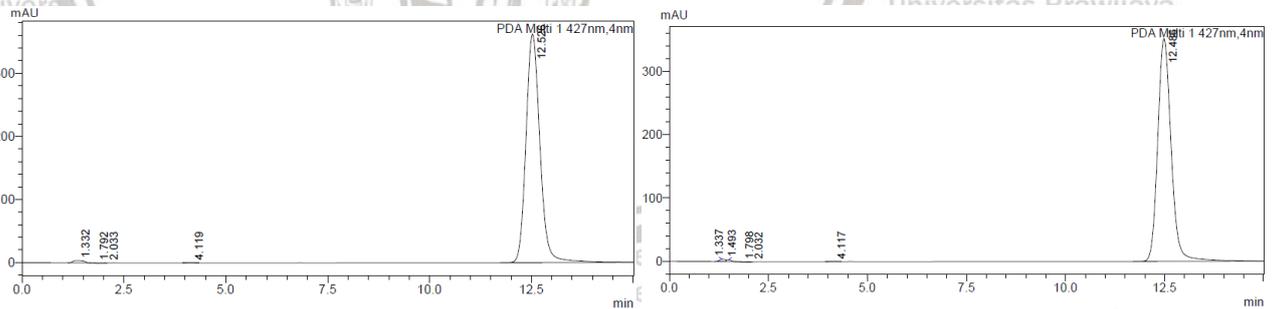
Kromatogram standar 12 ppm untuk linearitas pada penetapan kadar



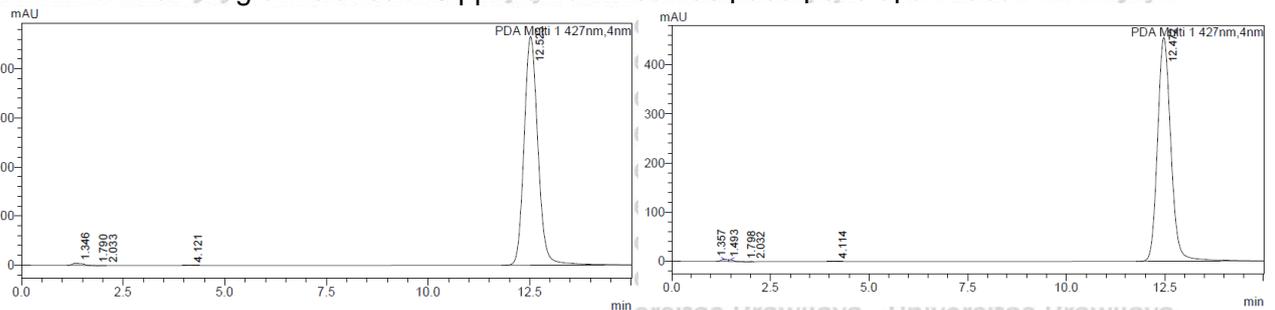
Kromatogram standar 24 ppm untuk linearitas pada penetapan kadar



Kromatogram standar 36 ppm untuk linearitas pada penetapan kadar



Kromatogram standar 48 ppm untuk linearitas pada penetapan kadar



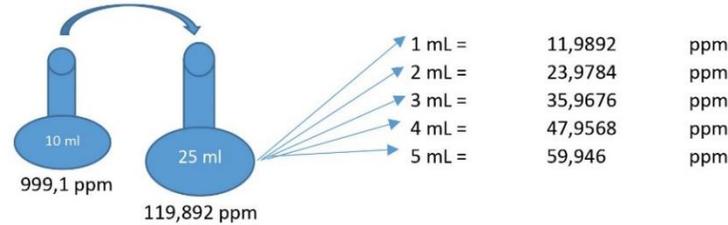
Kromatogram standar 60 ppm untuk linearitas pada penetapan kadar

Hasil Perhitungan dan Analisis Kurva Kalibrasi untuk Penetapan Kadar

Uji Linearitas tanggal 25032021

Bobot penimbangan standar = 0,0103 gram
 Faktor koreksi = 0,97
 Kurkumin induk = 0,009991 g
 Kons. Larutan induk = 999,1 ppm
 Kons. Larutan 25 mL = 119,892 ppm

Skema Pengenceran



Analisa Kurva Kalibrasi

Waktu Retensi (min)	Kons (ppm)	Area
12,526	11,9892	2003700
12,530	23,9784	4159388
12,523	35,9676	6587923
12,526	47,9568	8650011
12,523	59,946	11042771



SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,999738228
R Square	0,999476525
Adjusted R Square	0,999302033
Standard Error	94299,39756
Observations	5

ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	5,09349E+13	5,09349E+13	5727,930666	5,08395E-06
Residual	3	26677129143	8892376381		
Total	4	5,09616E+13			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	-281870,9	98902,04254	-2,850000796	0,06510899	-596621,3399	32879,53987	-596621,3399	32879,53987
X Variable 1	188242,4599	2487,24584	75,68309366	5,08395E-06	180326,9335	196157,9862	180326,9335	196157,9862

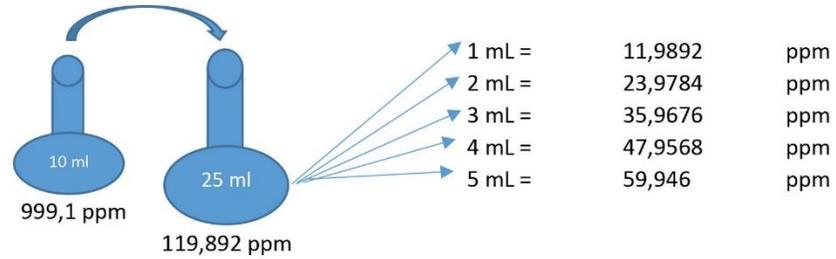


Uji Linearitas tanggal 26032021

Bobot penimbangan kurkumin = 0,0103 gram
 Faktor koreksi = 0,97

Kurkumin induk= 0,009991 g
 Kons. Larutan induk = 999,1 ppm
 Kons. Larutan 25 mL = 119,892 ppm

Skema Pengenceran



Analisa Kurva Kalibrasi

Waktu Retensi (min)	Kons (ppm)	Area
12,564	11,9892	2005230
12,536	23,9784	3894245
12,514	35,9676	6537641
12,486	47,9568	8309623
12,472	59,946	10633390



SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,998545643
R Square	0,997093401
Adjusted R Square	0,996124535
Standard Error	213627,3862
Observations	5

ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	4,69662E+13	4,69662E+13	1029,134237	6,65649E-05
Residual	3	1,3691E+11	45636660129		
Total	4	4,71032E+13			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	-225483,6	224054,2928	-1,006379289	0,388372809	-938524,3564	487557,1564	-938524,3564	487557,1564
X Variable 1	180760,1675	5634,647107	32,08012215	6,65649E-05	162828,2056	198692,1294	162828,2056	198692,1294



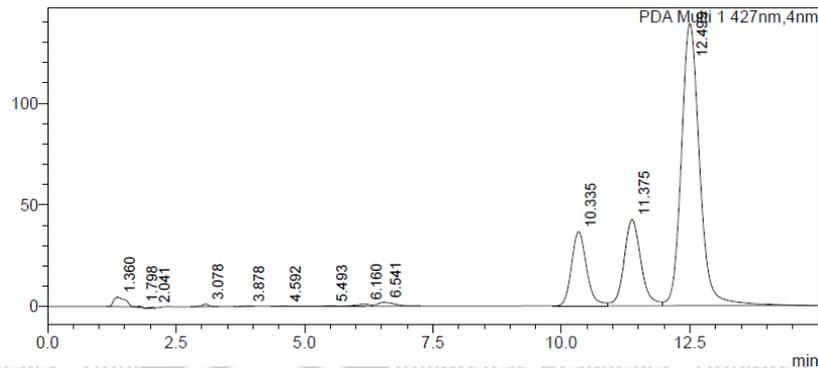
<Sample Information>

Sample Name : Sampel MK1(1) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel MK1(1) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-28
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



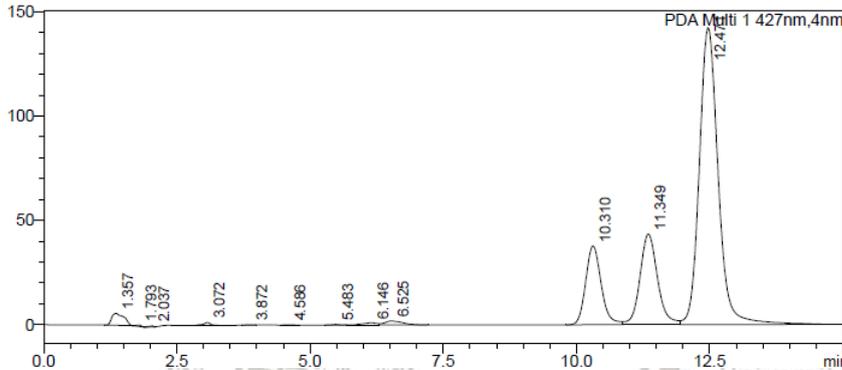
<Sample Information>

Sample Name : Sampel MK1(2) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel MK1(2) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-29
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



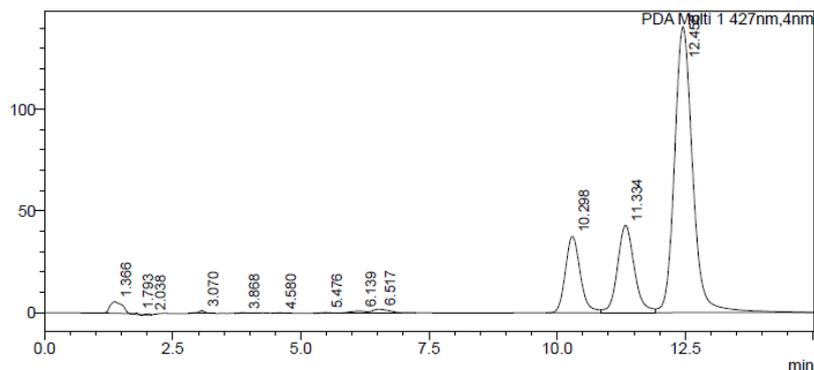
<Sample Information>

Sample Name : Sampel MK1(3) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel MK1(3) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-30
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



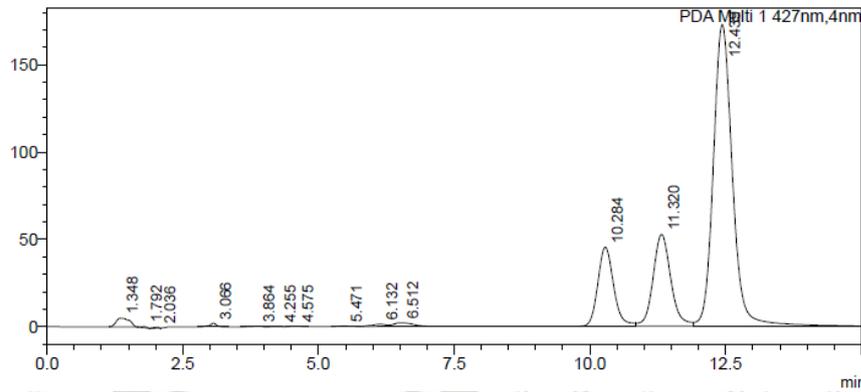
<Sample Information>

Sample Name : Sampel MK2(1) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel MK2(1) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-31
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



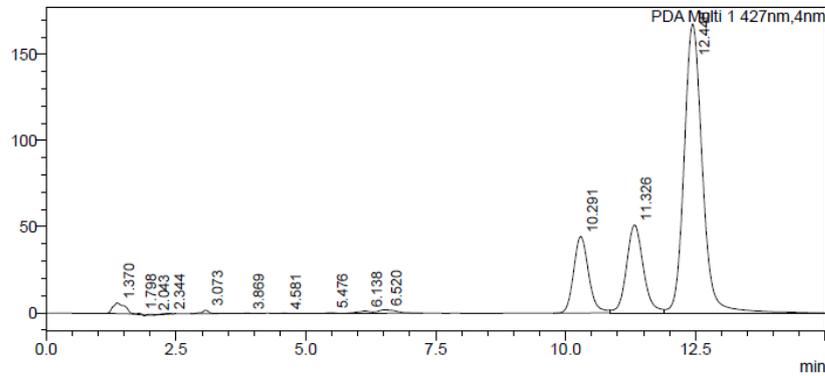
<Sample Information>

Sample Name : Sampel MK2(2) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel MK2(2) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-32
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



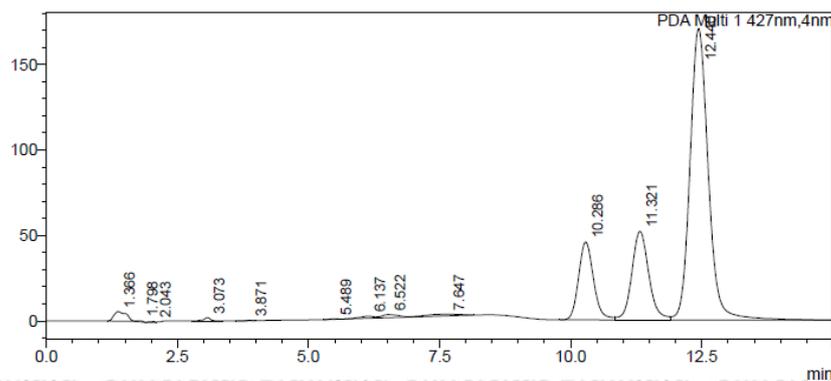
<Sample Information>

Sample Name : Sampel MK2(3) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel MK2(3) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-33
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



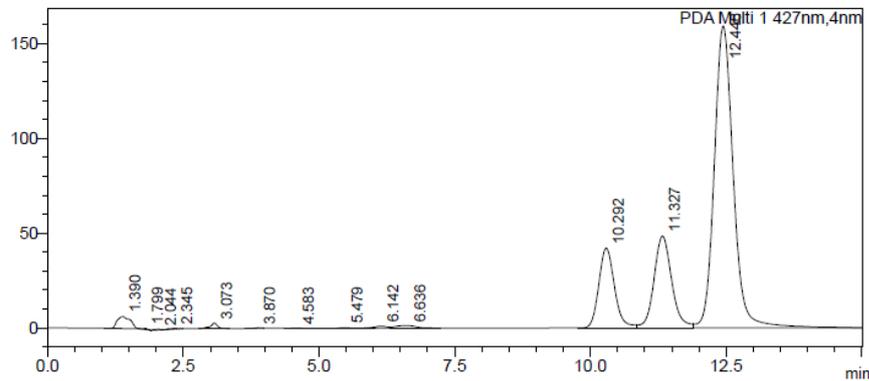
<Sample Information>

Sample Name : Sampel MK3(1) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel MK3(1) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-34
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU

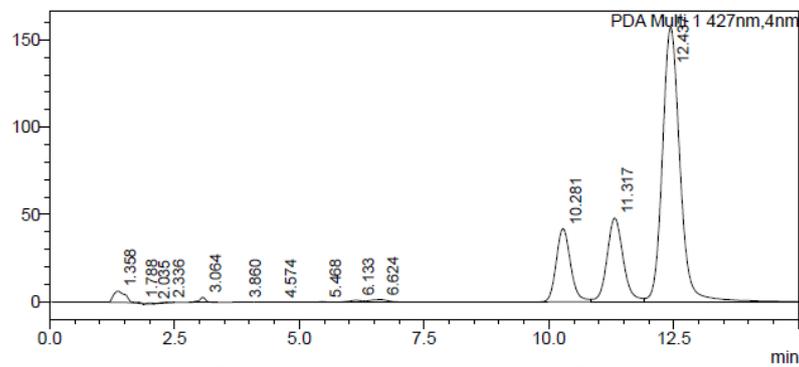
**<Sample Information>**

Sample Name : Sampel MK3(2) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel MK3(2) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-35
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU

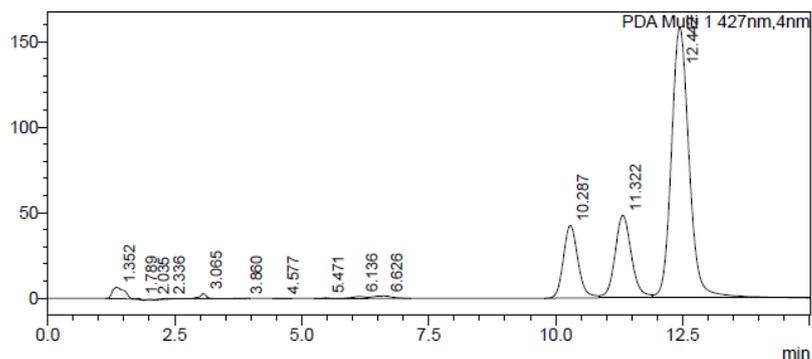
**<Sample Information>**

Sample Name : Sampel MK3(3) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel MK3(3) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-36
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



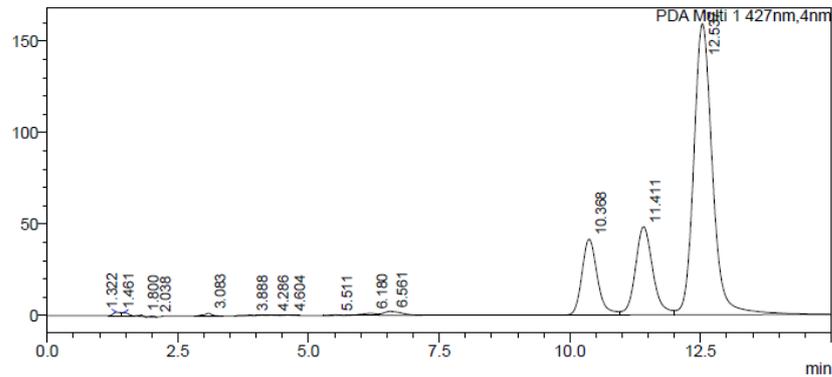
<Sample Information>

Sample Name : Sampel RK1(1) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel RK1(1) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-19
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



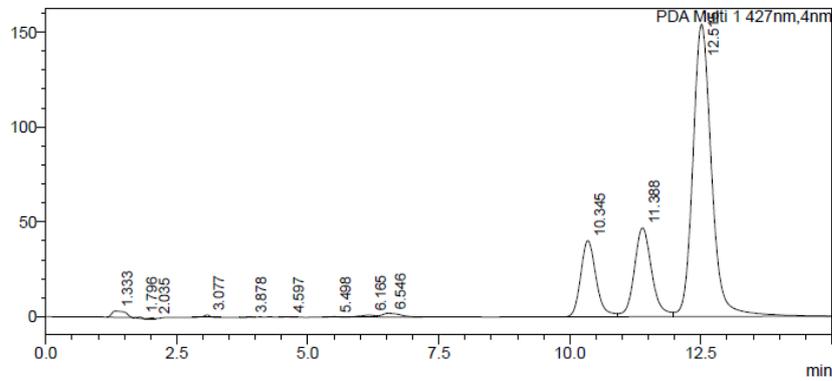
<Sample Information>

Sample Name : Sampel RK1(2) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel RK1(2) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-20
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



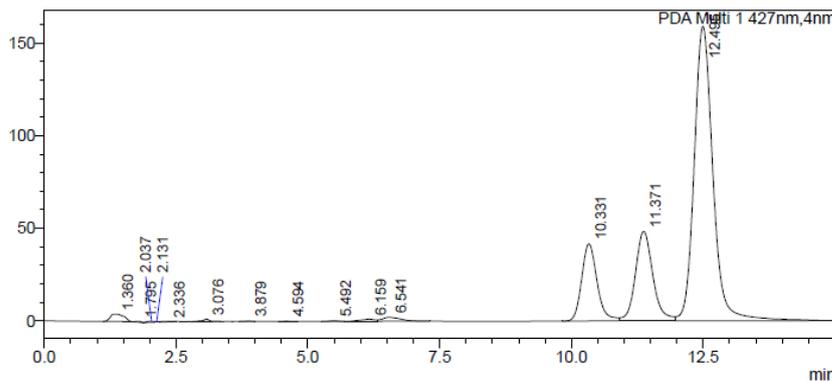
<Sample Information>

Sample Name : Sampel RK1(3) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel RK1(3) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-21
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



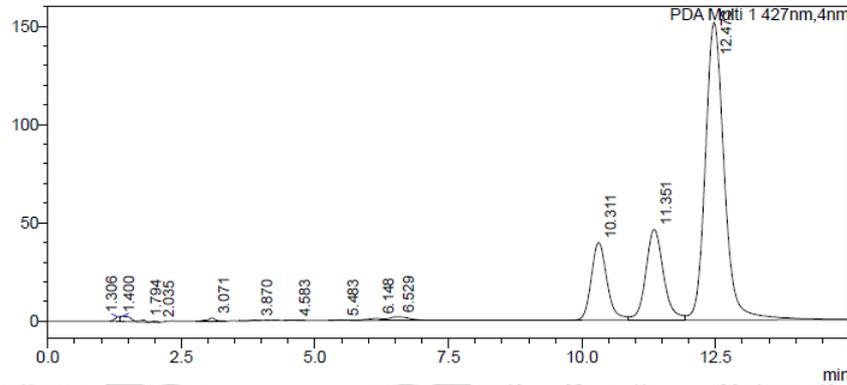
<Sample Information>

Sample Name : Sampel RK2(1) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel RK2(1) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-22
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



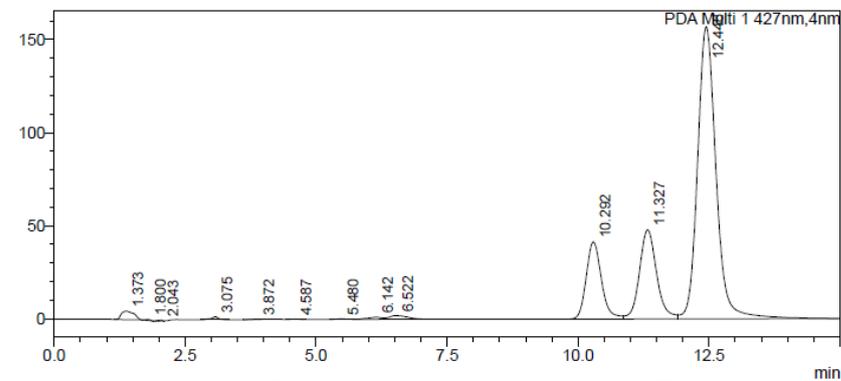
<Sample Information>

Sample Name : Sampel RK2(2) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel RK2(2) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-23
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



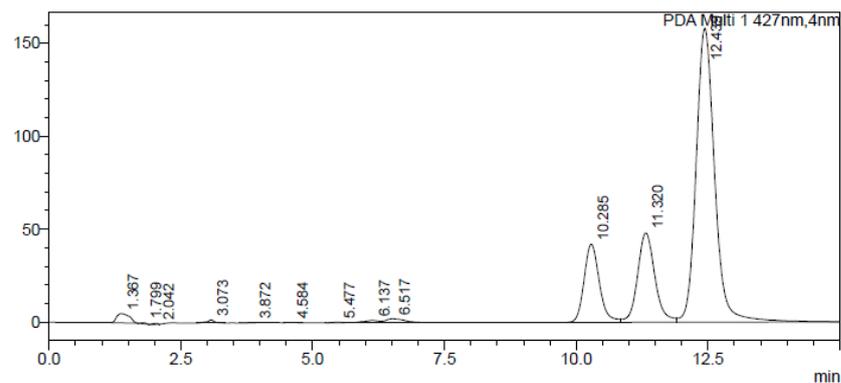
<Sample Information>

Sample Name : Sampel RK2(3) 25032021
 Sample ID : 25032021
 Data Filename : Sampel RK2(3) 25032021.lcd
 Method Filename : metode-25032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-24
 Injection Volume : 20 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

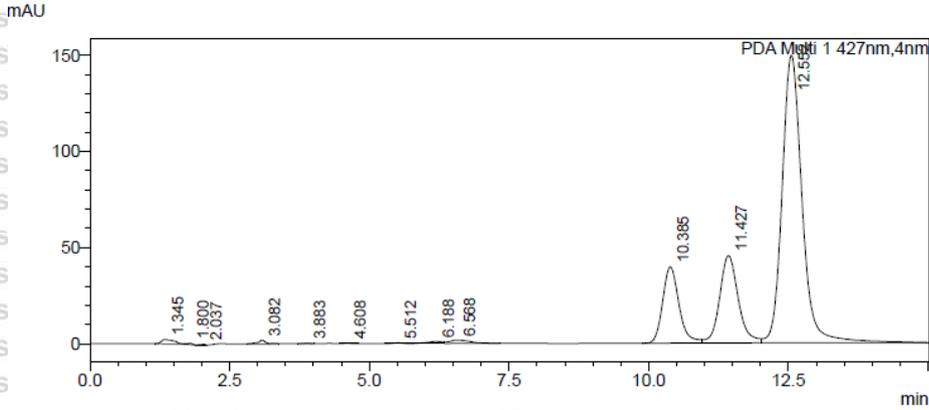
mAU



<Sample Information>

Sample Name : Sampel RK3(1) 26032021
 Sample ID : 26032021
 Data Filename : Sampel RK3(1) 26032021.lcd
 Method Filename : metode-26032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-1
 Injection Volume : 20 uL
 Sample Type : Unknown

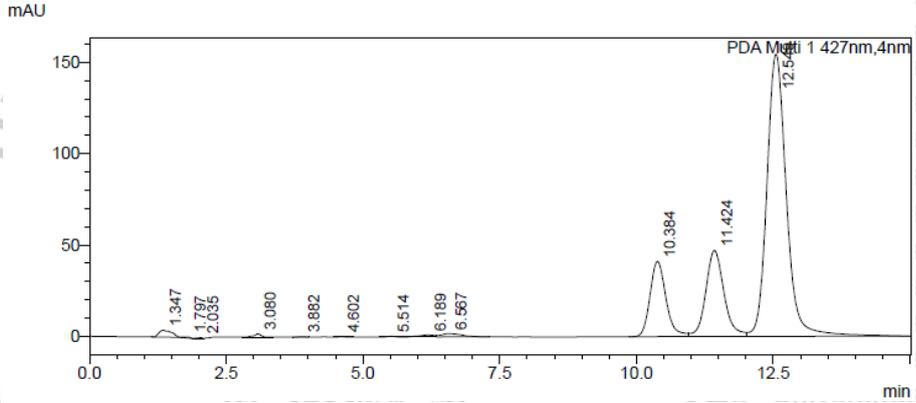
<Chromatogram>



<Sample Information>

Sample Name : Sampel RK3(2) 26032021
 Sample ID : 26032021
 Data Filename : Sampel RK3(2) 26032021.lcd
 Method Filename : metode-26032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-2
 Injection Volume : 20 uL
 Sample Type : Unknown

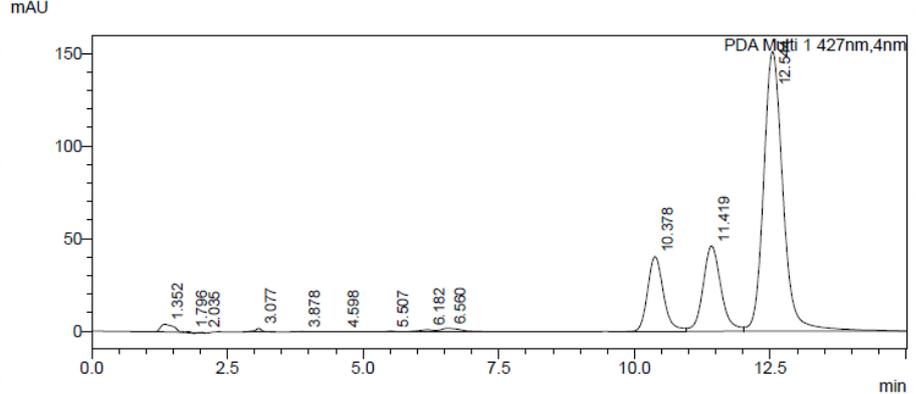
<Chromatogram>



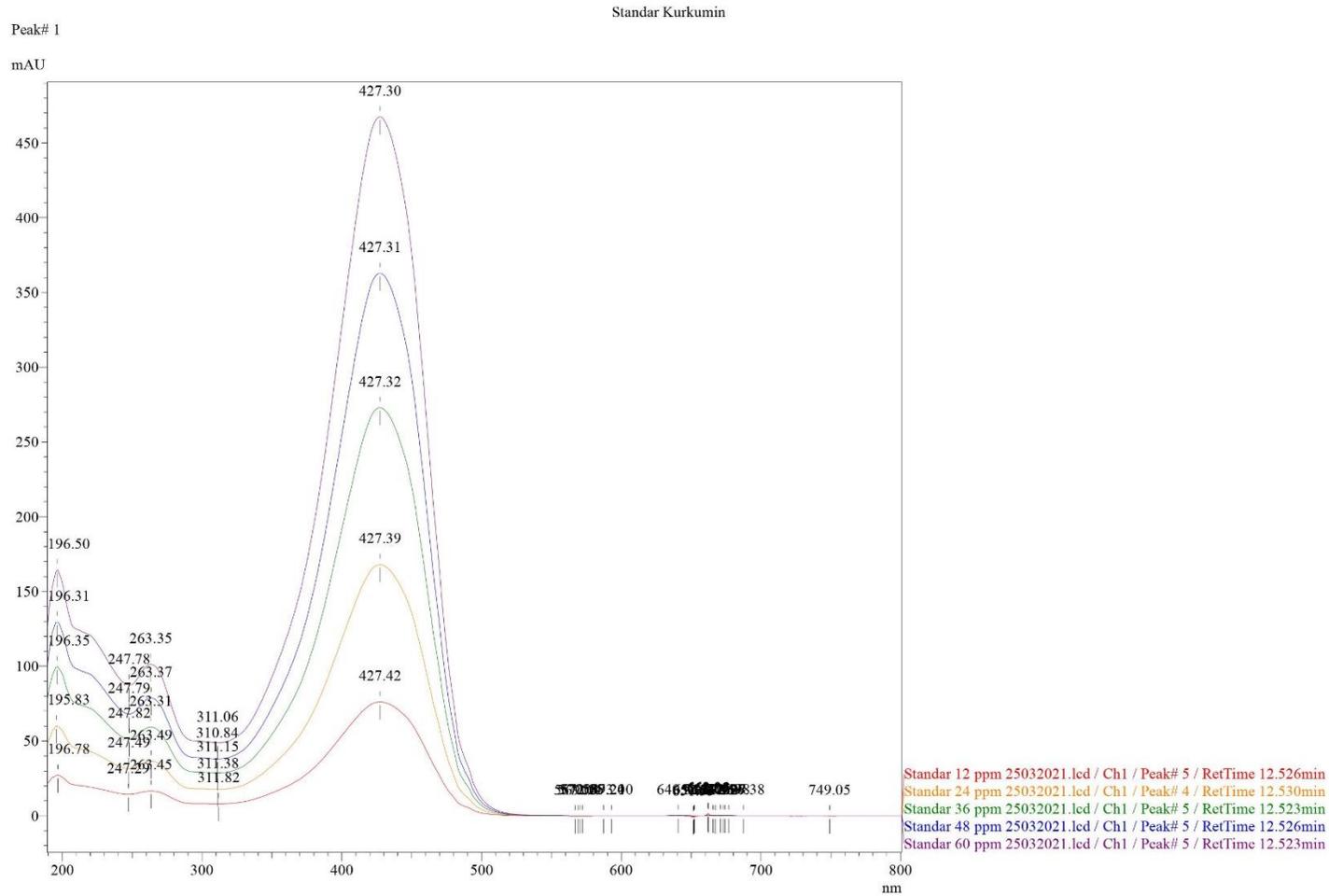
<Sample Information>

Sample Name : Sampel RK3(3) 26032021
 Sample ID : 26032021
 Data Filename : Sampel RK3(3) 26032021.lcd
 Method Filename : metode-26032021.lcm
 Batch Filename : kurkumin25032021.lcb
 Vial # : 3-3
 Injection Volume : 20 uL
 Sample Type : Unknown

<Chromatogram>



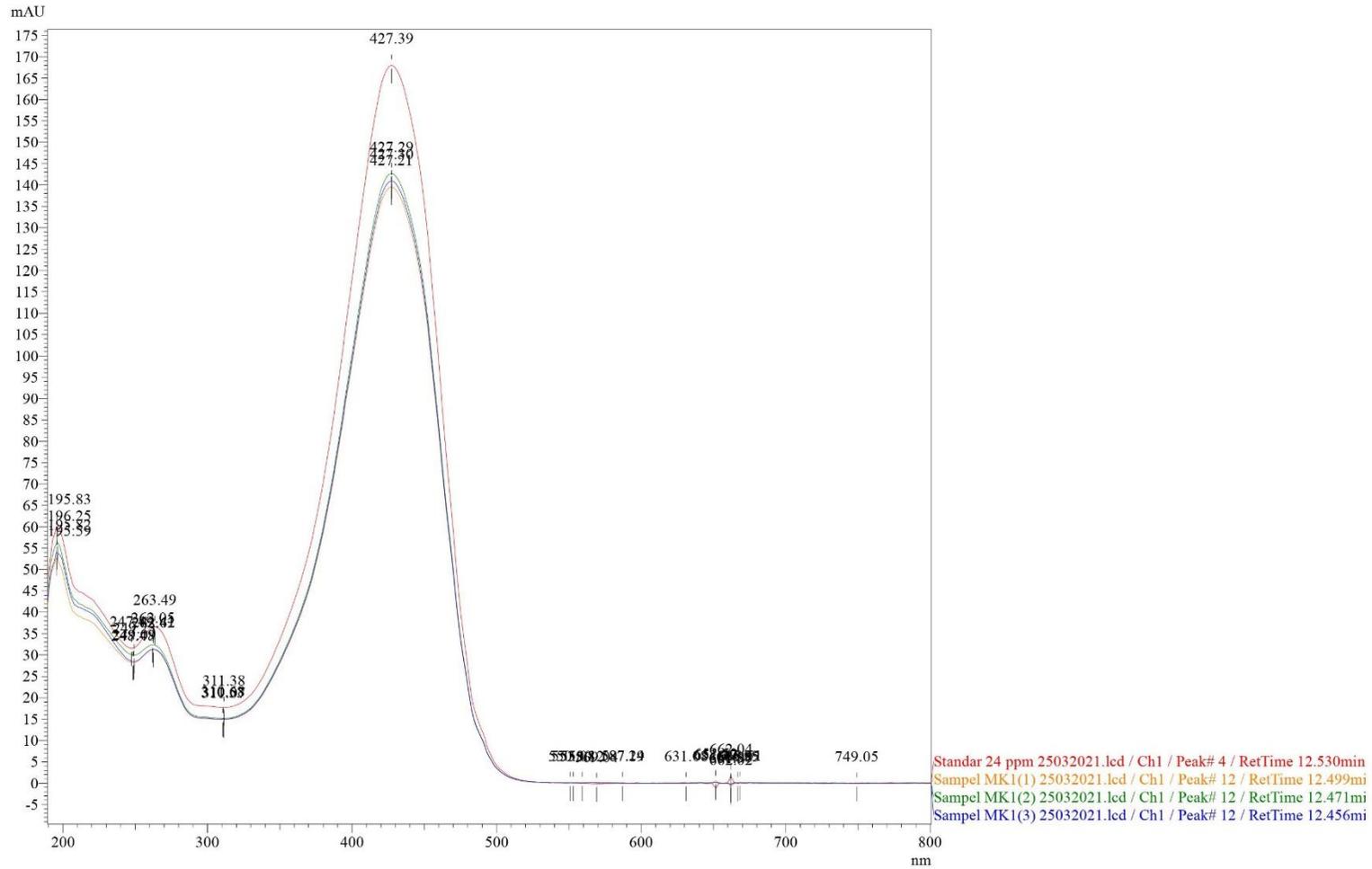
Lampiran 4. Hasil Overlay Spektrum



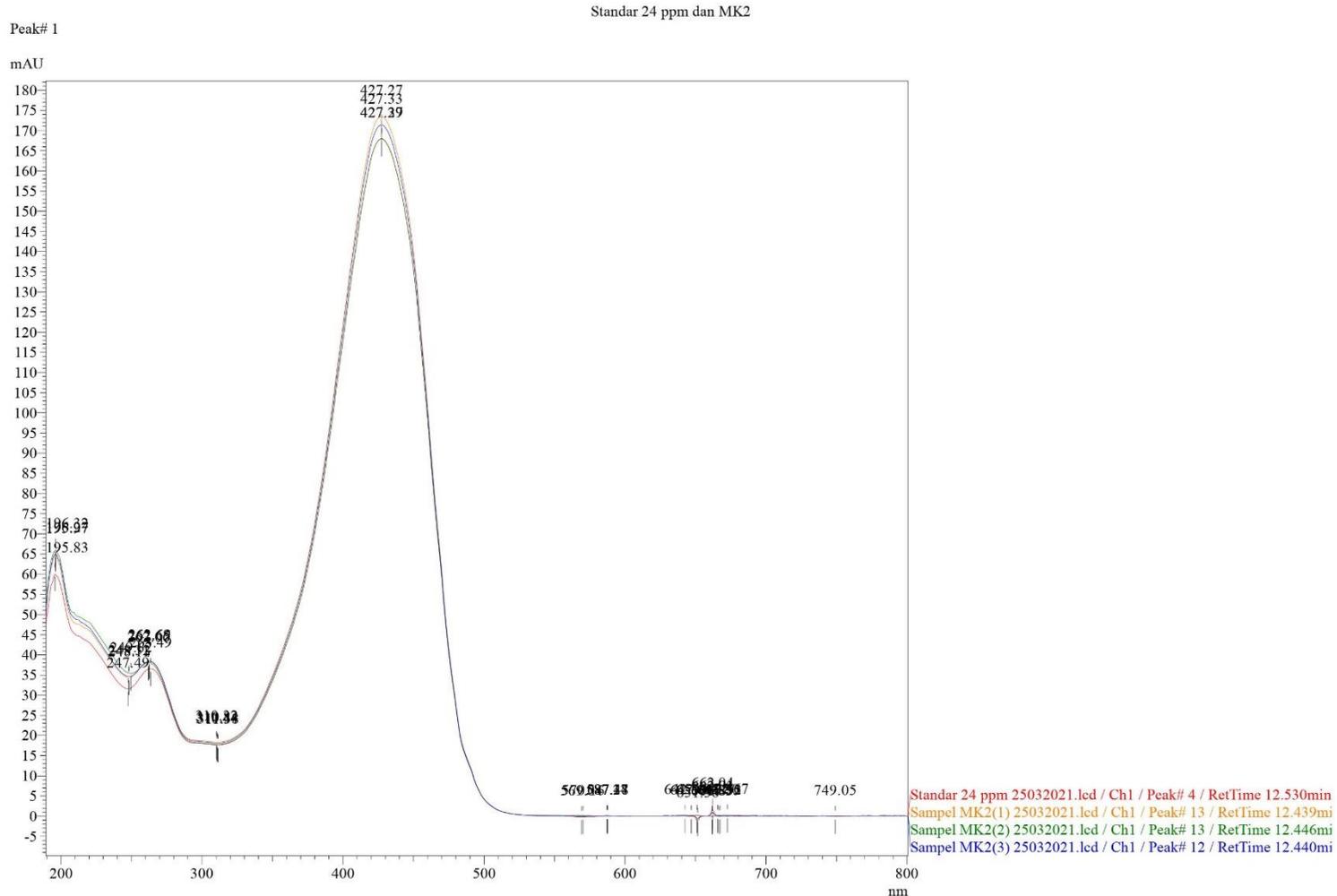
Gambar 5. Spektrum standar kurkumin tanggal 25032021

Peak# 1

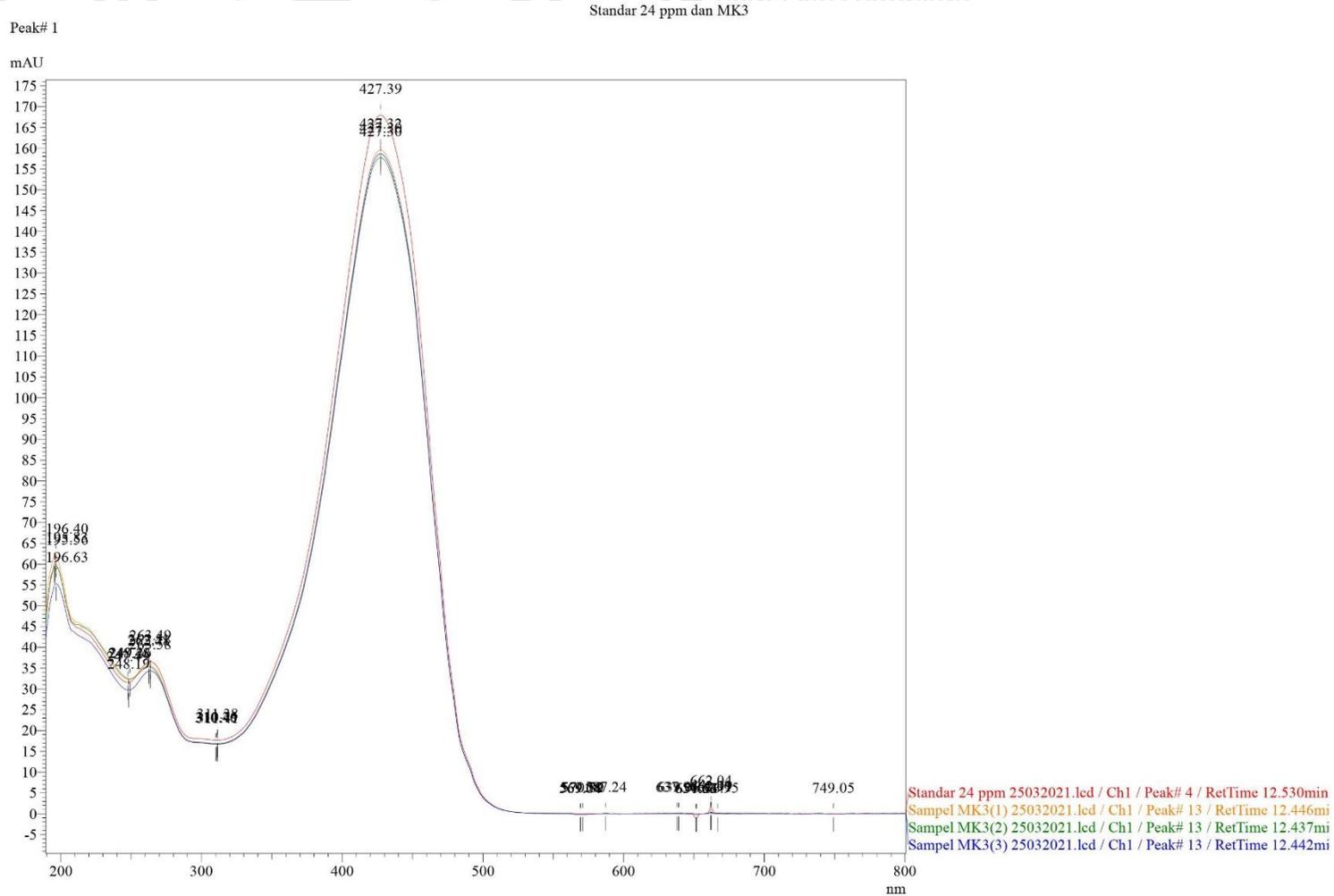
Standar 24 ppm dan MK1



Gambar 6. Spektrum standar 24 ppm dan sampel MK1

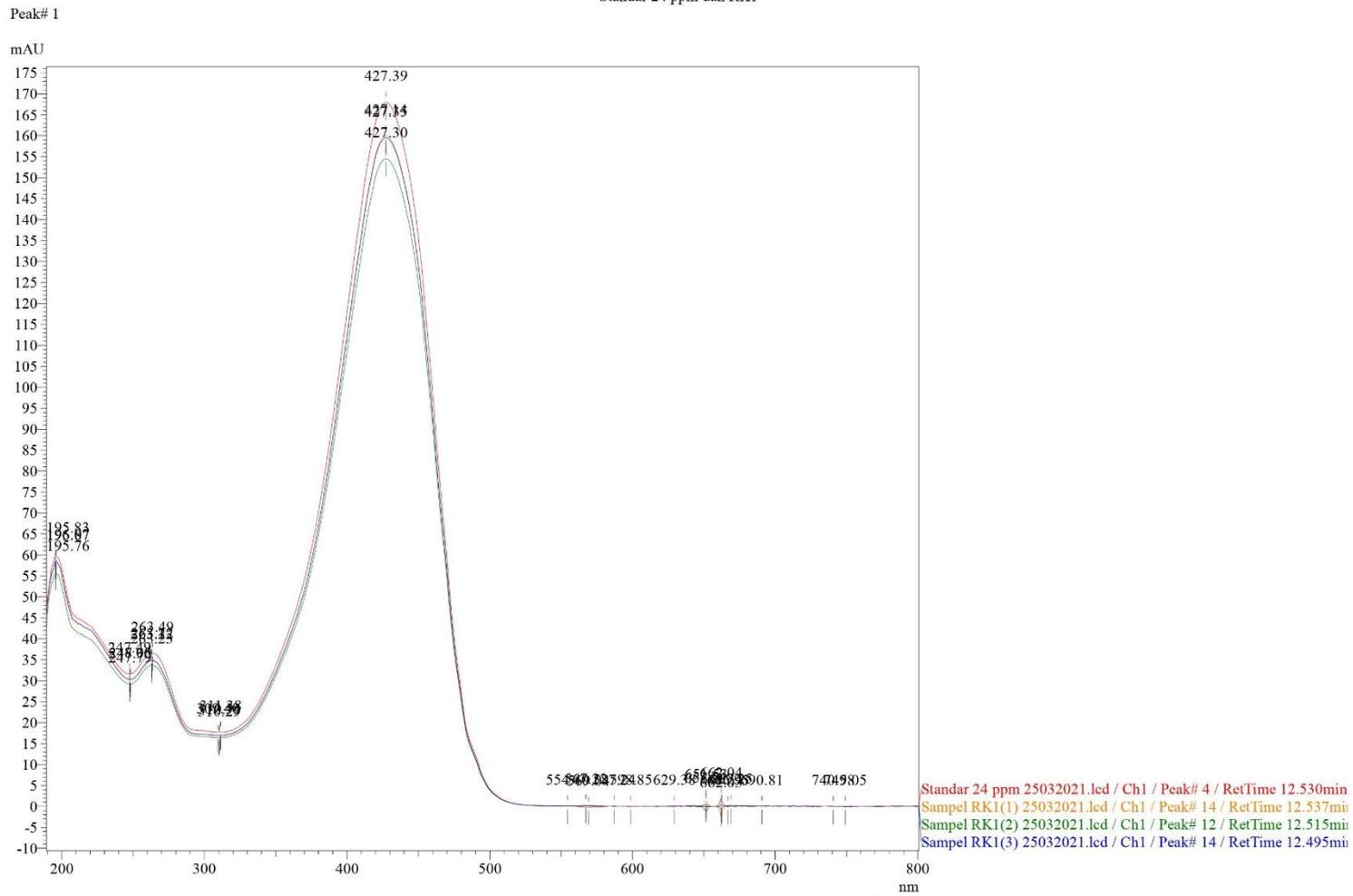


Gambar 7. Spektrum standar 24 ppm dan sampel MK2

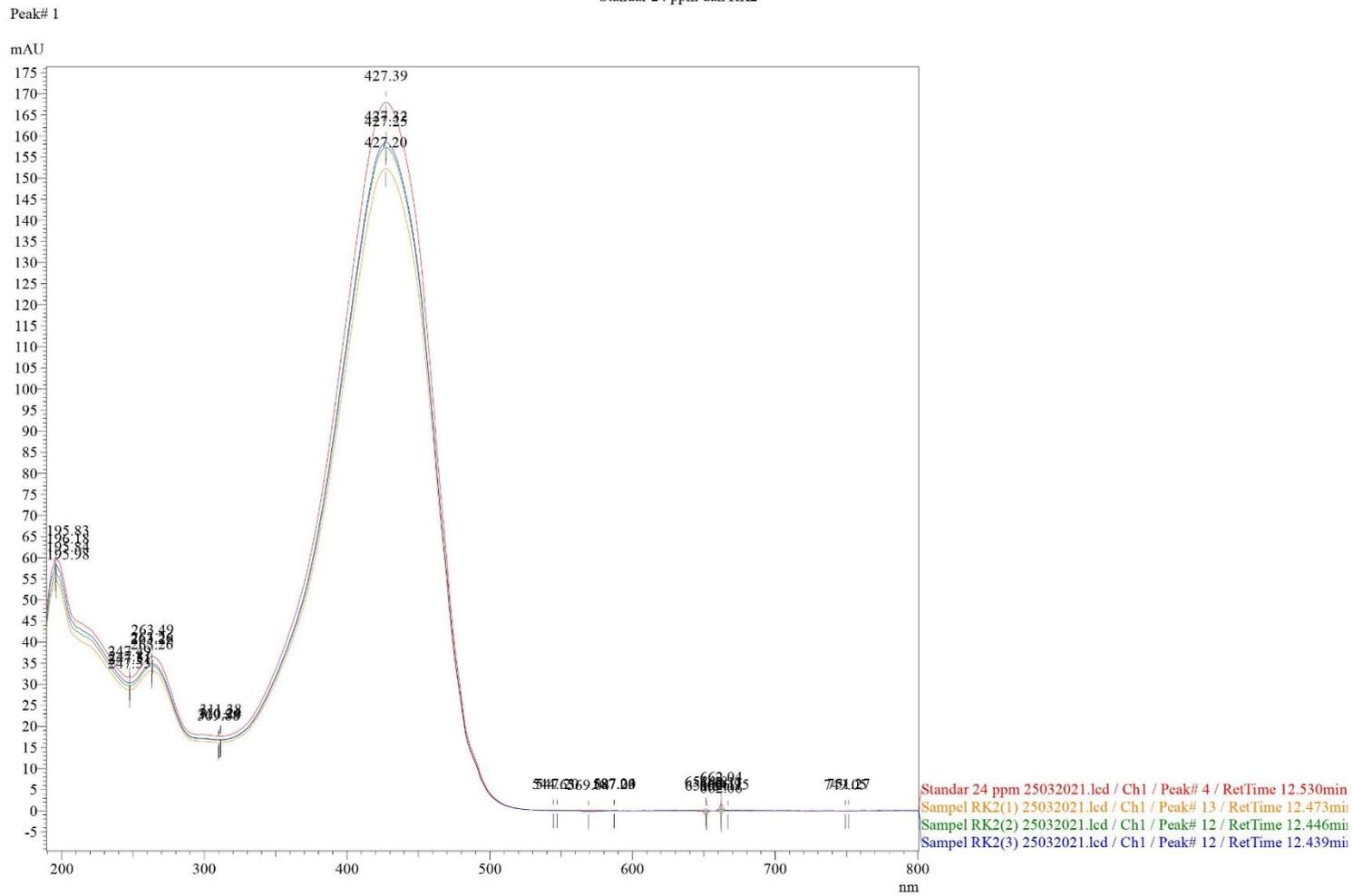


Gambar 8. Spektrum Standar 24 ppm dan sampel MK3

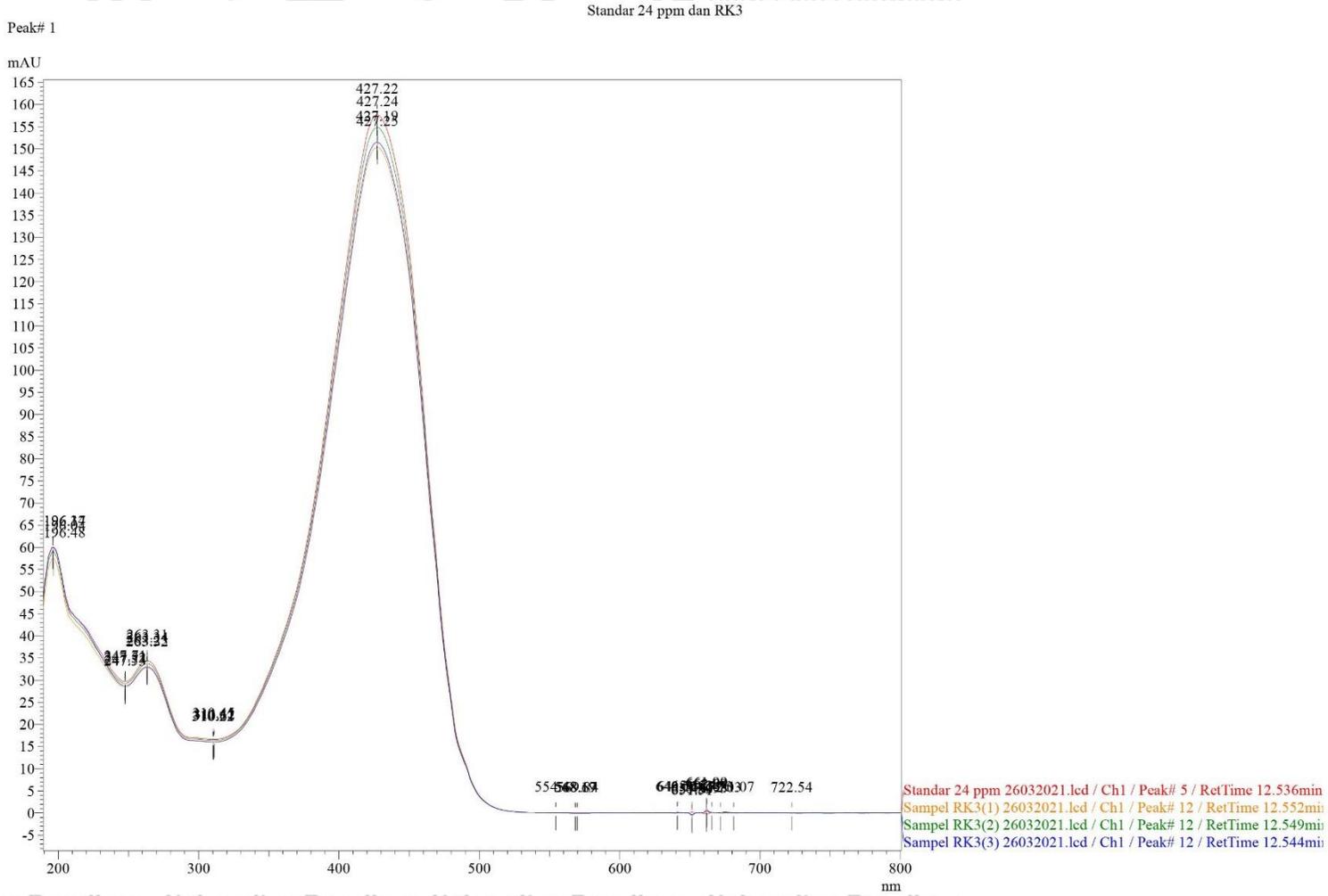




Gambar 9. Spektrum standar 24 ppm dan sampel RK1



Gambar 10. Spektrum standar 24 ppm dan sampel RK2

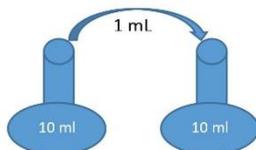


Gambar 11. Spektrum standar 24 ppm dan sampel RK3



Lampiran 5. Perhitungan Penetapan Kadar

Skema Pengenceran Sampel



Penetapan Kadar MK1

Bobot penimbangan sampel = 10,1 mg

No.	Area	Kons (ppm)	Kandungan perolehan kembali (mg)	%kurkumin (%)	SD	%RSD (%)
1	3439521	19,77	1,977	19,57		
2	3513523	20,16	2,016	19,96	0,20	1,0073
3	3463008	19,89	1,989	19,70		
Rata-rata =				19,74		

Penetapan Kadar MK2

Bobot penimbangan sampel = 10,4 mg

No.	Area	Kons (ppm)	Kandungan perolehan kembali (mg)	%kurkumin (%)	SD	%RSD (%)
1	4213753	23,88	2,388	22,96		
2	4090419	23,23	2,323	22,33	0,32	1,4156
3	4132704	23,45	2,345	22,55		
Rata-rata =				22,62		

Penetapan Kadar MK3

Bobot penimbangan sampel = 10,4 mg

No.	Area	Kons (ppm)	Kandungan perolehan kembali (mg)	%kurkumin (%)	SD	%RSD (%)
1	3881789	22,12	2,212	21,27		
2	3837943	21,89	2,189	21,04	0,11	0,5362
3	3866140	22,04	2,204	21,19		
Rata-rata =				21,17		

Penetapan Kadar RK1

Bobot penimbangan sampel = 10,4 mg

No.	Area	Kons (ppm)	Kandungan perolehan kembali (mg)	%kurkumin (%)	SD	%RSD (%)
1	3970699	22,59	2,26	21,72		
2	3845314	21,92	2,19	21,08	0,33	1,5524
3	3939063	22,42	2,24	21,56		
Rata-rata =				21,45		

Penetapan Kadar RK2

Bobot penimbangan sampel = 10,1 mg

No.	Area	Kons (ppm)	Kandungan perolehan kembali (mg)	%kurkumin (%)	SD	%RSD (%)
1	3743094	21,38	2,138	21,17		
2	3858684	22,00	2,200	21,78	0,38	1,7705
3	3877381	22,10	2,210	21,88		
Rata-rata =				21,61		

Penetapan Kadar RK3

Bobot penimbangan sampel = 10,4 mg

No.	Area	Kons (ppm)	Kandungan perolehan kembali (mg)	%kurkumin (%)	SD	%RSD (%)
1	3712716	21,22	2,122	20,40		
2	3830828	21,85	2,185	21,01	0,31	1,5063
3	3745799	21,40	2,140	20,57		
Rata-rata =				20,66		

Contoh perhitungan:

1. Area yang didapatkan dimasukkan ke dalam kurva kalibrasi sebagai y.

$$y = 188242,4599x - 281870,9$$

$$y = 3439521 \rightarrow 3439521 = 188242,4599x - 281870,9 \rightarrow x = 19,77 \text{ ppm}$$

2. Hasil konsentrasi x yang didapatkan merupakan konsentrasi saat sudah diencerkan pada labu ukur 10 mL kedua. Langkah selanjutnya dikonversikan pada labu ukur pertama dengan cara:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$M_1 \times 1 \text{ mL} = 19,77 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \rightarrow M_1 = 197,7 \text{ ppm (pada pipet 1 mL)}$$

Konsentrasi larutan pada pipet 1 mL = konsentrasi pada labu ukur 10 mL

awal yaitu 197,7 ppm = 197,7 mg/1000mL.

3. Dihitung kandungan kurkumin dalam labu ukur 10 mL awal dengan cara perbandingan.

$$\frac{197,7 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{\text{kandungan kurkumin dalam 10 mL awal}}{10 \text{ mL}}$$

$$\text{kandungan kurkumin dalam 10 mL awal} = 1,977 \text{ mg}$$

Kandungan kurkumin pada labu 10 mL awal = kandungan kurkumin pada ekstrak yang ditimbang

4. Dihitung %b/b dengan cara:

$$\%b/b = \frac{\text{kandungan kurkumin pada penimbangan}}{\text{bobot ekstrak yang ditimbang untuk analisis}}$$

$$\% \frac{b}{b} = \frac{1,977 \text{ mg}}{10,1 \text{ mg}} \times 100\% \rightarrow \% \frac{b}{b} = 19,57\%$$

Lampiran 6. Spesifikasi Standar Kurkumin TCI yang digunakan



Specification

07/12/2021(JST)

TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO.,LTD.
4-10-1 Nihonbashi-Honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-0023 Japan

Chemical Name: Curcumin (Synthetic)	
Product Number: C2302	CAS RN: 458-37-7
Tests	Specifications
Appearance	Light yellow to Brown powder to crystal
Purity(HPLC)	min. 95.0 area%
Purity(Neutralization titration)	min. 97.0 %
Melting point	182.0 to 188.0 °C

The contents of the specifications are subject to change without advance notice. The specification values displayed here are the most up to date values. There may be cases where the product labels display a different specification, however, the product quality still meets the latest specification.

Customer Service:

TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD
E-mail: globalbusiness@TCIchemicals.com

Lampiran 7. Analisis Statistik

Results

Independent Samples T-Test

Independent Samples T-Test

	W	df	p
Hasil % Kurkumin	41.000		1.000

Note. Mann-Whitney U test.

Assumption Checks

Test of Normality (Shapiro-Wilk)

		W	p
Hasil % Kurkumin	Remaserasi	0.925	0.431
	Maserasi	0.918	0.378

Note. Significant results suggest a deviation from normality.

Test of Equality of Variances (Levene's)

	F	df	p
Hasil % Kurkumin	4.755	1	0.044

Descriptives

Group Descriptives

Group		N	Mean	SD	SE
Hasil % Kurkumin	Remaserasi	9	21.242	0.531	0.177
	Maserasi	9	21.175	1.259	0.420

Hasil Uji dengan aplikasi JASP 0.14.1.0

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Remaserasi	,170	9	,200*	,925	9	,431
Maserasi	,166	9	,200*	,918	9	,378

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
Hasil Persentase Kurkumin	Equal variances assumed	4,755	,044

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Hasil Persentase Kurkumin	18	21,20851	,937843	19,573	22,964
Metode	18	1,50	,514	1	2

Mann-Whitney Test

Ranks

	Metode	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil Persentase Kurkumin	Remaserasi	9	9,56	86,00
	Maserasi	9	9,44	85,00
	Total	18		

Test Statistics^a

	Hasil Persentase Kurkumin
Mann-Whitney U	40,000
Wilcoxon W	85,000
Z	-,044
Asymp. Sig. (2-tailed)	,965
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^b

a. Grouping Variable: Metode

b. Not corrected for ties.

Hasil Uji dengan aplikasi IBM SPSS Statistics 23