

**Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan Teknik Maserasi dan Remaserasi**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



**Oleh:**

**Shifa Nida'ul Khofiyya**

**NIM 175070507111014**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2021**



**HALAMAN PENGESAHAN**

**TUGAS AKHIR**

**Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan Teknik Maserasi dan Remaserasi**

Oleh :

**Shifa Nida'ul Khofiyya**

**NIM 175070507111014**

Telah diuji pada :

Hari : Senin

Tanggal : 31 Mei 2021

dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji-I,



apt. Uswatun Khasarah, S.Farm., M.Farm.  
NIK. 2011068502181001

Pembimbing-I/Penguji-II,



apt. Bachtiar Rifai P., S.Farm., M.Farm.  
NIP. 198709292019031007

Pembimbing-II/Penguji-III,



apt. Alvan Febrian Shalas, M.Farm  
NIP. 198502182019031007

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,



apt. Alvan Febrian Shalas, M.Farm.  
NIP. 198502182019031007

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Shifa Nida'ul Khofiyya

NIM : 175070507111014

Program Studi : Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Univeristas  
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,



5000  
REPUBLIK INDONESIA  
METERAI  
TEMPEL  
5/D47AJX287514151

Shifa Nida'ul Khofiyya

NIM. 175070507111014

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT, berkat rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Rimpang Temulawak (Curcuma xanthorrhiza) dengan Teknik Maserasi dan Remaserasi 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 temulawak karena 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 temulawak 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, Aspian Noor dan Rini Astuti, yang selalu mengirim doa dan memberikan semangat dukungan baik secara langsung maupun tidak langsung untuk keberhasilan tugas akhir ini dan keberhasilan hidup penulis.
7. Kaka penulis, Dhey'a'an Aulia Putri yang memberikan semangat secara tidak langsung.
8. Saudara-saudara penulis yang selalu bertanya perkembangan kuliah dan mendoakan yang terbaik untuk penulis.
9. Penghuni grup Farmasi B (SO(B)AT (B)ERINTELEQ) 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 KAREPMUWES (Fiina Prasetya Lishshofiati, Era Wiloka, Hafida Fiyan Insani, Mega Utami, dan Tuntun Parwati) yang menjadi tempat bercerita dan memberikan saran dan dukungan kepada penulis.

11. Teman-teman penulis pada tim HPLC (Racha dan Sofia) yang menemani hari-hari penulis selama pandemi COVID-19 dalam pengambilan data dan pengolahan data serta penulisan naskah dan selalu memberikan semangat.

12. Pejuang laboratorium, tim antosianin Mbak Alip dan Nadila yang telah berjuang bersama selama proses tugas akhir berlangsung.

13. 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

Khofiyya, Shifa Nida'ul. 2021. *Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Rimpang Temulawak (Curcuma xanthorrhiza) dengan Teknik Maserasi dan Remaserasi*. 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.

Salah satu metode yang digunakan untuk memisahkan senyawa kurkumin pada Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) adalah dengan ekstraksi. Metode ekstraksi yang banyak digunakan adalah maserasi, namun metode ini memiliki kelemahan yaitu membutuhkan waktu yang cukup lama dalam prosesnya. Untuk mengatasi permasalahan ini dapat dilakukan remaserasi. Untuk mengetahui keefektifan metode ekstraksi yang digunakan, dilakukan penetapan kadar kurkumin menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil penetapan kadar kurkumin pada ekstrak etanol 96% rimpang temulawak yang diekstraksi dengan metode maserasi selama 12 jam dan metode remaserasi dengan pergantian pelarut setiap 3 jam pada total waktu 9 jam. Kondisi HPLC yang digunakan adalah fase gerak asetronitril : asam asetat glasial 1% (pH 2,660) dengan perbandingan 45:55, laju alir 1 mL/menit, suhu kolom 30°C, volume injeksi sampel 20 µL dan waktu running 15 menit. Parameter validasi metode yang dilakukan adalah selektivitas ( $\lambda_{\text{maks}}$  standar dan sampel 427 nm; waktu retensi standar dan sampel  $\pm 12,5$  menit; resolusi sampel  $\pm 1,7$ ), 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%). Kadar kurkumin ekstrak etanol 96% rimpang temulawak pada metode maserasi rata-rata adalah  $6,834 \pm 0,320\%$  (%b/b) sedangkan pada metode remaserasi rata-rata adalah  $6,383 \pm 0,278\%$  (%b/b), dimana hasil uji statistic t tidak berpasangan menunjukkan hasil 0,003 ( $p < 0,05$ ) yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan antara ekstraksi temulawak dengan metode maserasi dan metode remaserasi.

**Kata Kunci:** Kurkumin, Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), Maserasi, Remaserasi, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

## ABSTRACT

Khofiyya, Shifa Nida'ul. 2021. *Determination of Curcumin Content of Rhizome Extract from Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) Using Maceration and Remaceration Method*. 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.

One of the methods used to separate curcumin compounds in *Curcuma xanthorrhiza* rhizome is extraction. The extraction method that is widely used is maceration, but this method has a weakness, that it takes a long time to process. To overcome this problem remaceration can be used. To determine the effectiveness of the extraction method used, curcumin levels were determined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The purpose of this study was to determine the results of curcumin content determination in the 96% ethanol extract of *Curcuma xanthorrhiza* rhizome which was extracted using the maceration method for 12 hours and the remaceration method with solvent changes every 3 hours for a total time of 9 hours. The HPLC conditions used were mobile phase using acetonitrile: glacial acetic acid 1% (pH 2,660) with a ratio of 45:55, flow rate of 1 mL/minute, column temperature 30°C, injection volume 20  $\mu$ L and a running time of 15 minutes. The parameters of the validation method were selectivity ( $\lambda_{\max}$  standard and sample 427 nm; standard and sample retention time  $\pm$  12.5 minutes; sample resolution  $\pm$  1.7), linearity ( $y = 157248.21x - 138875.27$ ;  $r = 0,9999$ ), LOD (0.875 ppm), LOQ (2.653 ppm), accuracy (98.72% -99.57%), and precision (0.54% -1.15%). The curcumin content of 96% ethanol extract from *Curcuma xanthorrhiza* in the maceration method was  $6,834 \pm 0,320\%$  (%w/w) meanwhile in the remaceration method was  $6,383 \pm 0,278\%$  (%w/w), where the t independent test results shows a result of 0.003 ( $p < 0.05$ ), which means that there is a significant difference between the extraction of curcumin content with the maceration method and the remaceration method.

**Keywords:** Curcumin, Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), Maceration, Remaceration, HPLC (High Performance Liquid Chromatography).



DAFTAR ISI

Judul.....	i
Lembar Pengesahan.....	ii
Lembar Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vii
Abstract.....	viii
Daftar Isi.....	ix
Daftar Tabel.....	xiii
Daftar Gambar.....	xiv
Daftar Lampiran.....	xv
Daftar Singkatan.....	xvi
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademik.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>





2.1	Natural Product Sebagai Obat Tradisional.....	6
2.2	Genus Curcuma.....	7
2.3	Curcuma xanthorrhiza (Temulawak).....	8
2.3.1	Morfologi.....	8
2.3.2	Taksonomi.....	9
2.3.3	Kandunga Senyawa Kimia.....	9
2.3.4	Manfaat dan Khasiat.....	10
2.4	Kurkumin.....	10
2.5	Ekstraksi Tanaman.....	13
2.5.1	Maserasi.....	13
2.6	Parameter Ekstraksi.....	15
2.6.1	Jenis Pelarut.....	16
2.6.2	Rasio Pelarut.....	17
2.6.3	Kecepatan Agitasi.....	17
2.6.4	Suhu.....	18
2.6.5	Waktu.....	18
2.7	Parameter Validasi Metode.....	18
2.7.1	Selektivitas.....	19
2.7.2	Linieritas.....	20
2.7.3	Akurasi dan Presisi.....	20
2.7.4	Limit of Detection (LOD).....	21

2.7.5	Limit of Quantification (LOQ) .....	22
2.8	High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	23
2.8.1	Prinsip .....	24
2.8.2	Aplikasi .....	25
2.8.3	Kelebihan .....	25
2.8.4	Kelemahan .....	26
2.8.5	Analisi Kuantitatif .....	26
2.8.6	Kromatografi .....	29
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>		<b>32</b>
3.1	Kerangka Konsep .....	32
3.2	Hipotesis Penelitian .....	34
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN .....</b>		<b>35</b>
4.1	Rancangan Penelitian .....	35
4.2	Populasi dan Sampel .....	35
4.3	Variabel Penelitian .....	35
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian .....	36
4.4.1	Lokasi Penelitian .....	36
4.4.2	Waktu Penelitian .....	36
4.5	Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian .....	36
4.5.1	Bahan Penelitian .....	36
4.5.2	Alat / Instrumen Penelitian .....	36



4.6 Definisi Operasional.....	37
4.7 Prosedur Penelitian.....	38
4.7.1 Ekstraksi Temulawak ( <i>Curcuma xanthorrhiza</i> ) metode Maserasi.....	39
4.7.2 Validasi Metode HPLC.....	39
4.7.3 Kuantifikasi Kurkumin.....	42
4.8 Analisis Data.....	42
4.8.1 Selektivitas.....	42
4.8.2 Linieritas.....	43
4.8.3 Akurasi.....	43
4.8.4 Presisi.....	43
4.8.5 LOD dan LOQ.....	43
4.8.6 Perhitungan Kadar Sampel.....	44
4.8.7 Data Statistik.....	44
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....</b>	<b>45</b>
5.1 Ekstraksi.....	45
5.1.1 Maserasi.....	45
5.1.2 Remaserasi.....	46
5.2 Optimasi Fase Gerak.....	46
5.3 Kondisi Operasional HPLC.....	48
5.3.1 <i>System Suitability Test</i> (SST).....	49
5.4 Validasi Metode.....	51

5.4.1 Uji Selektivitas .....	51
5.4.2 Uji Linieritas .....	56
5.4.3 Uji LOD dan LOQ .....	57
5.4.4 Uji Akurasi dan Presisi .....	57
5.5 Penetapan Kadar .....	58
5.6 Analisis Statistik .....	60
5.6.1 Uji Normalitas .....	60
5.6.2 Uji Homogenitas .....	60
5.6.3 Uji t tidak berpasangan .....	61
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>62</b>
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian .....	62
6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian .....	75
6.3 Keterbatasan Penelitian .....	75
<b>BAB 7 PENUTUP .....</b>	<b>76</b>
7.1 Kesimpulan .....	76
7.2 Saran .....	76
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>77</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>83</b>

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Pelarut yang Digunakan Untuk Senyawa Aktif pada Proses Ekstraksi (Pandey dan Shalini, 2014)..... 17

Tabel 5. 1 %Rendemen Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan Metode Maserasi. .... 45

Tabel 5. 2 %Rendemen Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan Metode Remaserasi. .... 46

Tabel 5. 3 Optimasi Fase Gerak ..... 47

Tabel 5. 4 *System Suitability Test* Larutan Standar Kurkumin 36 ppm..... 50

Tabel 5. 5 Resolusi Sampel Ekstrak Rimpang Temulawak. .... 51

Tabel 5. 6 Waktu Retensi Standar Kurkumin dan Sampel Ekstrak Rimpang Temulawak. .... 52

Tabel 5. 7 Hasil Uji Akurasi Presisi. .... 58

Tabel 5. 8 Kandungan Total Kurkumin pada Ekstrak Etanol 96% Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)..... 59

Tabel 5. 9 Hasil Uji Normalitas Kadar Kurkumin..... 60

Tabel 5. 10 Hasil Uji Homogenitas Kadar Kurkumin..... 61

Tabel 5. 11 Hasil Uji t Tidak Berpasangan pada Kadar Kurkumin..... 61

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Tanaman Temulawak..... 8

Gambar 2. 2 Efek Terapeutik dari Kurkumin..... 11

Gambar 2. 3 Struktur Kurkumin (kurkumin I), Demethoxykurkumin (kurkumin II),  
dan Bis-demethoxykurkumin (kurkumin III)..... 12

Gambar 2. 4 Proses Maserasi (Patel *et al.*, 2019)..... 15

Gambar 2. 5 Estimasi *Limit of Detection* pada Sistem Kromatografi. .... 22

Gambar 2. 6 *Limit of Quantification* pada Sistem Kromatografi. .... 23

Gambar 2. 7 Bagian-Bagian dari HPLC. .... 23

Gambar 2. 8 *Area Under Curve* (AUC) vs Waktu. .... 27

Gambar 3. 1 Kerangka Konsep Penelitian ..... 32

Gambar 4. 1 Prosedur Penelitian..... 38

Gambar 5. 1 Ekstrak Temulawak (a) MT1 (b) MT2 (c) MT3. .... 45

Gambar 5. 2 Ekstrak Temulawak (a) RT1 (b) RT2 (c) RT3. .... 46

Gambar 5. 3 Kromatogram (a) Standar 24 ppm (b) Sampel MT1 (c) Sampel MT2  
(d) Sampel MT3 (e) Sampel RT1 (f) Sampel RT2 (g) Sampel RT3.  
..... 55

Gambar 5. 4 Overlay Spektrum Standar 24 ppm dan Sampel Ekstrak Temulawak.  
..... 55

Gambar 5. 5 Grafik Kurva Baku Larutan Standar Kurkumin (a) tanggal 23/03/2021  
(b) tanggal 24/03/2021..... 57

Gambar 6. 1 Struktur Kurkumin dalam Bentuk Keto dan Enol (Mondal *et al.*, 2016)  
..... 65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Determinasi Tanaman Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) . 83

Lampiran 2. coA Kurkumin TCl..... 84

Lampiran 3. Proses Ekstraksi Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*). .... 85

Lampiran 4. Perhitungan Bobot Susut Ekstrak Rimpang Temulawak..... 87

Lampiran 5. Kromatogram Standar Kurkumin..... 88

Lampiran 6. Kromatogram Sampel Uji Akurasi dan Presisi..... 92

Lampiran 7. Kromatogram Sampel Ekstrak Temulawak..... 95

Lampiran 8. Spektrum Standar Kurkumin. .... 103

Lampiran 9. Spektrum Sampel Ekstrak Temulawak..... 105

Lampiran 10. Grafik Overlay Spektrum Standar dan Sampel Ekstrak Temulawak.  
..... 107

Lampiran 11. Perhitungan % Rendemen. .... 110

Lampiran 12. Perhitungan Linieritas, LOD, dan LOQ. .... 111

Lampiran 13. Perhitungan Kadar Kurkumin. .... 113

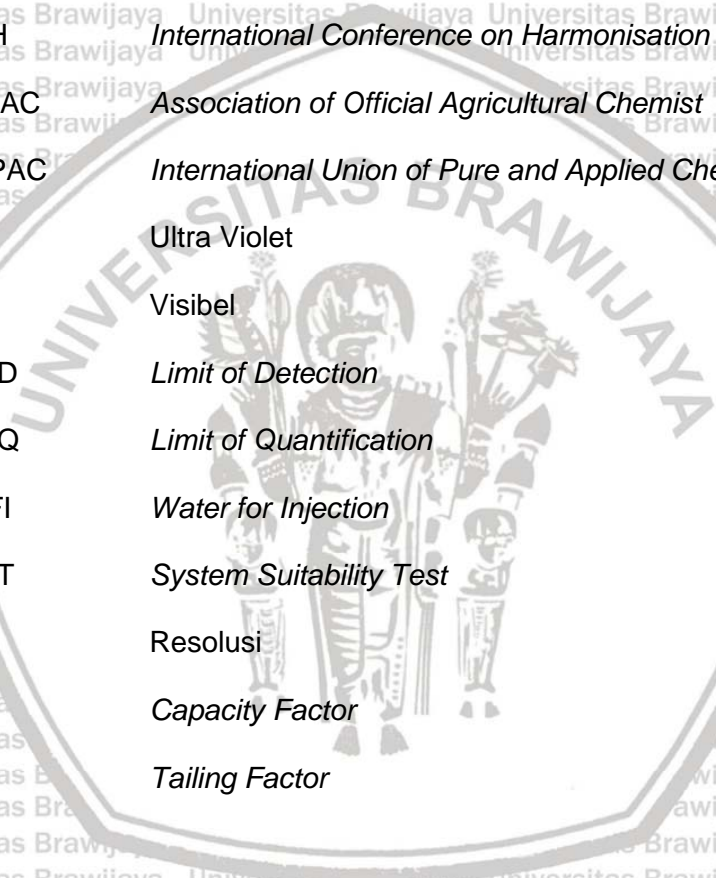
Lampiran 14. Analisis Statistik Kadar Ekstrak Rimpang Temulawak..... 114

Lampiran 15. Analisis Statistik Rendemen Ekstrak Rimpang Temulawak..... 116



**DAFTAR SINGKATAN**

FOHAI	Formularium Obat Herbal Asli Indonesia
FHI	Farmakope Herbal Indonesia
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemist</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
UV	Ultra Violet
Vis	Visibel
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
WFI	<i>Water for Injection</i>
SST	<i>System Suitability Test</i>
Rs	Resolusi
k'	<i>Capacity Factor</i>
T	<i>Tailing Factor</i>





## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Temulawak merupakan tanaman berjenis curcuma yang sering digunakan pada ramuan obat tradisional. Awalnya temulawak hanya digunakan sebagai pewarna, perasa dan pengawet bahan makanan. Namun, seiring berjalannya waktu, temulawak diketahui memiliki khasiat yang beragam seperti sebagai antioksidan, hepatoprotektor, antidislipidemia, antimikroba, antihiperlipidemia, antiinflamasi, hingga menyembuhkan gastritis dan anorexia (Jantan *et al*, 2012; Kim *et al*, 2014; FOHAI, 2016; Akarchariya *et al*, 2017). Bahkan dari 15 spesies curcuma yang ditemukan di Indonesia temulawak merupakan satu-satunya yang digunakan sebagai antiepilepsi. Karena efek terapetiknya yang luas, temulawak banyak digunakan dalam produk obat herbal. Di Indonesia, sebesar 39,65% penduduk menggunakan temulawak sebagai jamu atau obat herbal (Permenkes, 2016) dan dari sekitar 2.031 formula obat tradisional yang ditemukan setidaknya 1.326 formula menggunakan temulawak atau genus curcuma lainnya. Hal ini menyebabkan tingginya permintaan obat yang mengandung temulawak dipasaran (Wahyono dan Dyah, 2019).

Penggunaan temulawak sebagai obat tradisional berhubungan dengan kandungan metabolit sekunder pada tanaman tersebut. Metabolit sekunder ini dapat dijadikan sebagai salah satu cara untuk menjaga kualitas dari obat tradisional yang telah beredar. Pada tanaman temulawak, efek terapeutiknya sangat ditentukan oleh kandungan senyawa kurkuminoid terutama kurkumin.

Pada rimpang temulawak setidaknya harus mengandung kurkuminoid sebanyak

0.8-2% (FOHAI, 2016) atau kurang lebih sebanyak 6,7% (FHI, 2017) terdiri dari kurkumin dan demetoksikurkumin. Penelitian yang dilakukan oleh Rosidi *et al.* (2020), menunjukkan bahwa temulawak yang memiliki kandungan kurkumin yang lebih tinggi memiliki aktifitas antioksidan yang lebih baik. Pramono *et al.* (2018) dan Lee *et al.* (2017) juga menunjukkan hubungan antara kadar kurkumin dengan fungsinya sebagai hepatoprotektor dan antimikroba. Jumlah kurkumin yang terkandung pada temulawak dipengaruhi oleh banyak faktor seperti lingkungan temulawak ditanam, curah hujan, kondisi tanah serta proses pengekstraksiannya (Rosidi *et al.*, 2020).

Ekstraksi adalah langkah awal yang dilakukan untuk memisahkan senyawa bioaktif yang diinginkan dari bahan mentah (Zhang *et al.*, 2018). Metode ekstraksi yang optimal akan memainkan peran penting dalam menentukan kualitas, kuantitas, biaya, dan secara keseluruhan, keefektifan dari standar produk ekstraksi (Paulucci *et al.*, 2012). Metode maserasi merupakan metode yang paling banyak digunakan karena tidak membutuhkan alat dan bahan yang sulit. Metode maserasi juga dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil.

Namun, metode ini membutuhkan pelarut organik dalam jumlah besar dan cukup memakan waktu pada prosesnya. Seperti maserasi selama 24 jam yang dilakukan oleh Amelinda *et al.* (2018) hanya menghasilkan kadar kurkumin sebesar 21,22 mg/g (2,122%). Sedangkan Fauzana (2010) mendapat kurkumin sebesar 6,7% dengan maserasi selama 12 jam. Adapun Rosidi (2016) mendapatkan kurkumin sebesar 27,19% pada maserasi temulawak selama 2 jam. Hal ini menunjukkan bahwa waktu maserasi yang lama belum tentu menghasilkan kadar kurkumin yang optimal. Untuk mengatasi hal ini maka dapat dilakukan remaserasi. Remaserasi merupakan maserasi yang telah dimodifikasi pada pelarutnya, dimana terjadi

pergantian pelarut ditiap waktunya, sehingga proses penarikan senyawa target lebih efektif dibandingkan dengan menambah seluruh pelarut dalam satu waktu (Ningsih *et al.*, 2015). Anggoro *et al.* (2015) yang melakukan remaserasi pada simplisia temulawak sebanyak 3 kali dengan total waktu 3 jam mendapatkan kurkumin sebanyak 2,617% dimana hasil ini tidak berbeda jauh dengan maserasi selama 24 jam yang dilakukan oleh Amelinda *et al.* (2018). Berdasarkan kondisi ini, maka perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh dari teknik ekstraksi terhadap kadar kurkumin pada tanaman temulawak sehingga kedepannya dapat berfokus menggunakan satu teknik yang paling efisien dan menghasilkan kadar kurkumin tertinggi.

Metode untuk menentukan jumlah senyawa target dalam suatu ekstrak telah banyak dikembangkan, seperti dengan kromatografi, electrophoresis, dan spektrofotometri (Erpina *et al.*, 2017). Salah satu metode yang paling baru adalah melakukan kuantifikasi menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Teknik ini banyak digunakan karena kemampuan memisahkan senyawa dan kepekaannya yang tinggi. Dibandingkan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, HPLC dapat memisahkan kurkumin dari bentuk turunan lainnya yaitu demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin dengan baik. Meskipun KLT juga mampu untuk memisahkan kurkumin metode ini masih tidak terlalu sensitif apabila dibandingkan dengan metode kromatografi cair seperti HPLC (Gantait *et al.*, 2011; Dong, 2013; Santoso, 2019). Selain itu, HPLC juga dapat bekerja secara otomatis sehingga dapat memberikan hasil dalam jangka waktu yang cepat (Watson, 2012). Sehingga penetapan kadar kurkumin yang dilakukan pada ekstrak temulawak dalam penelitian ini akan dilakukan menggunakan HPLC.

Oleh karena itu, studi dengan judul “Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan Teknik Maserasi dan Remaserasi” ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan kadar kurkumin yang dihasilkan menggunakan metode maserasi dan remaserasi. Teknik ekstraksi ini dipilih karena merupakan teknik yang paling sesuai dan banyak digunakan, terutama untuk skala kecil maupun skala industri. Nantinya, keberadaan kurkumin dalam sampel setelah diekstraksi akan dikonfirmasi dan dikuantifikasi dengan analisis HPLC yang telah tervalidasi.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ada perbedaan kadar kurkumin yang diekstraksi menggunakan metode maserasi 12 jam dan remaserasi 3 kali selama 9 jam pada rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar kurkumin menggunakan 2 metode ekstraksi yang berbeda yaitu maserasi 12 jam dan remaserasi 3 kali selama 9 jam pada rimpang temulawak.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui kadar kurkumin dari setiap metode ekstraksi rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) menggunakan HPLC.
2. Mengetahui metode ekstraksi mana yang menghasilkan kadar kurkumin tertinggi.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan referensi dalam pengembangan ilmu pengetahuan bagi penelitian-penelitian selanjutnya.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

Diharapkan peneliti dapat menambah pengetahuan, wawasan mengenai metode ekstraksi senyawa kurkumin yang terutama pada tanaman temulawak sehingga nantinya dapat digunakan dalam pekerjaan selanjutnya terutama dalam pemilihan teknik ekstraksi yang paling efisien pada industri obat tradisional.





## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Natural Product* Sebagai Obat Tradisional

*Natural product* Produk alami dapat didefinisikan secara sederhana sebagai bahan kimia apapun yang berasal dari makhluk hidup. Menurut sifatnya, produk alami dapat digunakan untuk berbagai tujuan diantaranya sebagai bahan makanan, bahan pewarna, perasa, pewangi, insektisida, feromon dan sebagainya. Selain itu, produk alami juga bisa dipertimbangkan untuk digunakan sebagai obat tradisional. Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang terdiri dari bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan galenic atau campuran dan bahan-bahan tersebut, yang secara tradisional telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman. Menurut penelitian, obat-obatan tradisional memang bermanfaat bagi kesehatan dan saat ini penggunaannya cukup gencar dilakukan karena lebih mudah dijangkau masyarakat, baik harga maupun ketersediaannya (Halim, 2014).

Penggunaan obat tradisional sendiri memberikan kontribusi yang signifikan terhadap pelayanan kesehatan primer, terutama di negara berkembang (WHO, 2003). Dari 40.000 spesies tanaman obat, sekitar 30.000 spesies tanaman berada di Indonesia. Sementara dari jumlah itu, sekitar 9.600 memiliki khasiat obat dan hanya sekitar 200 spesies yang sudah dimanfaatkan sebagai obat tradisional (Jamal, 2006). Penelitian dan pengembangan obat tradisional difokuskan pada tanaman yang memiliki potensi biologis spesifik. Pemanfaatan tumbuhan sebagai suplemen maupun obat-obatan tergantung pada pengetahuan fitokimia yang ada.

Tiap tanaman memiliki catatan yang luas sebagai sumber obat untuk mengobati

penyakit manusia (Yuan *et al.*, 2016). Beberapa tumbuhan mungkin dapat memberikan efek terapeutik dan dapat dibuktikan jika dievaluasi dengan tepat.

Karena bahan tumbuhan terdiri dari ribuan unsur kimia, ahli kimia memiliki keingintahuan yang kuat untuk menemukan senyawa sebenarnya dalam ekstrak.

Untuk melakukan ini, perlu untuk mengisolasi senyawa murni dari sumber alamnya dan menentukan strukturnya. Namun, ini bukanlah tugas yang mudah, terutama bila senyawa yang diinginkan terdapat dalam konsentrasi rendah.

Biasanya dibutuhkan sejumlah besar bahan mentah untuk mengekstraksi beberapa miligram senyawa yang diinginkan. Oleh karena itu, diperlukan keterampilan dan teknologi tingkat tinggi baik dalam proses ekstraksi maupun dalam penyelidikan selanjutnya untuk menetapkan strukturnya (Halim, 2014).

## 2.2 Genus *Curcuma*

Spesies *Curcuma* dapat ditemukan baik secara liar maupun dibudidayakan di Asia Tenggara. Rimpang spesies ini digunakan secara lokal dalam pengobatan tradisional untuk pengobatan beberapa jenis penyakit. Pada negara tropis *Curcuma* tidak hanya digunakan sebagai obat-obatan tradisional tetapi juga sebagai rempah-rempah, pewarna, makanan, pewangi dan tanaman hias.

Karakteristik dari genus *Curcuma* adalah perrennial, batang bermodifikasi menjadi rimpang (*rhizome*), daun menyirip dengan berligula; bunga biseksual, *zygomorphic*, brecteolus tipis, kelopak tubular, mahkota memanjang dengan warna merah muda hingga ungu. Buah dan biji berbentuk elip. *Curcuma* merupakan spesies yang banyak mengandung minyak esensial pada rimpangnya, sehingga rimpang *Curcuma* banyak dimanfaatkan untuk obat (Syamsuddin *et al.*, 2019).



### 2.3 *Curcuma xanthorrhiza* (Temulawak)



**Gambar 2. 1 Tanaman Temulawak.**

#### 2.3.1 Morfologi

Temulawak merupakan tanaman berbatang semu dengan bunga yang eksotis berwarna putih kemerahan dan memiliki rimpang relatif besar dengan warna irisan rimpang kuning cerah. Temulawak dapat tumbuh di daerah tanah gembur hutan tropis dengan ketinggian 5-1.500 m dpl, tanah kering, perkarangan, ladang, dan padang alang-alang. Tinggi tanaman temulawak dapat mencapai 2 meter. Temulawak memiliki daun 2-9 helai, berwarna hijau, berbentuk bulat memanjang, panjang 31- 84 cm, dan lebar 10-18 cm. Bunga temulawak termasuk tipe majemuk berbentuk bulir, bulat panjang, panjang 9-23 cm, lebar 4-6 cm, perbungaan termasuk tipe exantha (bunga keluar langsung dari rimpang), mahkota bunga berwarna merah, dan bunga mekar pada pagi hari dan pada sore hari layu. Rimpang temulawak merupakan rimpang yang terbesar pada rimpang curcuma. Rimpang temulawak terdiri atas 2 jenis, yaitu rimpang induk (empu) dan rimpang cabang. Rimpang induk berwarna kuning tua, cokelat kemerahan, dan bagian dalamnya berwarna jingga cokelat. Rimpang cabang tumbuh keluar dari

rimpang induk, berukuran lebih kecil, dan memiliki warna lebih muda. Akar temulawak memiliki ujung akar yang melebar (WHO, 1999).

### 2.3.2 Taksonomi

Dalam taksonomi tumbuhan, temulawak dikelompokkan sebagai berikut

(Syamsuddin *et al.*, 2019):

Kingdom : Plantae  
 Divisi : Spermatophyta  
 Sub-divisi : Angiospermae  
 Kelas : Monocotyledonae  
 Ordo : Zingiberales  
 Family : Zingiberaceae  
 Genus : *Curcuma*  
 Spesies : *Curcuma xanthorrhiza* Roxb.

### 2.3.3 Kandunga Senyawa Kimia

Rimpang temulawak mengandung kurkuminoid, mineral minyak atsiri serta minyak lemak. Komponen utama kandungan zat yang terdapat dalam rimpang temulawak adalah zat kuning yang disebut kurkumin dan juga protein, pati, serta zat-zat minyak atsiri. Minyak atsiri temulawak mengandung d-kamfer, sikloisoren, mirsen, p-toluil metikarbinol, pati, d-kamfer, siklo isoren, mirsen, p-toluil metilkarbinol, falandren, borneol, tumerol, xanthorrhizol, sineol, isofuranogermakren, zingiberen, zingeberol, turmeron, artmeron, sabinen,

germakron, dan atlantone. Kandungan kurkumin berkisar antara 1,6%-2,22% dihitung berdasarkan berat kering (Nugroho, 2009).

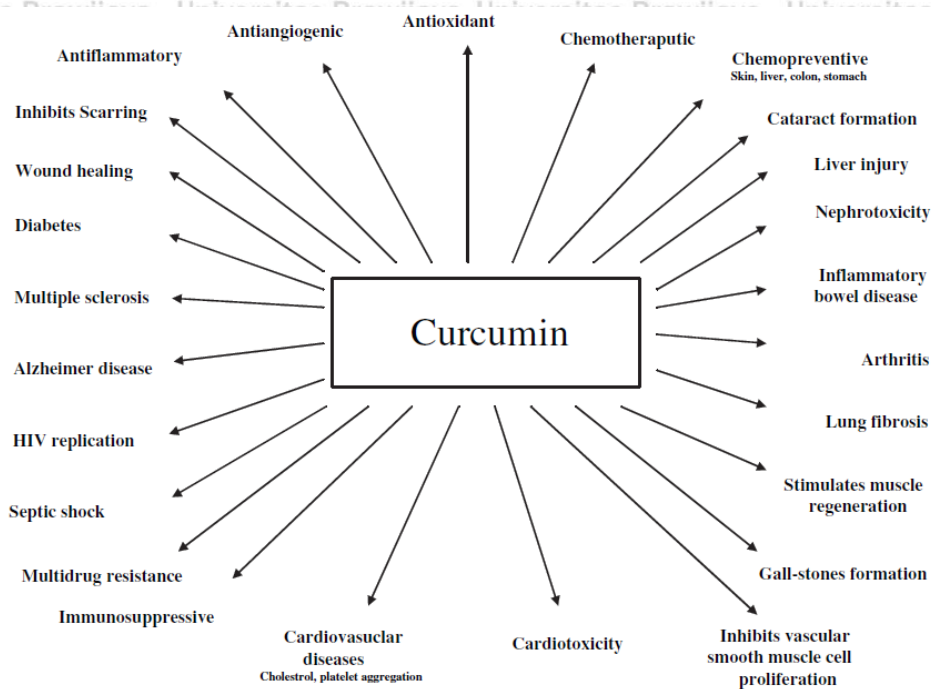
#### **2.3.4 Manfaat dan Khasiat**

Temulawak memiliki banyak aktivitas biologis, terutama karena kurkumin yang dikandungnya. Temulawak banyak digunakan sebagai agen anti-inflamasi dan melindungi hati, dan efek kemopreventif untuk kanker (penghambatan pembentukan tumor, promosi, perkembangan dan penyebaran dalam banyak model hewan) yang bisa ditemui sebagai subjek dari banyak penelitian.

Temulawak juga digunakan untuk gangguan yang berkaitan dengan gangguan pencernaan seperti perut kembung serta dapat digunakan sebagai antibiotic (Ngadino, 2018). Curcumin memiliki aktivitas anti-oksidan dan anti-inflamasi, dan telah diusulkan sebagai pengobatan untuk banyak penyakit degeneratif dengan dasar penyakit inflamasi atau oksidatif, seperti penyakit kardiovaskular, Diabetes Mellitus tipe 2, Arthrosis dan Arthritis. Selain sebagai terapi untuk berbagai macam penyakit temulawak juga biasanya digunakan sebagai rempah pada makanan (Williamson *et al.*, 2009).

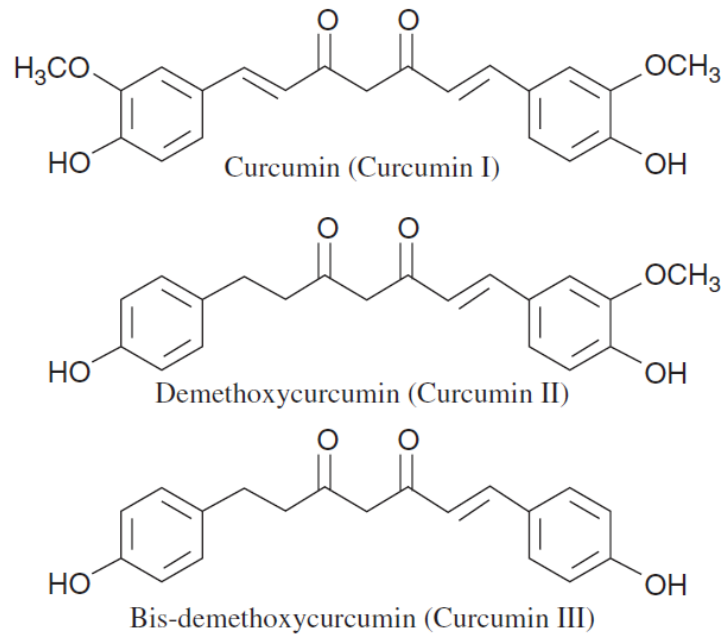
#### **2.4 Kurkumin**

Kurkumin merupakan serbuk berwarna oren kekuningan yang tidak larut dalam air. Kurkumin biasanya digunakan sebagai penyedap makanan, pewarna pada makanan dan pakaian, serta obat untuk berbagai penyakit. Pada pengobatan tradisional kurkumin dipercaya untuk mengobati biliary disorder, anorexia, batuk, ulcus karena diabetes, penyakit hati, rheumatic, dan sinusitis. Bubuk kacang yang dicampur dengan jeruk nipis juga dipercaya sebagai antiinflamasi dan masih banyak lagi khasiat lainnya (Bharat *et al.*, 2006).



**Gambar 2. 2 Efek Terapeutik dari Kurkumin**

Warna kuning yang khas pada temulawak, terutama pada bagian akar, disebabkan oleh adanya kandungan kurkuminoid yang terdiri dari kurkumin (lebih dikenal dengan kurkumin I), demetoksykurkumin (kurkumin II), dan bisdemetoksykurkumin (kurkumin III). Pada kurkumin yang diperjual belikan biasanya mengandung curcumin I (~77%), curcumin II (~17%), and curcumin III (~3%) sebagai bahan utamanya (Bharat *et al.*, 2006).



**Gambar 2. 3 Struktur Kurkumin (kurkumin I), Demethoxykurkumin (kurkumin II), dan Bis-demethoxykurkumin (kurkumin III).**

Kurkumin pertama kali diisolasi pada tahun 1815, dan dikenal dengan nama 1,6-heptadiene-3,5-dione-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-(1E,6E) atau diferuloylmethane. Kurkumin bersifat tidak larut dalam air dan ether, namun larut pada ethanol, dimethylsulfoxide, dan acetone. Senyawa dengan bentuk molekul  $C_{21}H_{20}O_6$  ini memiliki berat molekul sebesar 368,37 g/mol dengan titik leleh  $183^{\circ}C$  dan bersifat sensitive terhadap cahaya. Kurkumin akan berwarna oren kekuningan pada pH 2,5 – 7 dan berubah menjadi warna merah apabila berada pada pH > 7.

Secara spektrofotometri, kurkumin memiliki nilai absorpsi maksimal pada panjang gelombang 430 nm, dengan rentang Beer's Law dari 0,5 – 5  $\mu g/mL$ . Namun memiliki nilai absorpsi maksimal pada 415-420 nm pada pelarut acetone. Fluorescence dari kurkumin muncul pada panjang gelombang yang cukup luas seperti pada acetonitrile ( $\lambda_{max} = 524 \text{ nm}$ ), ethanol ( $\lambda_{max} = 549 \text{ nm}$ ), atau larutan

micellar ( $\lambda_{\max} = 557 \text{ nm}$ ), dan pada toluene ( $\lambda_{\max} = 460, 488 \text{ nm}$ ) (Bharat *et al.*, 2006).

## 2.5 Ekstraksi Tanaman

Ekstraksi merupakan langkah pertama untuk memisahkan senyawa sekunder yang diinginkan dari tanaman. Metode ekstraksi konvensional, termasuk maserasi, perkolasi dan ekstraksi refluks, Beberapa metode ekstraksi modern atau lebih ramah lingkungan terdiri dari ekstraksi fluida super kritis (SFC), ekstraksi cairan bertekanan (PLE) dan ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro (MAE), diadopsi untuk mengekstraksi komponen yang diinginkan dari produk alami.

Prinsip dari ekstraksi meliputi beberapa proses yaitu: (1) Pelarut teradsorpsi ke dalam permukaan sampel; (2) Difusi pelarut ke dalam sampel kemudian analit larut dalam pelarut; (3) Analit berdifusi keluar ke permukaan sampel; (4) Analit dikumpulkan untuk dilakukan uji. Tujuan dari ekstraksi adalah untuk mendapatkan jumlah metabolit sekunder yang diinginkan secara maksimal. Pada analisis kuantitatif, sangat penting untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang lengkap dari analit target dengan tetap menjaga profil original dan distribusi (Patel *et al.*, 2019).

### 2.5.1 Maserasi

Merupakan metode ekstraksi yang sangat sederhana. Maserasi adalah metode ekstraksi isokratik dan metode ekstraksi dingin. Metode ini melibatkan ekstraksi bahan penyusun dari tumbuhan dalam pelarut dengan cara merendam sampel tumbuhan dalam pelarut tertentu. Kekurangan dari metode ini yaitu membutuhkan waktu ekstraksi yang lama dan efisiensi ekstraksi yang kecil.

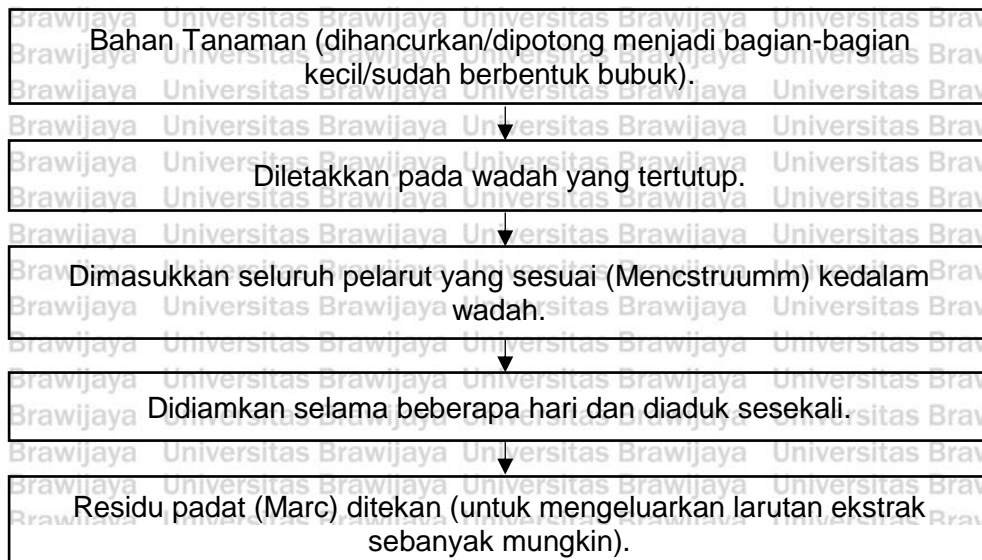
Kelebihan ekstraksi ini adalah alat dan cara yang digunakan sangat sederhana dan dapat digunakan untuk analit baik yang tahan terhadap pemanasan maupun yang tidak tahan terhadap pemanasan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Zhang

*et al.* (2018) menyatakan bahwa maserasi dengan suhu rendah pada buah *Arbutus unedo* L. memiliki hasil ekstraksi yang identic dengan *Microwave-assisted extraction* (MAE) sehingga dapat menurunkan biaya operasional. Bahkan berdasarkan perhitungan kadar total polyphenol pada ekstraksi *Cajanus cajan* menggunakan maserasi dan *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE) ditemukan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan.

Adapun prosedur dari ekstraksi maserasi yaitu: LANGKAH 1: Bahan tanaman yang dihancurkan dan dikeringkan atau bubuk kasar dicelupkan ke dalam pelarut yang sesuai yang disebut menstruum dalam wadah tertutup dan didiamkan selama 4-6 hari dalam keadaan stabil penuh pada suhu kamar dengan sesekali agitasi dan buka tutup sesekali untuk melepaskan tekanan yang terbentuk dan kocok bahan tanaman hingga larut. LANGKAH 2: Bahan padat lembab disaring menggunakan corong dengan sumbat kapas dan kemudian marc ditekan untuk mengeluarkan sebanyak mungkin pelarut yang tersumbat. Sediakan waktu yang cukup untuk koagulasi, kemudian materi yang mengendap disaring menggunakan kertas saring. LANGKAH 3: Ekstrak yang dihasilkan kemudian dipekatkan di bawah tekanan tereduksi untuk mendapatkan ekstrak mentah tanaman.

LANGKAH 4: ekstrak mentah digunakan untuk analisis lebih lanjut. Berikut

Gambar yang menunjukkan alur proses maserasi (Patel *et al.*, 2019):



Bersihkan larutan hasil ekstraksi dengan penyaring.

Dilakukan Penguapan dan Pemekatan ekstrak.

**Gambar 2. 4 Proses Maserasi (Patel et al., 2019).**

Karena sistem tidak bergerak selama proses maserasi, ekstraksi bekerja berdasarkan prinsip difusi molekuler dimana proses ini memakan banyak waktu dan menyebabkan terjadinya akumulasi larutan pekat di sekitar permukaan partikel. Selain itu, proses menggunakan wadah yang tertutup juga harus digunakan untuk menghindari penguapan pelarut pada proses maserasi. Pelarut yang digunakan untuk maserasi yaitu methanol, methanol-air atau pelarut organik lainnya. Adapun jenis-jenis dari maserasi, yaitu (Patel et al., 2019):

- Maserasi Sederhana: maserasi sederhana pada dasarnya digunakan untuk obat-obatan mentah yang terorganisir dan tidak terorganisir. (Misalnya tingtur jeruk, lemon, dan squill).

*Double Maceration*: Digunakan untuk infus konsentrat jeruk.

*Triple Maceration*: Proses maserasi dapat dilakukan dengan bantuan pemanasan atau pengadukan (Misalnya infus terkonsentrasi Quassia dan Senna).

## 2.6 Parameter Ekstraksi

Variasi dalam metode ekstraksi yang dapat mempengaruhi kuantitas dari metabolit sekunder yang diekstraksi dapat disebut sebagai parameter ekstraksi.

Hal-hal yang mempengaruhi kuantitas metabolit sekunder yang dihasilkan



diantaranya jenis metode ekstraksi yang digunakan, lama ekstraksi, temperature, jenis pelarut, konsentrasi pelarut, dan polaritas (Pandey dan Shalini, 2014).

### 2.6.1 Jenis Pelarut

Pemilihan dari pelarut memiliki peran yang krusial dalam ekstraksi.

Berdasarkan *Law of Similarity and Intermiscibility (like dissolve like)*, pelarut yang memiliki kepolaran dari zat yang terlarut akan memiliki hasil ekstraksi yang lebih baik. Alcohol (EtOH dan MeOH) merupakan pelarut universal yang biasanya digunakan untuk mengekstraksi senyawa fitokimia. Untuk pengambilan senyawa aktif yang sesuai sangat penting untuk menentukan pelarut yang tepat. Karena pemilihan pelarut yang tidak tepat akan mempengaruhi: (1) kuantitas dari metabolit sekunder yang diekstraksi, (2) Laju ekstraksi, (3) keanekaragaman senyawa yang terekstraksi, (4) keanekaragaman penghalang dari senyawa yang diekstraksi, (5) Kemudahan penanganan ekstrak selanjutnya, (6) toksisitas dari pelarut pada proses bioassay, dan (7) Bahaya kesehatan potensial dari hasil ekstrak (Pandey dan Shalini, 2014).

Pemilihan pelarut dipengaruhi oleh tujuan bahan diekstraksi. Karena produk akhir akan mengandung sisa-sisa pelarut, pelarut harus tidak beracun dan tidak mengganggu dengan bioassay tersebut. Pelarut yang baik adalah pelarut yang: (1) memiliki toksisitas yang rendah, (2) mudah menguap meski dengan suhu yang rendah, (3) memiliki penyerapan fisiologis cepat dari ekstrak, (4) memiliki sifat sebagai pengawet, dan (5) tidak menyebabkan ekstrak menjadi kompleks atau terpisah. Untuk memilih pelarut perlu mempertimbangkan senyawa target yang akan diekstraksi seperti yang terlihat pada tabel 2.1 karena akan dibutuhkan pelarut yang berbeda untuk senyawa metabolit yang berbeda (Pandey dan Shalini, 2014).

**Tabel 2. 1 Pelarut yang Digunakan Untuk Senyawa Aktif pada Proses Ekstraksi (Pandey dan Shalini, 2014).**

Water	Ethanol	Methanol	Chloroform	Ether	Acetone
Anthocyanins	Tannins	Anthocyanins	Terpenoids	Alkaloids	Phenol
Starches	Polyphenols	Terpenoids	Flavonoids	Terpenoids	Flavonols
Tannins	Polyacetylenes	Saponins		Coumarins	
Saponins	Flavonols	Tannins		Fatty acids	
Terpenoids	Terpenoids	Xanthoxyllines			
Polypeptides	Sterols	Totarol			
Lectins	Alkaloids	Quassinoids			
		Lactones			
		Flavones			
		Phenones			
		Polyphenols			

### 2.6.2 Rasio Pelarut

Jika rasio pelarut dengan bahan baku besar maka akan memperbesar pula jumlah senyawa yang terlarut. Akibatnya laju ekstraksi akan semakin meningkat.

Akan tetapi semakin banyak pelarut, proses ekstraksi juga menjadi semakin mahal. Pada suatu penelitian dilaporkan bahwa rasio pelarut terhadap sampel 10:1 (v/b) merupakan rasio ideal (Arief, 2012).

### 2.6.3 Kecepatan Agitasi

Dalam pemisahan yang menggunakan pengadukan, waktu kontak dapat dibuat lebih cepat untuk mencapai keseimbangan sehingga secara ekonomi efisiensi dapat mencapai 80-90%. Semakin cepat putaran pengadukan maka akan menaikkan turbulensi (tumbukan) sehingga kontak antara padatan dengan pelarut semakin sering terjadi menyebabkan koefisien transfer massa semakin besar (Artati dan Fadilah, 2007). Namun pengadukan yang terlalu cepat juga dapat menaikkan suhu dan merusak bahan yang akan diekstrak. Sehingga kecepatan pengadukan hendaknya disesuaikan dengan komponen bahan yang akan diekstraksi.

#### 2.6.4 Suhu

Suhu memiliki pengaruh yang besar pada ekstraksi. Tingkat dan hasil ekstraksi yang sangat tinggi biasanya berbanding lurus dengan suhu. Salah satu alasannya adalah peningkatan proses perpindahan massa dengan suhu yang rekatif tinggi akan memicu kenaikan eksponensial dari tekanan uap pada senyawa ekstrak. Temperatur yang lebih tinggi (viskositas pelarut lebih rendah, kelarutan solute lebih besar) pada umumnya menguntungkan pada proses ekstraksi.

Namun, temperatur ekstraksi tidak boleh melebihi titik didih pelarut karena akan menyebabkan pelarut menguap. Biasanya temperatur ekstraksi yang paling baik adalah sedikit di bawah titik didih pelarut. Kelarutan bahan yang diekstraksi akan meningkat dengan suhu untuk memberikan tingkat ekstraksi yang lebih tinggi, dimana koefisien difusi akan meningkat dengan kenaikan suhu sehingga akan meningkatkan laju ekstraksi (Arief, 2012).

#### 2.6.5 Waktu

Menurut Marina *et al.* (2013), waktu dan tekanan juga akan mempengaruhi proses ekstraksi. Umumnya, pada proses ekstraksi semakin lama waktu proses semakin optimal hasil yang didapat. Hal ini dapat terjadi karena semakin banyak komponen bahan yang dapat terlarut pada pelarut. Namun pada waktu yang terlalu lama proses ekstraksi tidak lagi berjalan karena pelarut sudah berada pada kondisi jenuh dan dapat menyebabkan beberapa komponen rusak akibat reaksi lain yang terjadi.

#### 2.7 Parameter Validasi Metode

*The International Conference on Harmonisation (ICH)* telah menjelaskan beberapa istilah untuk menentukan bagaimana kualitas suatu pengujian dapat dikontrol. Prosedur analitik memberikan gambaran yang tepat tentang bagaimana

suatu metode analisis dilakukan. Metode lengkap harus menjelaskan hal-hal sebagai berikut:

- Kualitas dan sumber standar acuan untuk senyawa yang dianalisis.
- Prosedur yang digunakan untuk menyiapkan larutan standar sesuai referensi.
- Kualitas reagen atau pelarut yang digunakan dalam pengujian dan metode pembuatannya.
- Prosedur dan pengaturan yang digunakan untuk pengoperasian peralatan apa pun yang diperlukan dalam pengujian
- Metodologi yang digunakan untuk kalibrasi assay dan metodologi yang digunakan untuk pemrosesan sampel sebelum analisis.

(Watson, 2012).

### 2.7.1 Selektivitas

Selektivitas merupakan metode yang mengukur seberapa mampu metode tersebut mengukur analit saja dengan adanya senyawa lain yang terkandung dalam sampel. Metode analitik yang paling selektif biasanya akan melibatkan pemisahan menggunakan kromatografi. Sebagai contoh perbandingan antara spektrofotometri fluorescence dengan Spektrofotometri UV. Ada lebih banyak senyawa yang menunjukkan serapan UV daripada yang menunjukkan serapan fluoresensi yang kuat, maka spektrofotometri fluorescence merupakan metode yang lebih selektif. Karena metode yang selektif didasarkan pada prinsip yang lebih kompleks daripada metode non-selektif, metode tersebut mungkin kurang kuat, misalnya spektrofotometri fluoresensi lebih dipengaruhi oleh perubahan metode analitik dari pada spektrofotometri UV (Watson, 2012).

### 2.7.2 Linieritas

Kebanyakan metode analisis merupakan metode yang menghasilkan sebuah respon yang linier, dimana peningkatan atau penurunan linieritas akan sebanding dengan konsentrasi analit. Persamaan yang digunakan akan berbentuk sebagai berikut:

$$y = a + bx$$

Dimana  $a$  merupakan intercept dari garis lurus dengan  $y$  axis dan  $b$  merupakan slope dari garis. Pengukuran kualitas dari garis dinyatakan dengan koefisien korelasi atau dilambangkan dengan  $r$ . dimana nilai  $r$  ini harus  $> 0.99$  untuk dinyatakan bahwa garis yang didapatkan adalah linier (Watson, 2012).

### 2.7.3 Akurasi dan Presisi

Menurut ICH presisi didefinisikan sebagai ketepatan prosedur analitik untuk mengungkapkan kedekatan antara serangkaian pengukuran yang diperoleh dari beberapa pengambilan sampel dari sampel homogen yang sama di bawah kondisi yang ditentukan. Ketepatan prosedur analitik biasanya dinyatakan sebagai varians, deviasi standar, atau koefisien variasi dari serangkaian pengukuran. Namun, pada umumnya tidak ada guideline yang menyatakan seberapa bagus presisi dari suatu senyawa aktif, biasanya presisi hanya dinyatakan harus bernilai  $< \pm 1,0\%$  untuk dinyatakan baik. Berdasarkan ICH Guideline, presisi dapat dinyatakan dalam 3 level: *repeatability*, intermediate presisi dan *reproducibility*.

Suatu metode dapat menghasilkan nilai presisi yang baik namun belum tentu akurat. Penentuan akurasi pada suatu metode uji pada suatu obat yang tidak diformulasikan relative langsung. Metode yang paling mudah untuk untuk

menentukan akurasi yaitu dengan membandingkan senyawa yang dianalisis dengan senyawa standar. Akurasi harus dilaporkan menggunakan nilai persen recovery yang merupakan nilai banyaknya jumlah analit yang ditambahkan ke dalam sampel atau perbedaan antara jumlah analit yang diketahui dengan jumlah analit yang dihitung menggunakan analisis. Secara International, terdapat 3 cara yang dapat digunakan untuk menentukan akurasi dari suatu metode analisis, yaitu dengan (a) bahan rujukan baku (*SRM/Standart Reference Material*), (b) baku pembandingan (*standard method*), dan (c) recovery dengan analit placebo (*spiked placebo recovery*) (Synder, 1997). Secara umum, dibutuhkan minimal 5 penentuan, pada 80, 100, dan 120% dari label untuk produk obat untuk menentukan akurasi.

#### 2.7.4 *Limit of Detection (LOD)*

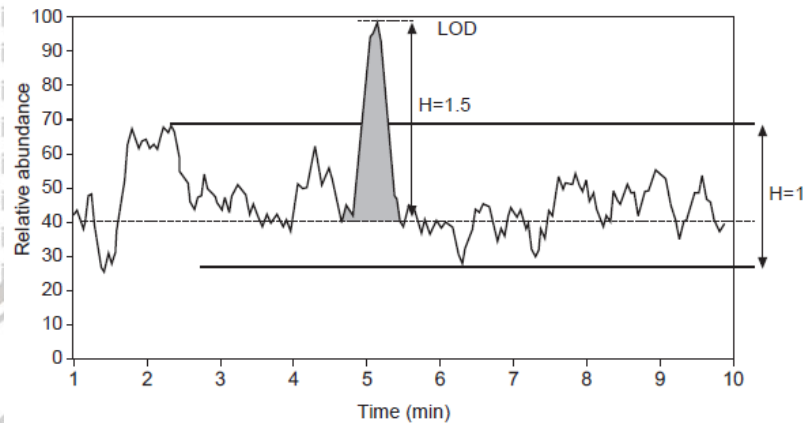
*Limit of Detection* didefinisikan sebagai jumlah analit terkecil yang dapat dideteksi oleh suatu metode analisis. Secara umum digambarkan dengan persamaan sebagai berikut:

$$x - x_B = 3s_B$$

Dimana  $x$  merupakan sinyal dari sampel,  $x_B$  merupakan sinyal dari blank dan  $s_B$  merupakan standar deviasi yang terbaca dari blank. Sebuah limit of detection yang nyata harus menggambarkan keseluruhan an proses, dimana analit dalam pengujian nyata dikenakan dan bukan merupakan pengenceran sederhana dari standar murni untuk analit sampai tidak lagi dapat dideteksi.

Pada kasus kromatografi pemisahan, biasanya terdapat background konstan yang dinamakan baseline. Berdasarkan dari EP limit of detection dimana tinggi dari peak kromatografik bernilai 3 kali tinggi dari fluktuasi baseline noise

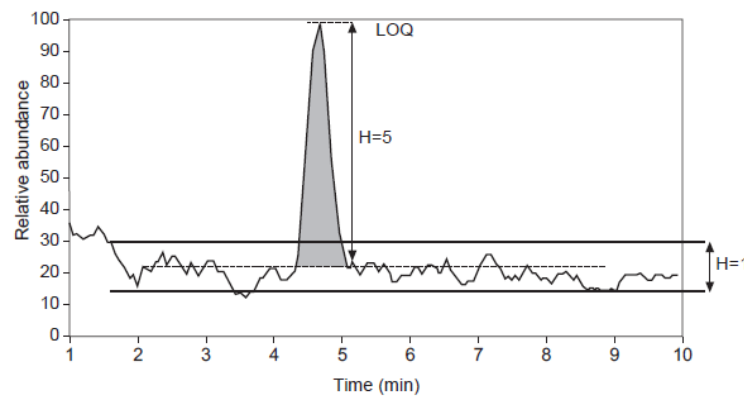
pada jarak sama dengan 20 kali lebar peak pada setengah tinggi. Biasanya LOD ini akan dihitung secara otomatis pada software, namun dapat juga dihitung secara manual seperti gambar dibawah, dimana LOD menunjukkan  $2H/h < 3$ .



**Gambar 2. 5 Estimasi *Limit of Detection* pada Sistem Kromatografi.**

### 2.7.5 *Limit of Quantification (LOQ)*

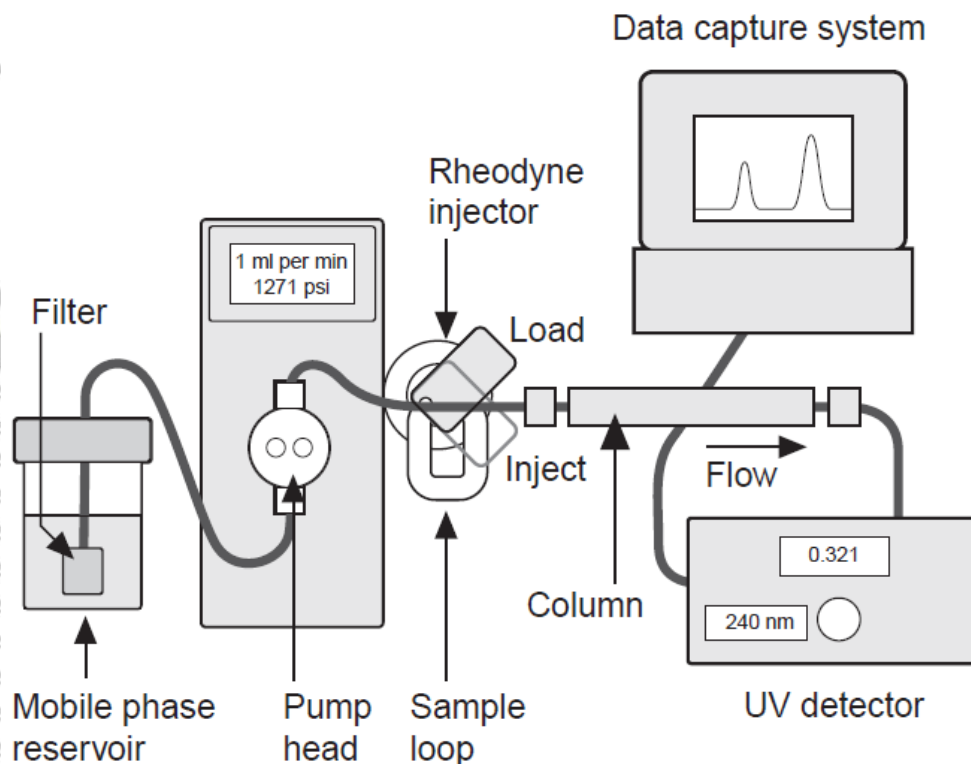
LOQ didefinisikan sebagai jumlah analit terkecil yang dapat dikuantifikasi, misalnya dengan RSD untuk pengulangan pengukuran bernilai  $< \pm 20\%$ . Limit of quantification dapat didefinisikan sebagai  $x - x_B = 10s_B$ . Pada kasus ini, analit harus berada pada puncak lebih dari 10 kali standar deviasi dari baseline kromatografi pada saat dilakukan analisis (Watson, 2012).



**Gambar 2. 6 Limit of Quantification pada Sistem Kromatografi.**

## 2.8 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) adalah teknik yang paling umum digunakan untuk penghitungan obat dalam formulasi. Uji farmakope masih sangat bergantung pada spektroskopi UV langsung tetapi, dalam industri, deteksi dengan spektrofotometri UV biasanya dikombinasikan dengan pemisahan pendahuluan dengan HPLC. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)/HPLC merupakan bentuk kromatografi kolom yang memompa campuran sampel atau analit dalam suatu pelarut (dikenal sebagai fase gerak) pada tekanan tinggi melalui kolom kromatografi dengan bahan kemasan (fase diam) (Watson, 2012).



**Gambar 2. 7 Bagian-Bagian dari HPLC.**

Bagian-bagian dari HPLC sendiri terdiri dari sebagai berikut (Watson, 2012):



- Reservoir pelarut.

- Pompa yang mampu memompa pelarut hingga tekanan 4000 psi dan dengan aliran hingga 10 ml/menit.

- Injektor loop, yang dapat dilengkapi dengan loop volume tetap antara 1 dan 200 ml (20 ml sering digunakan sebagai standar).

- Kolom, yang biasanya berupa tabung baja tahan karat yang dikemas, biasanya, dengan silika gel berlapis oktadekilsilan (lapis ODS) dengan diameter partikel rata-rata (3,5 atau 10 mm).

- Detektor, yang biasanya merupakan detektor UV/visibel, meskipun untuk aplikasi khusus tersedia berbagai macam detector.

- Sistem pengambilan data, yang dapat berupa integrator komputasi atau PC dengan perangkat lunak yang sesuai untuk memproses data kromatografi.

- Kolom dihubungkan ke injektor dan detektor dengan pipa berdiameter internal sempit, ca 0,2 mm, untuk meminimalkan 'volume mati', yaitu ruang kosong dalam sistem di mana kromatografi tidak terjadi dan pelebaran pita dapat terjadi dengan longitudinal difusi.

- Instrumen yang lebih maju mungkin memiliki injeksi sampel otomatis dan oven kolom dan mampu mencampur dua atau lebih pelarut dalam proporsi yang berbeda-beda seiring waktu untuk menghasilkan gradien fase gerak.

### 2.8.1 Prinsip

Fase gerak cair dipompa di bawah tekanan melalui kolom baja tahan karat yang mengandung partikel fase diam dengan diameter 3–10 mm (1,7 mm) dalam HPLC. Analit dibebani ke kepala kolom melalui *loop valve* dan pemisahan campuran terjadi sesuai dengan lamanya waktu relatif yang dihabiskan oleh komponennya dalam fase diam. Perlu dicatat bahwa semua komponen dalam

campuran menghabiskan waktu yang kurang lebih sama dalam fase gerak untuk keluar dari kolom. Pemantauan limbah kolom dapat dilakukan dengan berbagai detector (Watson, 2012).

### 2.8.2 Aplikasi

- Kombinasi kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) dengan pemantauan oleh deteksi UV/visibel memberikan metode yang akurat, tepat dan kuat untuk analisis kuantitatif produk farmasi dan merupakan metode standar industri untuk tujuan ini.
- Pemantauan stabilitas zat obat murni dan obat dalam formulasi, dengan kuantitasi produk degradasi apapun.
- Pengukuran obat dan metabolitnya dalam cairan biologis.
- Penentuan koefisien partisi dan nilai pKa obat dan pengikatan protein obat.
- Untuk memurnikan produk sintetis atau alami.
- Untuk mengkarakterisasi metabolit.
- Untuk menguji bahan aktif, kotoran, produk degradasi dan dalam uji disolusi.
- Dalam studi farmakodinamik dan farmakokinetik.

(Moffat *et al.*, 2011; Watson, 2012).

### 2.8.3 Kelebihan

- Pengenalan sampel yang mudah dikontrol dan tepat memastikan presisi kuantitatif.
- HPLC adalah teknik kromatografi yang mengalami perkembangan paling intensif dalam beberapa tahun terakhir, menghasilkan perbaikan kolom, detektor, dan kontrol perangkat lunak.

- Variasi kolom dan detektor berarti bahwa selektivitas metode dapat segera disesuaikan.

- Dibandingkan dengan kromatografi gas (GC), risiko degradasi sampel lebih kecil karena pemanasan tidak diperlukan dalam proses kromatografi.

- Mudah dan bekerja secara otomatis dan sangat cepat.

(Watson, 2012).

#### 2.8.4 Kelemahan

- Masih ada persyaratan untuk detektor yaitu hanya dapat memantau senyawa yang memiliki kromofor.

- Obat harus diekstraksi dari formulasinya sebelum dianalisis.

- Limbah pelarut organik yang dihasilkan dalam jumlah besar, sehingga biaya pembuangannya cenderung mahal.

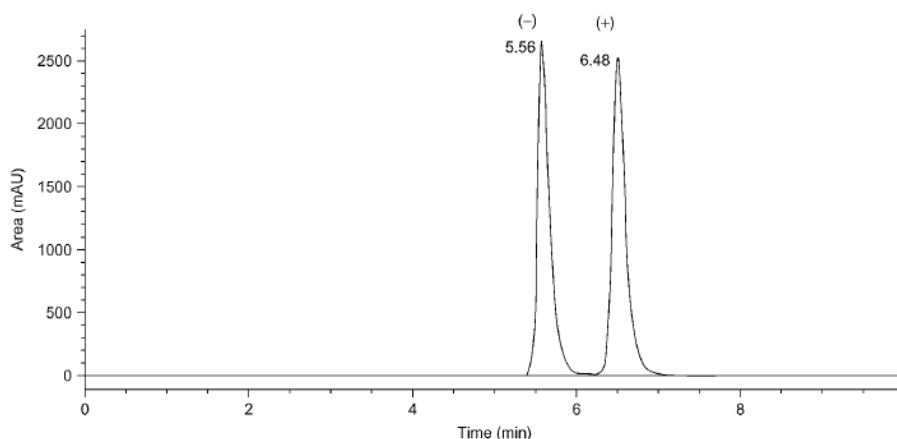
(Watson, 2012)

#### 2.8.5 Analisa Kuantitatif

Metode penghitungan yang tergabung dalam HPLC sebagian besar berasal dari metode GC. Teori dasar untuk kuantifikasi melibatkan pengukuran

ketinggian puncak atau luas puncak. Untuk puncak yang terbentuk dengan baik,

tinggi puncak dan luas puncak sebanding dengan konsentrasi.



**Gambar 2. 8 Area Under Curve (AUC) vs Waktu.**

Terdapat tiga metode kalibrasi berbeda, masing-masing memiliki kelebihan dan kelemahannya masing-masing, dapat digunakan dalam analisis kuantitatif: (1) standar eksternal, (2) standar internal, dan (3) metode penambahan standar (Adisi) (Moffat *et al.*, 2011).

a. Standar Eksternal

Metode standar eksternal adalah metode yang paling sederhana dari ketiga metode. Akurasi metode ini bergantung pada reproduktifitas injeksi volume sampel. Untuk melakukan metode ini, larutan standar dengan konsentrasi senyawa yang diketahui dibuat. Jumlah tetap, yang konsentrasinya sama dengan sampel yang tidak diketahui, disuntikkan.

Tinggi puncak atau area dibandingkan konsentrasi untuk setiap senyawa.

Perbandingan harus linier dan melewati awalnya. Konsentrasi yang tidak diketahui kemudian ditentukan menurut persamaan berikut.

$$\text{Konsentrasi}_{\text{tidak diketahui}} = \frac{\text{Area}_{\text{tidak diketahui}}}{\text{Area}_{\text{diketahui}}} \times \text{Konsentrasi}_{\text{diketahui}}$$

Konsentrasi kalibrator harus mencakup kisaran konsentrasi yang mungkin dalam sampel yang tidak diketahui. Hanya pembacaan

konsentrasi dalam tingkat kalibrasi tertinggi dan terendah yang dapat diterima. Konsentrasi yang dibaca dari garis regresi yang diekstrapolasi mungkin tidak akurat. Ini berlaku untuk semua metode penghitungan (Moffat *et al.*, 2011).

#### b. Standar Internal

Meskipun setiap metode efektif, namun metode standar internal cenderung memberikan hasil yang paling akurat dan tepat. Dalam metode ini, jumlah yang sama dari standar internal, komponen yang tidak ada dalam sampel, ditambahkan ke sampel dan larutan standar. Standar internal yang dipilih harus secara kimiawi mirip dengan analit, memiliki waktu retensi yang mendekati analit dan derivasi dengan cara yang mirip dengan analit. Untuk sampel biologis, standar internal harus mengekstrak serupa dengan analit tanpa bias yang signifikan terhadap standar internal atau analit. Selain itu, penting untuk memastikan bahwa standar internal stabil dan tidak mengganggu komponen sampel mana pun. Standar internal harus ditambahkan sebelum persiapan sampel sehingga efisiensi ekstraksi dapat dievaluasi. Kuantifikasi dicapai dengan menggunakan rasio tinggi puncak atau luas komponen dengan standar internal seperti persamaan berikut (Moffat *et al.*, 2011).

$Konsentrasi_{\text{tidak diketahui}}$

$$= \left( \frac{Area_{\text{internal standar diketahui}}}{Area_{\text{internal standar tidak diketahui}}} \right)$$

$$\times \left( \frac{Area_{\text{tidak diketahui}}}{Area_{\text{diketahui}}} \right) Konsentrasi_{\text{diketahui}}$$

### c. Metode Penambahan Standar (Adisi)

Metode ketiga untuk kuantifikasi adalah penambahan standar (adisi).

Metode ini sangat berguna ketika ada masalah dengan interferensi dari matriks sampel, karena metode ini dapat menghilangkan efek-efek ini.

Untuk melakukan penghitungan ini, sampel dibagi menjadi dua bagian, sehingga sejumlah analit yang diketahui (spike) dapat ditambahkan ke satu bagian. Kedua sampel ini, yang asli dan yang asli-plus-spike, kemudian dianalisis. Sampel dengan lonjakan menunjukkan respons analitik yang lebih besar daripada sampel asli karena jumlah analit tambahan yang ditambahkan ke sampel tersebut. Perbedaan respon analitik antara sampel berduri dan tidak berduri dihasilkan dari jumlah analit dalam lonjakan tersebut. Ini memberikan titik kalibrasi untuk menentukan konsentrasi analit dalam sampel asli. Metode ini memiliki kelemahan jika hanya sejumlah kecil sampel yang tersedia. Persamaan yang digunakan adalah sebagai berikut (Moffat *et al.*, 2011).

$$Jumlah_{tidak\ diketahui} = \frac{Area_{unspike}}{Area_{spike} \cdot Area_{unspike}} \times Jumlah_{spike}$$

### 2.8.6 Kromatografi

Kromatografi dapat dideskripsikan dan diukur menggunakan 4 konsep secara besar yaitu, kapasitas (*capacity*), efisiensi, selektivitas, dan resolusi.

Kapasitas dan selektivitas dari kolom merupakan variabel yang dikontrol oleh produsen secara garis besar, sedangkan efisiensi dan resolusi dapat dikontrol oleh praktikan. Keempat parameter ini harus dioptimasi untuk meminimalkan *band broadening* (pelebaran puncak sampel saat melalui sistem HPLC) (Weston dan Phyllis, 1997).

### 2.8.6.1 Capacity Factor

Sebuah kolom harus mempunyai kekuatan menahan sampel dan memisahkan komponen sampel yang baik untuk menghasilkan pemisahan yang efektif. *Capacity factor* atau yang biasanya dilambangkan dengan  $k'$  merupakan pengukuran kekuatan dari interaksi sampel terhadap fase diam secara langsung. *Capacity factor* umumnya menggambarkan seberapa baik fungsi bahan dari fase diam dalam sebuah kolom, namun hal ini masih bisa di manipulasi dengan berbagai variasi kekuatan fase gerak. Semakin tinggi nilai dari *Capacity factor* maka semakin baik suatu kolom untuk menahan sampel. Menggunakan kolom dengan nilai *Capacity factor* yang tinggi biasanya juga dapat meningkatkan resolusi pemisahan sampel (Weston dan Phyllis, 1997).

### 2.8.6.2 Selektivitas

Selektivitas dari suatu sistem kromatografi dapat dilihat melalui waktu retensi (atau volume) antara 2 peak. Waktu retensi merupakan waktu antara sampel yang diinjeksikan dengan peak maksimum (Dong, 2006). Selektivitas dapat dideskripsikan sebagai seberapa efektif sistem kromatografi tersebut dalam memisahkan dua senyawa. Selektivitas biasanya menggambarkan fungsi bahan fase diam dan dilambangkan dengan  $\alpha$ . Salah satu cara untuk meningkatkan nilai selektivitas adalah dengan mengganti komposisi dari fase gerak (Weston dan Phyllis, 1997).

### 2.8.6.3 Resolusi

Resolusi mendeskripsikan derajat pemisahan dari suatu senyawa yang bersebelahan atau puncak (*peak*). Nilai ini dipengaruhi oleh selektivitas ( $\alpha$ ), efisiensi ( $N$ ) dan *capacity factor* ( $k'$ ) dari kolom. Cara paling efektif untuk mengubah nilai resolusi dengan mengubah selektivitas atau *capacity factor* dari kolom. Meningkatkan efisiensi dari kolom dengan cara meningkatkan panjang kolom atau kecepatan *flow-rate* biasanya tidak menghasilkan perbedaan yang signifikan. Sedangkan melipat gandakan nilai *theoretical plate* dengan menambah kolom kedua hanya meningkatkan nilai resolusi sebanyak 1,4 kali (Weston dan Phyllis, 1997).

### 2.8.6.4 Efisiensi

Efisiensi dari kolom merupakan nilai yang menggambarkan *peak broadening* sebagai fungsi dari retensi, dideskripsikan sebagai nilai *theoretical plate* dan dilambangkan sebagai  $N$ . *Theoretical plate* berdasarkan teori Plate digambarkan sebagai kolom kromatografi yang terdiri dari beberapa bagian tipis atau "plate" dimana masing-masing zat terlarut akan mencapai keseimbangan antara fase gerak dan fase diam. Semakin besar nilai  $N$  maka kolom akan dianggap semakin efisien. Efisiensi dapat berubah dengan mengganti parameter fisik kolom seperti panjang, diameter dan bahan yang digunakan untuk membuat kolom. Sedangkan secara parameter kimia yaitu ukuran partikel bahan yang digunakan atau mengubah kecepatan fase gerak dapat mengubah nilai efisiensi kolom (Weston dan Phyllis, 1997).

### 2.8.6.5 Tailing Factor

Pada umumnya, *peak* yang terbentuk pada kromatografi tidak akan berbentuk asimetris namun bisa terdapat *fronting* atau *tailing*. *Peak tailing* atau



yang biasanya dilambangkan sebagai  $T$  dapat disebabkan oleh adsorpsi atau pelebaran pita pada kolom ekstra. Sedangkan, *peak fronting* biasanya dapat disebabkan oleh *overloading* kolom atau reaksi kimia antara analit selama eluasi.

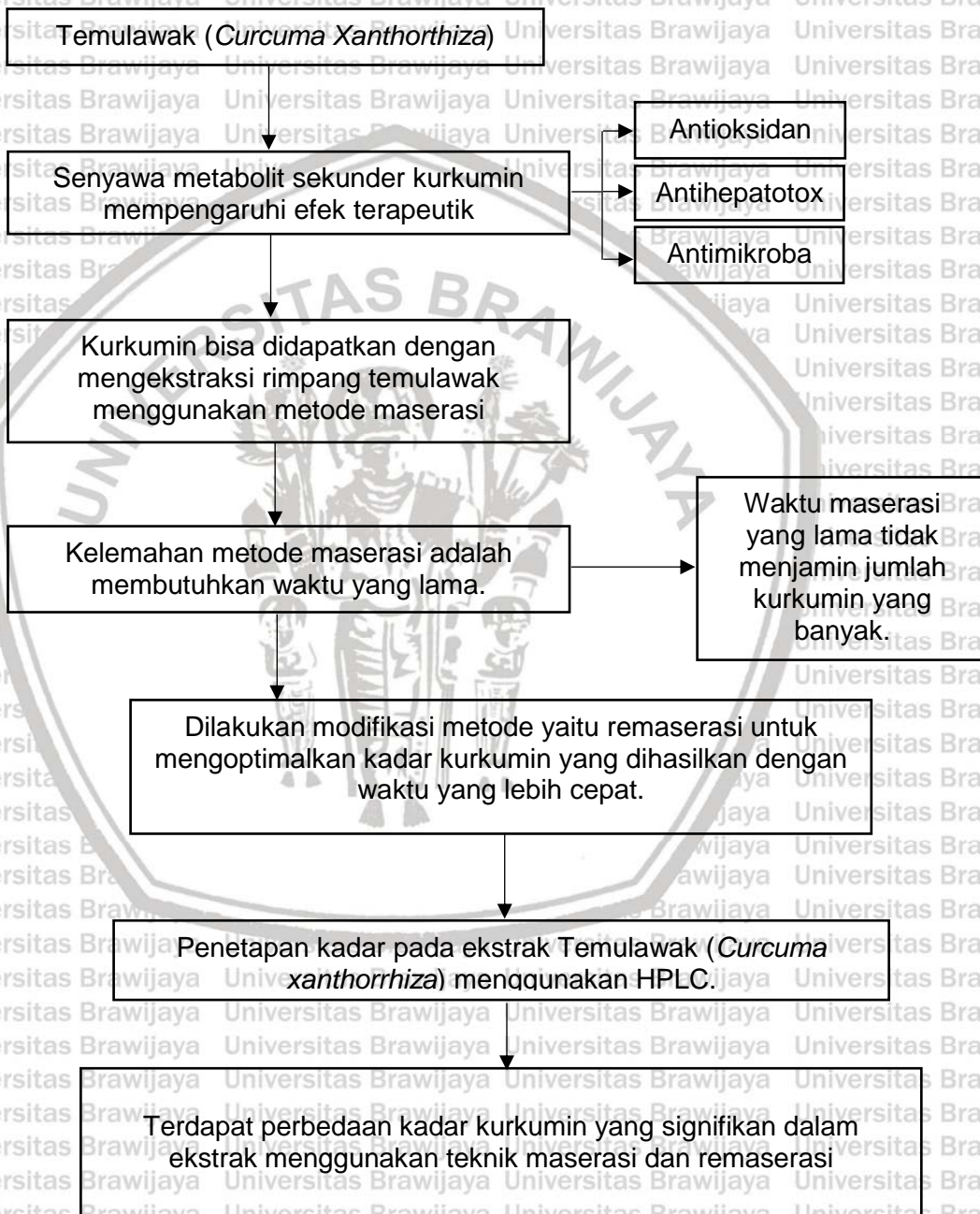
Contohnya, banyak sekali analit dasar seperti amina yang menghasilkan peak dengan *tailing* karena adanya interaksi polar dengan residu dari asam silanol yang berasal dari kolom berbahan dasar silika.



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3. 1 Kerangka Konsep Penelitian

Temulawak merupakan tanaman bergenus *curcuma* yang sering digunakan pada ramuan obat tradisional. Temulawak diketahui memiliki khasiat yang beragam seperti sebagai antioksidan, antihepatotoksik, antidiabetes, antimikroba, antitumor, serta antikanker (Halim, 2014). Di Indonesia sendiri, temulawak digunakan secara luas pada formulasi obat tradisional, yaitu kurang lebih sebanyak 1.326 formula digunakan untuk menyembuhkan 71 gejala penyakit. Hal ini menyebabkan tingginya permintaan obat yang mengandung temulawak dipasaran (Wahyono dan Dyah, 2019). Khasiat dari tanaman temulawak sendiri sangat ditentukan oleh kandungan senyawa kurkuminoid terutama kurkumin. Ekstraksi adalah langkah awal yang dilakukan untuk memisahkan senyawa marker yang diinginkan dari bahan mentah (Zhang *et al.*, 2018). Metode seperti maserasi merupakan metode yang paling banyak digunakan karena tidak membutuhkan alat dan bahan yang sulit. Namun metode ini cukup memakan waktu dan membutuhkan pelarut organik dalam jumlah besar. Untuk mengatasi hal ini dapat dilakukan remaserasi, dimana remaserasi merupakan metode maserasi yang telah dimodifikasi agar dapat dihasilkan ekstrak yang lebih optimal. Ekstraksi menggunakan remaserasi akan terjadi pergantian pelarut ditiap waktunya, dimana proses ini lebih efektif untuk menarik senyawa target dibandingkan dengan menambah seluruh pelarut dalam satu waktu. Diharapkan saat melakukan proses remaserasi akan didapatkan kadar kurkumin yang lebih optimal dengan waktu yang lebih cepat (Ningsih *et al.*, 2015). Oleh karena itu, diperlukan adanya penelitian untuk mengetahui pengaruh dari teknik ekstraksi sehingga bisa didapatkan ekstrak kurkumin yang optimal. Setelah itu, kuantifikasi kurkumin akan dilakukan menggunakan HPLC yang telah tervalidasi.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah:

1. Terdapat perbedaan kadar kurkumin yang signifikan dalam ekstrak menggunakan teknik maserasi 12 jam dan remaserasi 3 kali selama 9 jam.



## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan mengikuti jenis penelitian observasional dan eksperimental. Desain penelitian observasional dengan rancangan deskriptif digunakan untuk menjelaskan hasil validasi metode analisis dari HPLC, karena tidak dilakukan perlakuan pada sample dan hanya menggambarkan data yang diperoleh. Sedangkan rancangan penelitian eksperimental digunakan untuk menentukan pengaruh dari maserasi dan remaserasi terhadap total kadar kurkumin pada ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan lama waktu yang berbeda.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan adalah simplisia rimpang temulawak yang terdapat di Kota Batu. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia rimpang temulawak yang diperoleh dari Batu Material Medica (BMM), terletak di Jalan Lahor No. 87 Batu di Desa Pesanggrahan yang letak lokasinya berbatasan dengan Kelurahan Ngaglik di wilayah Kota Batu.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini terdiri dari:

- Variabel bebas: teknik ekstraksi (maserasi dan remaserasi)
- Variabel terikat: total kadar kurkumin

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Program Studi

Farmasi Universitas Brawijaya.

##### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2021 - Juni 2021.

#### 4.5 Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

##### 4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah baku standar kurkumin

TCI (*Tokyo Chemical Industry*) (kemurnian > 97%), simplisia rimpang temulawak

(*Curcuma xanthorrhiza*) yang diperoleh dari Batu Material Medica (BMM) yang

terletak di Jalan Lahor No. 87 Batu, *Methanol for liquid chromatography*

LiChrosolv®, *Water for Injection* (WFI) IKA Pharmindo, *Acetonitrile gradient grade*

*for liquid chromatography* LiChrosolv® Reag. Ph Eur.

##### 4.5.2 Alat / Instrumen Penelitian

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). Pemisahan kromatografi

dilakukan dengan kolom Shim-pack VP-ODS (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Diikuti

komputer Lenovo yang telah terinstal software Labsolution. Membrane Filter Nylon

Axiva dengan ukuran pori 0,45 mikrometer (diameter 47 mm) dan 0,2 mikrometer

(diameter 25 mm), Neraca Analitik Ohaus® PX224, Rotary Evaporator IKA RV 10

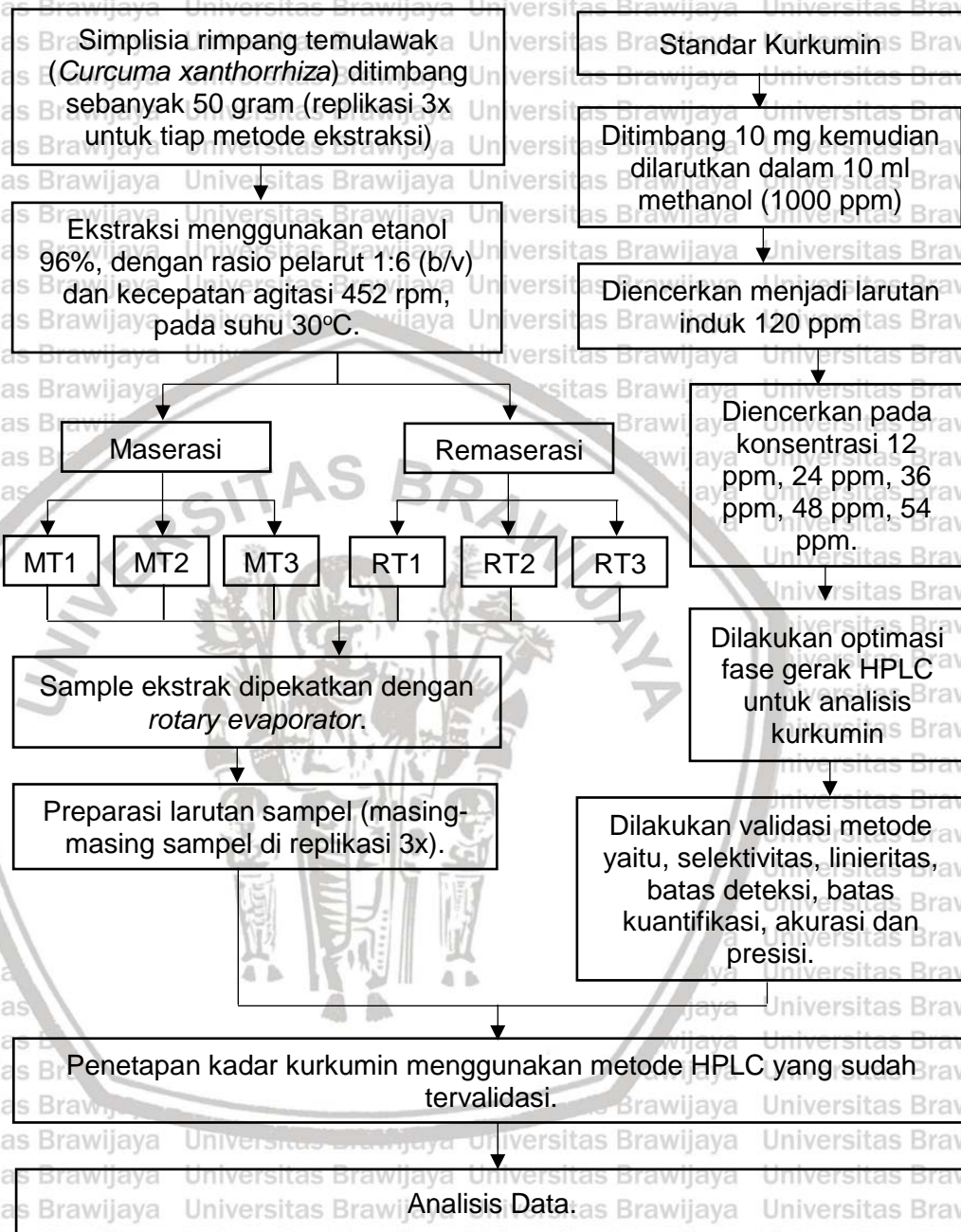
Basic, Corong Buchner Biobase, pH meter HM-30R TOADKK, Pipet Volume

Pyrex®, Labu Ukur Pyrex®, Gelas Ukur Pyrex®, beaker glass Pyrex®.

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Maserasi merupakan salah satu jenis ekstraksi padat cair sederhana yang dilakukan dengan cara merendam sampel sambil diaduk sesekali untuk mempercepat proses pelarutan analit pada suhu tertentu menggunakan pelarut yang sesuai sehingga dapat melarutkan analit dalam sampel.
2. HPLC adalah kepanjangan dari *High Performance Liquid Chromatography* dengan merk Shimadzu dan kolom Reverse phase dengan panjang 150 mm dan diameter 4,6 mm.
3. Standar kurkumin diperoleh dari Jepang dengan nilai kemurnian > 97%, pelarut untuk fase gerak merupakan Acetonitrile dan Metanol adalah gradient grade for liquid chromatography merk LiChrosolv® Reag. Ph Eur.
4. Ekstrak rimpang temulawak yang digunakan adalah ekstrak yang diperoleh dari pengekstrasian di lab farmasi Universitas Brawijaya menggunakan metode maserasi dan remaserasi dengan simplisia yang diperoleh dari Batu Materia Medika (BMM).

#### 4.7 Prosedur Penelitian



**Gambar 4. 1** Prosedur Penelitian.

Keterangan: MT1=Maserasi Temulawak 1; MT2=Maserasi Temulawak 2; MT3=Maserasi Temulawak 3; RT1=Remaserasi Temulawak 1; RT2=Remaserasi Temulawak 2; RT3=Remaserasi Temulawak 3.



#### 4.7.1 Ekstraksi Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) metode Maserasi

1. Simplisia temulawak diayak menggunakan ayakan dengan no. Mesh 18.
2. Masing-masing sampel temulawak ditimbang sebanyak 50 g (dilakukan penimbangan sebanyak 6 kali).
3. Simplisia kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebanyak 300 ml dengan variasi waktu yaitu:
  - Metode A: dilakukan perendaman selama 12 jam.
  - Metode B: dilakukan remaserasi 3 kali dengan total 9 jam.
4. Proses ekstraksi dilakukan dalam *beaker glass* yang ditutupi dengan alumunium foil pada suhu ruang dan pengadukan menggunakan stirer dilakukan selama kurang lebih 1 jam dengan kecepatan 452 rpm.
5. Larutan ekstrak kemudian disaring, filtrat dipisahkan dan disimpan pada wadah tertutup dan terhindar dari sinar matahari langsung.
6. Kemudian dilakukan penguapan pelarut dari filtrat yang didapatkan menggunakan rotary evaporator (suhu = 40°C, kecepatan = 25 rpm) dan menggunakan oven (suhu = 40°C).
7. Dihitung %Rendemen dari hasil maserasi dengan rumus berikut.

$$\%Rendemen = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

#### 4.7.2 Validasi Metode HPLC

##### 4.7.2.1 Kondisi Operasional HPLC

1. Dilakukan pembuatan fase gerak yang terdiri dari Acetonitrile pro HPLC : Asam Asetat Glisial 1% dalam WFI (45 : 55) (pH = 2,660).
2. Lakukan pengecekan pH fase gerak menggunakan pH meter.
3. Saring fase gerak menggunakan corong Buchner dengan membrane filter 0,45 µm.

4. Masukkan fase gerak kedalam botol HPLC kemudian masukkan selang HPLC.
5. Melakukan cuci kolom menggunakan metanol pro HPLC selama 30 menit.
6. Dilakukan purging menggunakan fase gerak selama 30 menit.
7. Dilakukan baseline check selama 15 menit menggunakan fase gerak *flow rate* yang digunakan adalah 1 mL/menit, volume injeksi sebesar 20  $\mu$ L dan dimonitor pada panjang gelombang 428 nm untuk kuantifikasi dari kurkumin.

#### 4.7.2.2 Preparasi Larutan Baku dan Larutan Sampel

1. Larutan induk kurkumin dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm (ditimbang  $\pm$  10 mg kurkumin standar dilarutkan ke dalam labu ukur 10 ml menggunakan methanol pro HPLC).
2. Dibuat larutan induk kurkumin dalam konsentrasi 120 ppm (mengambil 3 ml dari larutan 1000 ppm kemudian di ad ke dalam labu 25 ml menggunakan methanol pro HPLC).
3. Dibuat larutan baku kerja dengan mengambil 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, dan 5 ml dari larutan induk 120 ppm kemudian di ad dalam labu ukur 10 ml dengan metanol pro HPLC untuk mendapatkan larutan baku 12 ppm, 24 ppm, 36 ppm, 48 ppm, dan 60 ppm.
4. Sampel ekstrak temulawak masing-masing ditimbang  $\pm$  10 mg kemudian dilarutkan dengan 10 ml methanol pro HPLC.
5. Kemudian dari masing-masing larutan induk sampel diambil 3 ml dan diad ke dalam labu ukur 10 ml (dilakukan replikasi 3 kali untuk masing-masing larutan sampel).

6. Larutan sampel kemudian disaring menggunakan filter berukuran pori 0,2  $\mu\text{m}$  kemudian dimasukkan ke dalam vial autosampler HPLC.
7. Larutan sampel hanya bisa bertahan selama 24 jam pada suhu ruang 25°C.

#### 4.7.2.3 Uji Selektivitas

1. Larutan standar dan sampel diinjeksikan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  ke HPLC.
2. Dilakukan pengamatan terhadap waktu retensi, *peak area*, *capacity factor*, *peak tailing factor*, dan *theoretical plate number* antara larutan baku dan larutan sampel.
3. Untuk resolusi harus bernilai  $> 1,5$ .

#### 4.7.2.4 Uji Linieritas

1. Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  larutan baku kurkumin dengan konsentrasi pada konsentrasi 12 ppm, 24 ppm, 36 ppm, 48 ppm, dan 54 ppm diinjeksikan pada sistem HPLC.
2. Diamati luas area pada masing-masing konsentrasi.
3. Persamaan kurva baku ditetapkan menggunakan area yang diamati pada software Labsolution kemudian dicari nilai koefisien korelasi ( $r$ )  $> 0,99$  (AOAC, 2002).

#### 4.7.2.5 Penentuan Akurasi dan Presisi

1. Akurasi dan dilakukan dengan menambahkan standar pada 3 level konsentrasi yang berbeda yaitu 24 ppm, 30 ppm, dan 36 ppm (80%, 100%, 120%) ke dalam sampel (dilakukan 3 kali penginjeksian pada setiap larutan sampel kurkumin).
2. Presisi dilakukan secara *inter-day* dengan menginjeksikan 3 replikasi sampel pada 1 hari yang sama.
3. Diamati luas area pada masing-masing sample yang dilakukan.

4. Luas area yang didapatkan, dimasukkan kembali ke dalam persamaan linear yang telah dipilih pada uji linieritas.

5. Hitung perolehan %Recovery dan %RSD dengan syarat %Recovery pada rentang 92-105% dan  $\leq 2\%$ .

#### 4.7.2.6 LOD dan LOQ

1. Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  larutan baku kurkumin dengan konsentrasi 12 ppm, 24 ppm, 36 ppm, 48 ppm, dan 60 diinjeksikan pada sistem HPLC.

2. Diamati luas area pada masing-masing konsentrasi.

3. Dihitung nilai LOD dan LOQ.

#### 4.7.3 Kuantifikasi Kurkumin

1. Delapan belas larutan sampel (9 larutan dari metode ekstraksi A; 9 larutan dari metode B) diinjeksikan sebanyak 20  $\mu\text{L}$ .

2. Diamati luas area pada masing-masing sampel kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier.

3. Kemudian dihitung kadar kurkumin dalam sampel.

### 4.8 Analisis Data

#### 4.8.1 Selektivitas

Selektivitas ditentukan dengan parameter resolusi ( $R_s$ ) (AOAC, 2002).

Rumus perhitungan resolusi.

$$\text{resolusi } (R_s) = \frac{(tR1 - tR2)}{\frac{1}{2} (W1 + W2)}$$

Keterangan:

$R_s$  = resolusi

$tR1$  = waktu retensi puncak analit pertama

$tR2$  = waktu retensi puncak analit kedua

W1 = lebar dasar puncak pertama

W2 = lebar dasar puncak kedua

#### 4.8.2 Liniertitas

Liniertitas dinyatakan dengan koefisien korelasi ( $r$ ) yang didapatkan dari persamaan regresi  $y=bx+a$ . ( $b$ ) merupakan nilai slope dari persamaan dan ( $a$ ) merupakan nilai intersep dari persamaan. Persamaan regresi didapatkan dari hasil plot konsentrasi larutan baku kurkumin terhadap luas area (AUC) pada kromatogram.

#### 4.8.3 Akurasi

Akurasi dinyatakan dalam persen perolehan kembali (%Recovery). Rumus menghitung %Recovery:

$$\%Recovery = \frac{\text{konsentrasi terukur}}{\text{konsentrasi sebenarnya}} \times 100\%$$

#### 4.8.4 Presisi

Presisi dihitung dalam persen sebagai simpangan deviasi relative (RSD) atau koefisien variasi (KV). Rumus perhitungan KV:

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

#### 4.8.5 LOD dan LOQ

Penentuan LOD dan LOQ dapat dilakukan melalui penghitungan rumus sebagai berikut (Ihsan *et al.*, 2018):

$$LOD = \frac{3.3 \times \text{Simpangan baku } y (Sy)}{\text{slope (b)}}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \text{Simpangan baku } y (Sy)}{\text{slope (b)}}$$

#### 4.8.6 Perhitungan Kadar Sampel

Kadar sampel dapat diketahui dengan memasukkan nilai luas area ke dalam rumus persamaan linier  $y=bx+a$ . Rumus perhitungan kadar sampel yaitu:

$$\text{kadar sampel (\%)} = \frac{\text{konsentrasi terukur} \times \text{fp (faktor pengencer)}}{\text{bobot ekstrak (mg)}} \times 100\%$$

#### 4.8.7 Data Statistik

##### 4.8.7.1 Uji Normalitas

Uji normalitas digunakan untuk mengetahui apakah suatu variable terdistribusi normal atau tidak sehingga dapat ditentukan uji statistik yang akan digunakan. Pada penelitian ini digunakan tes Shapiro-Wilk karena jumlah sampel yang digunakan  $\leq 50$  dengan nilai kemaknaan 95% yang artinya data dinyatakan terdistribusi normal apabila nilai signifikansi ( $p$ )  $> 0,05$ .

##### 4.8.7.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui apakah data bersifat homogen artinya apakah dua atau lebih kelompok data mempunyai varians yang sama atau tidak. Pada penelitian ini digunakan *Levene's test* dengan nilai kemaknaan 95% yang artinya data dinyatakan homogen apabila nilai signifikansi ( $p$ )  $> 0,05$ .

##### 4.8.7.3 Uji t Tidak Berpasangan

Digunakan untuk membandingkan rata-rata data dari 2 kelompok tidak berpasangan dimana pada penelitian ini digunakan untuk mengetahui perbandingan antara kadar kurkumin dari ekstrak temulawak dengan teknik ekstraksi yang berbeda. Pada penelitian ini digunakan nilai kemaknaan 95% yang artinya data dinyatakan berbeda signifikan apabila nilai signifikansi ( $p$ )  $< 0,05$ .

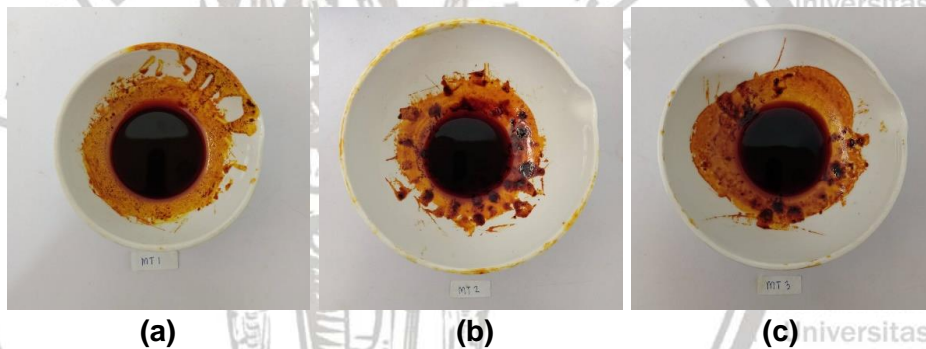
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Ekstraksi

5.1.1 Maserasi

Bentuk ekstrak yang didapatkan pada maserasi simplisia rimpang temulawak berwarna kuning kecokelatan gelap dengan bau yang khas serta berbentuk kental. Hasil persentase rendemen ekstrak rimpang temulawak yang didapatkan sudah tercantum pada Tabel 5.1 (Perhitungan terlampir pada lampiran 9).



Gambar 5. 1 Ekstrak Temulawak (a) MT1 (b) MT2 (c) MT3.

Keterangan: (a) Maserasi Temulawak 1 (b) Maserasi Temulawak 2 (c) Maserasi Temulawak 3

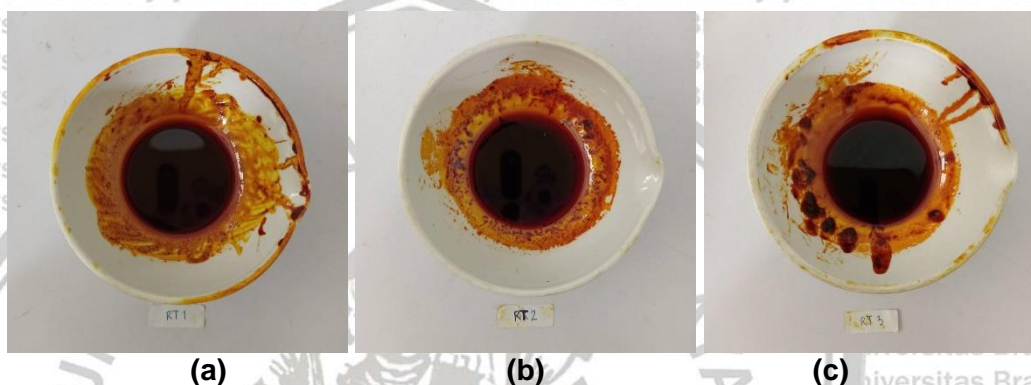
Tabel 5. 1 Persentase Rendemen Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan Metode Maserasi.

Sampel (n = 3)	Massa Sampel (g)	Massa Konstan Ekstrak (g)	Persentase Rendemen (%)	$\bar{x}$ (%)
MT1	50,0015	3,0858	6,17	
MT2	50,0009	2,8672	5,73	5,88±0,251
MT3	50,0011	2,8870	5,74	

Keterangan: MT1=Maserasi Temulawak 1; MT2=Maserasi Temulawak 2; MT3=Maserasi Temulawak 3

### 5.1.2 Remaserasi

Bentuk ekstrak yang didapatkan pada remaserasi simplisia rimpang temulawak berwarna kuning kecokelatan gelap dengan bau yang khas serta berbentuk kental. Hasil persentase rendemen ekstrak rimpang temulawak yang didapatkan sudah tercantum pada Tabel 5.2 (Perhitungan terlampir pada lampiran 9).



**Gambar 5. 2 Ekstrak Temulawak (a) RT1 (b) RT2 (c) RT3.**

Keterangan: (a) Remaserasi Temulawak 1 (b) Remaserasi Temulawak 2 (c) Remaserasi Temulawak 3

**Tabel 5. 2 Persentase Rendemen Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan Metode Remaserasi.**

Sampel (n = 3)	Massa Sampel (g)	Massa Konstan Ekstrak (g)	Persentase Rendemen (%)	$\bar{x}$ (%)
RT1	50,0008	2,9235	5,85	6,03±0,295
RT2	50,0015	2,9351	5,87	
RT3	50,0003	3,1851	6,37	

Keterangan: RT1=Remaserasi Temulawak 1; RT2=Remaserasi Temulawak 2; RT3=Remaserasi Temulawak 3

### 5.2 Optimasi Fase Gerak

Hasil optimasi fase gerak yang telah dilakukan terlampir pada Tabel 5.3.

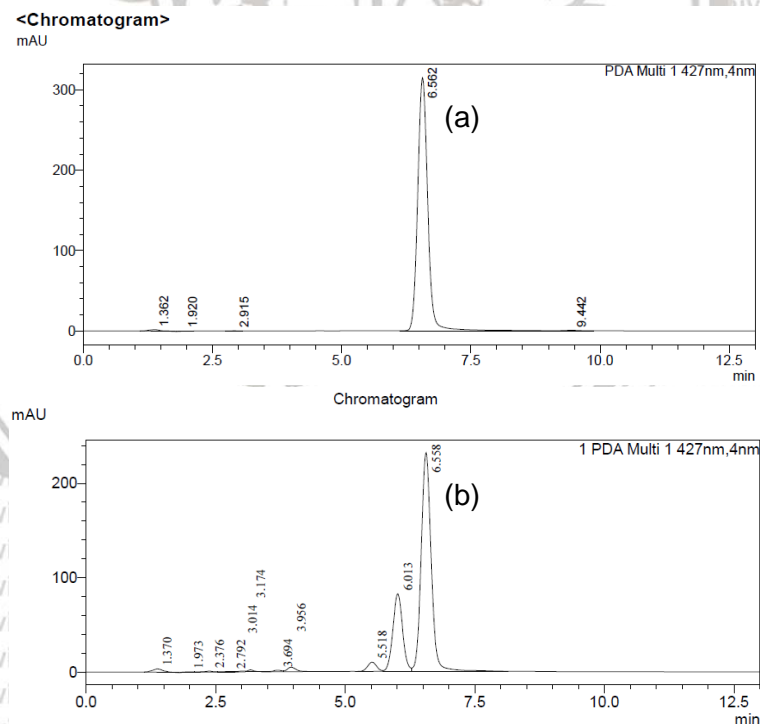
Tujuan dari optimasi ini adalah untuk memastikan bahwa fase gerak yang



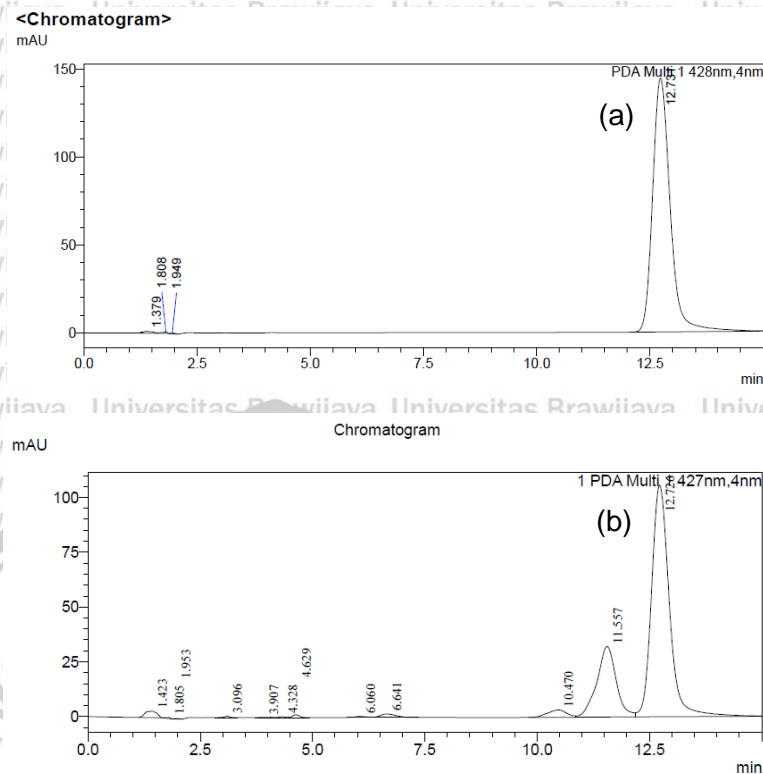
digunakan dapat memisahkan senyawa kurkumin dengan baik dan memiliki *reproducibility* yang baik. Untuk melihat pemisahan yang baik dapat diketahui melalui nilai resolusi (Rs), dimana nilai Rs yang baik adalah  $> 1,5$  (AOAC, 2012).

**Tabel 5. 3 Optimasi Fase Gerak**

Fase Gerak	pH	Label	$\lambda_{\max}$ (nm)	Waktu Retensi (menit)	Resolusi
Asetonitril : WFI : Asam asetat glasial (50 : 49 : 1)	3,050	Standar Kurkumin 30 ppm	427	6,562	12,640
		Sampel RT1	427	6,558	1,543
Asetonitril : Asam Asetat Glasial 1% (45 : 55)	2,660	Standar Kurkumin 30 ppm	428	12,731	26,237
		Sampel RT1	427	12,726	1,617



**Gambar 5. 3 Kromatogram pada pH 3,050 (a) Larutan Standar (b) Larutan Sampel RT1**



**Gambar 5. 4 Kromatogram pada pH 2,660 (a) Larutan Standar (b) Larutan Sampel RT1**

Apabila dilihat dari resolusi yang dihasilkan menggunakan fase gerak pertama didapatkan nilai  $R_s$  sebesar 1,543 dimana nilai ini sudah memenuhi persyaratan nilai resolusi yang baik yaitu bernilai  $> 1,5$  namun, nilai  $R_s$  ini sangat mendekati batas minimum sehingga dapat disimpulkan bahwa fase gerak ini kurang mampu memisahkan senyawa kurkumin dengan baik. Oleh karena itu, dilakukan optimasi kembali dengan fase gerak yang kedua dan didapatkan nilai resolusi yang lebih baik yaitu 1,617.

### 5.3 Kondisi Operasional HPLC

HPLC yang digunakan untuk penetapan kadar kurkumin dikondisikan menggunakan fase gerak C dan fase gerak D. Fase gerak C terdiri dari 0,1% asam asetat glasial dalam *water for injection* yang sudah di saring menggunakan Corong Buchner dan Fase gerak D terdiri dari asetonitril pro HPLC. Fase gerak yang

digunakan dicampur didalam HPLC dengan perbandingan asetonitril : asam asetat glasial 0,1% dalam WFI (45 : 55) dengan cara mengatur pump pada HPLC menjadi *low pressure gradient*. Flow rate yang digunakan adalah 1 ml/menit dengan volume injeksi 20  $\mu$ l. Sebelum dilakukan penginjeksian larutan standar dan sampel, kolom Shim-pack VP-ODS (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) dicuci terlebih dahulu menggunakan metanol pro HPLC selama 60 menit. Kemudian *injector* di *purging* selama 30 menit, setelah itu dilakukan *baseline check* selama 15 menit menggunakan fase gerak atau hingga terdapat tulisan 'pass' pada software Labsolution. Selama HPLC dioperasikan, suhu kolom dikontrol pada 30°C dan autosampler tempat vial diletakkan diatur pada suhu 15°C. Lama running LC adalah 15 menit dan panjang gelombang yang akan dideteksi oleh detector PDA adalah 190-800 nm. Setelah selesai digunakan kolom HPLC kembali di cuci menggunakan metanol pro HPLC selama 60 menit.

### 5.3.1 System Suitability Test (SST)

*System suitability test* ini dilakukan untuk menjamin kualitas dari kinerja sistem kromatografi. Jumlah tes yang diperlukan untuk melakukan penetapan kadar menggunakan standar eksternal biasanya meliputi *theoretical plate* (N), *k'* (*capacity factor*), T (*tailing factor*), Rs (*Resolution*) dan *Repeatability* (RSD dari area dan waktu retensi dengan minimal 6 kali pengulangan) (Shabir, 2003).

Pengujian kesesuaian sistem sangat penting untuk menjamin kinerja kualitas sistem kromatografi. Jumlah pengujian yang diperlukan akan bergantung pada tujuan metode pengujian. Biasanya untuk mendapatkan RSD dilakukan penginjeksian lebih dari 5 kali menggunakan larutan yang diinginkan. SST pada HPLC yang digunakan untuk penetapan kadar terlampir pada Tabel 5.4 sebagai berikut. Dilihat dari hasil parameter SST pada larutan standar kurkumin 36 ppm

telah memenuhi kriteria dari FDA yaitu nilai  $N > 2000$ ;  $k' > 2$ ;  $T < 2$ ;  $R_s > 1,5$  dan  $RSD < 2\%$ .

**Tabel 5. 4 System Suitability Test Larutan Standar Kurkumin 36 ppm.**

Rt (menit)	Area	N	k'	T	Rs	RSD* (%)	RSD** (%)
<b>23/03/2021</b>							
12,737	5263449	6026	8,477	1,289	18,398		
12,716	5341686	6063	8,537	1,274	27,474		
12,717	5361608	6070	8,167	1,262	28,044		
12,720	5389126	6096	8,115	1,255	25,714	0,00135	0,00882
12,742	5378062	6103	8,382	1,247	18,472		
12,759	5384538	6134	8,459	1,241	25,443		
<b>Rata-rata</b>		<b>6082</b>	<b>8,356</b>	<b>1,261</b>	<b>23,924</b>		
<b>24/03/2021</b>							
12,745	5820429	6450	8,582	1,238	18,726		
12,708	5858326	6459	8,286	1,226	18,568		
12,697	5896898	6430	8,481	1,218	18,560		
12,727	5869948	6448	8,408	1,214	18,604	0,00131	0,00432
12,725	5869768	6477	8,574	1,210	18,506		
12,715	5875853	6523	8,582	1,204	18,801		
<b>Rata-rata</b>		<b>6464</b>	<b>8,485</b>	<b>1,218</b>	<b>18,628</b>		

Keterangan:  $k'$ = capacity factor,  $T$ =tailing factor,  $R_s$ =Resolution;  $R_t$ =waktu retensi; \* = RSD dari waktu retensi. \*\* = RSD dari area.

## 5.4 Validasi Metode

### 5.4.1 Uji Selektivitas

Selektivitas bertujuan untuk mengukur seberapa mampu suatu metode mengukur analit saja dengan adanya senyawa lain yang terkandung dalam sampel. Uji ini diamati dengan melihat nilai resolusi dari larutan sampel ekstrak rimpang temulawak. Resolusi minimal yang dianggap baik bernilai lebih dari 1,5 (AOAC, 2012). Kemudian pada uji selektivitas terdapat uji spesifisitas yang dapat dilihat melalui kromatogram, spectrum, dan waktu retensi antara larutan baku standar kurkumin dan sampel temulawak dari masing-masing metode ekstraksi (USP, 2006; Clara, 2018).

**Tabel 5. 5 Resolusi Sampel Ekstrak Rimpang Temulawak.**

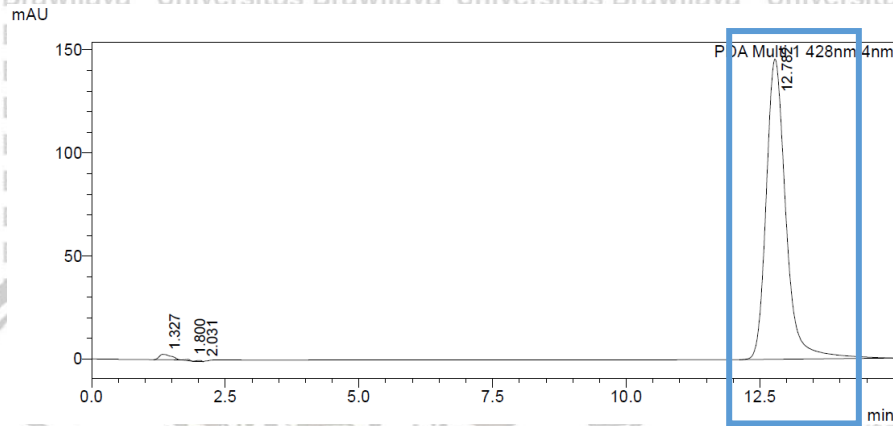
Nama	Replikasi	Resolusi	Rata-rata
MT1	1	1,724	1,725
	2	1,725	
	3	1,726	
MT2	1	1,729	1,729
	2	1,729	
	3	1,729	
MT3	1	1,727	1,727
	2	1,728	
	3	1,727	
RT1	1	1,716	1,718
	2	1,719	
	3	1,720	

	1	1,717	
RT2	2	1,722	1,720
	3	1,721	
	1	1,724	
RT3	2	1,728	1,726
	3	1,726	

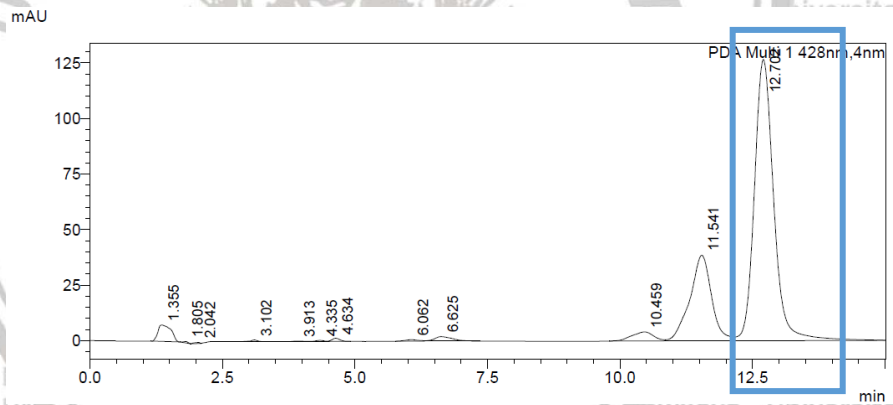
**Tabel 5. 6 Waktu Retensi Standar Kurkumin dan Sampel Ekstrak Rimpang Temulawak.**

Nama	Replikasi	Waktu Retensi (menit)	Rata-rata (menit)
Standar 12 ppm	1	12,790	
	2	12,782	
	3	12,785	12,756
Standar 36 ppm	1	12,724	
	2	12,699	
	3	12,702	
Standar 48 ppm	1	12,711	12,708
	2	12,713	
	3	12,699	
Standar 60 ppm	1	12,705	12,699
	2	12,697	
	3	12,701	
MT1	1	12,697	12,696
	2	12,690	
	3	12,712	
MT2	1	12,704	12,707
	2	12,706	
	3	12,704	
MT3	1	12,704	12,711
	2	12,713	
	3	12,713	

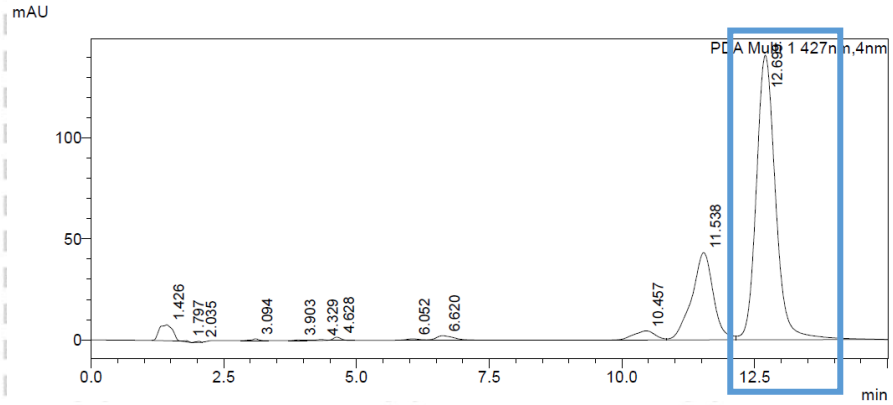
	3	12,715	
	1	12,703	
RT3	2	12,694	12,696
	3	12,691	



(a)

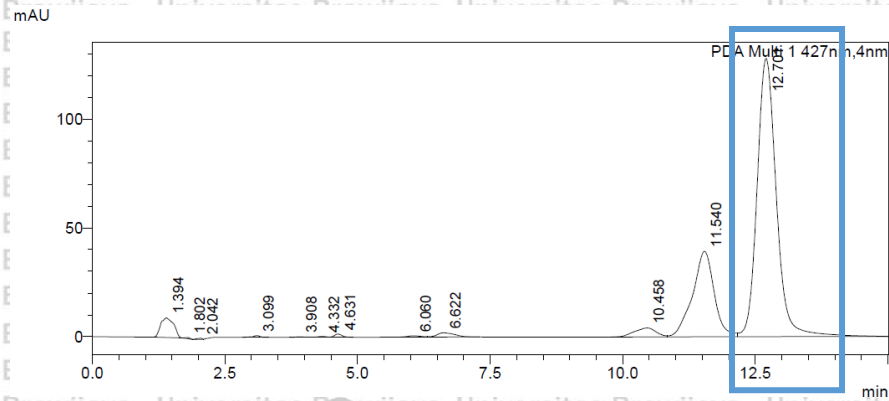


(b)

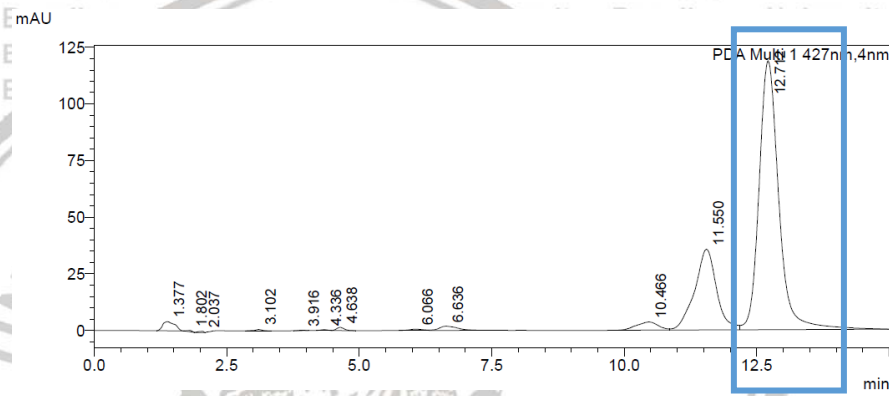


(c)

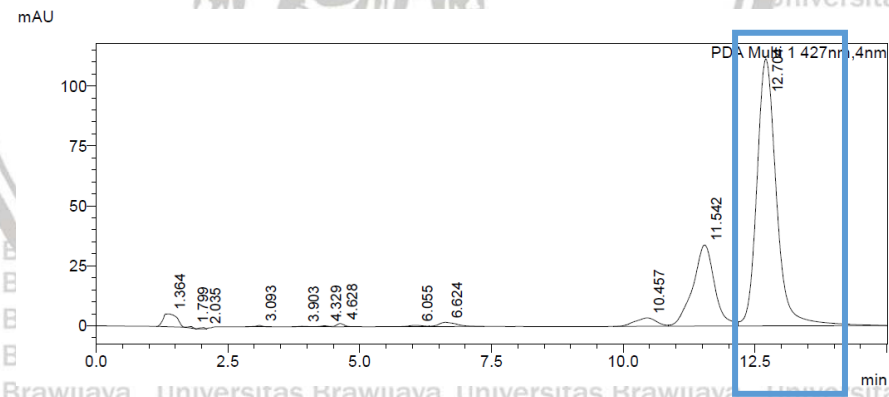




(d)

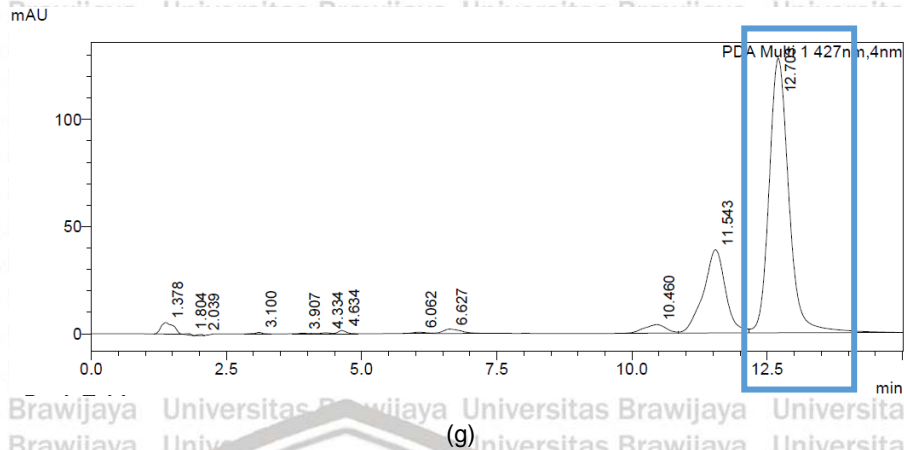


(e)

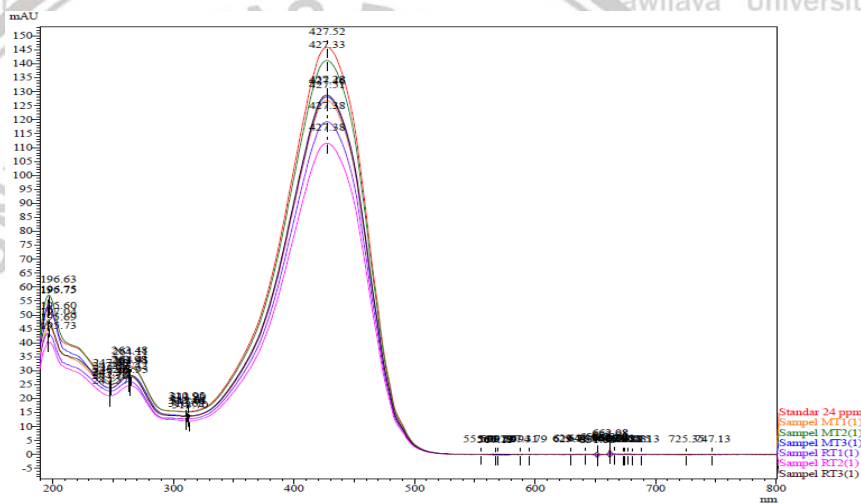


(f)





**Gambar 5. 5 Kromatogram (a) Standar 24 ppm (b) Sampel MT1 (c) Sampel MT2 (d) Sampel MT3 (e) Sampel RT1 (f) Sampel RT2 (g) Sampel RT3.**



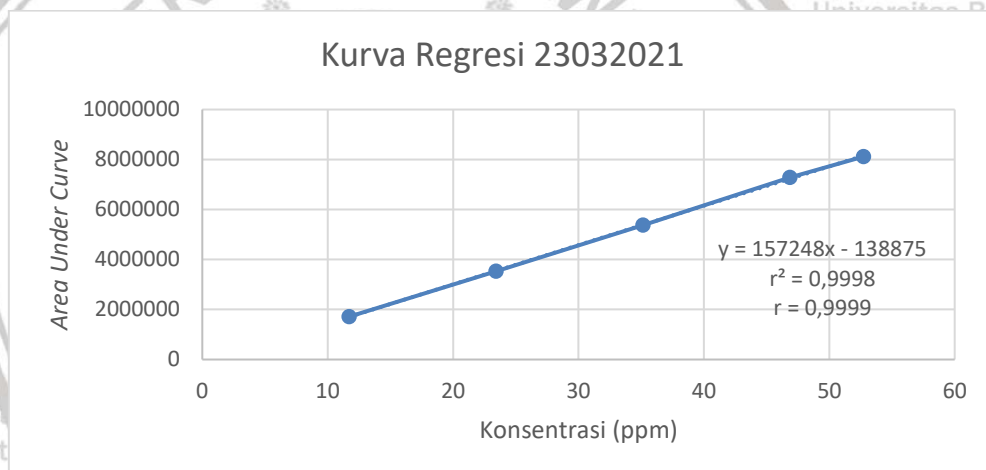
**Gambar 5. 6 Overlay Spektrum Standar 24 ppm dan Sampel Ekstrak Temulawak.**

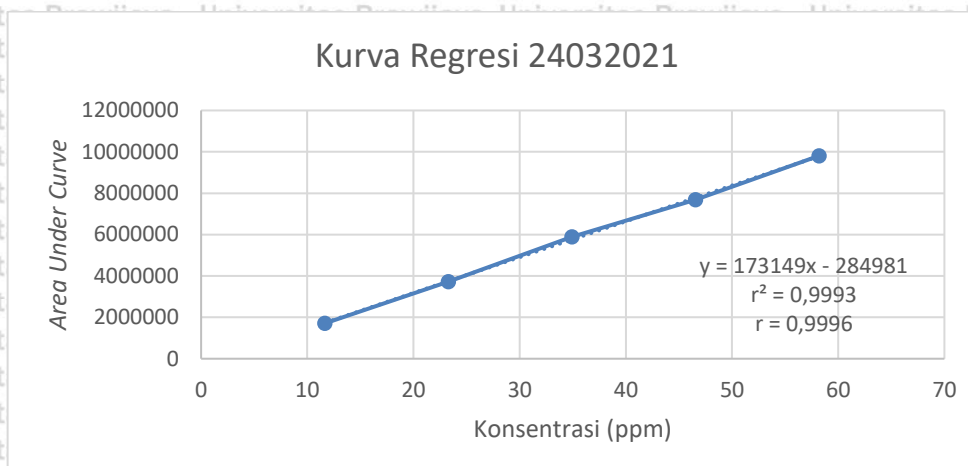
Apabila dilihat dari nilai resolusi ekstrak yang berada pada rentang 1,696-1,729 seperti yang tertera pada Tabel 5.5 sudah bernilai  $> 1,5$  sehingga sudah memenuhi persyaratan. Pada Tabel 5.6 rentang waktu retensi yang muncul menunjukkan bahwa sampel mengandung kurkumin memiliki menit yang hampir sama yaitu sekitar 12,6-12,75 menit. Kromatogram pada Gambar 5.5 juga menunjukkan waktu retensi yang muncul pada waktu yang hampir sama dengan standar kurkumin. Adapun, spektrum yang muncul seperti pada Gambar 5.6 menunjukkan bentuk

yang mirip, sehingga spesifisitas kurkumin dapat dinyatakan memenuhi syarat berdasarkan kesamaan bentuk spektrum dan waktu retensi pada kromatogram.

#### 5.4.2 Uji Linieritas

Linieritas bertujuan untuk mengetahui korelasi antara perubahan konsentrasi terhadap luas area yang muncul pada sistem HPLC. Linieritas yang baik ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) yaitu lebih dari 0,99 (AOAC, 2002). Pada 2 kali uji linieritas yang dilakukan pada penelitian ini didapatkan nilai  $r = 0,9999$  dan  $r = 0,9996$  seperti yang terlampir pada Gambar 5.5 dibawah berikut ini.





(b)

**Gambar 5. 7 Grafik Kurva Baku Larutan Standar Kurkumin (a) tanggal 23/03/2021 (b) tanggal 24/03/2021.**

#### 5.4.3 Uji LOD dan LOQ

Uji LOD dan LOQ ini dilakukan dengan memasukkan nilai yang didapatkan dari uji linieritas ke dalam rumus yang telah ditetapkan sebagaimana terlampir pada Lampiran 10. Tujuan menentukan LOD dan LOQ adalah untuk mengetahui jumlah analit terkecil yang dapat dideteksi oleh metode analisis dan dapat dikuantifikasi dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Pada penelitian ini nilai LOD yang didapat sebesar 0,875 ppm dan nilai LOQ sebesar 2,652 ppm.

#### 5.4.4 Uji Akurasi dan Presisi

Uji akurasi dan presisi dilakukan dengan menghitung konsentrasi larutan standar kurkumin yang direplikasi pada konsentrasi 80%, 100%, dan 120% dimana hasil yang didapatkan nantinya akan dihitung menggunakan dengan persamaan regresi  $y = 15725x - 13887$  ( $r = 0,9999$ ). Hasil persen recovery dan persen RSD yang diperoleh terlampir pada Tabel 5.7 dimana rentang persen recovery yang didapatkan yaitu 98,743% - 99,552% dan rentang persen RSD yang didapatkan yaitu 0,543% - 1,150%. Hasil ini telah memenuhi persyaratan oleh AOAC tahun 2002 yaitu persen recovery dan RSD untuk konsentrasi 1-10% adalah pada

rentang 92-105% dan 2%. Oleh karena itu, hasil yang diperoleh dapat akurat dan preisisi.

**Tabel 5. 7 Hasil Uji Akurasi Presisi.**

Kons.	Kons.	Area	Kons.	Persen	Rata-rata	Persen
	teoritis		terukur	Recovery	persen	RSD
	(ppm)		(ppm)	(%)	Recovery	
					(%)	
		3485603	23,049	98,353		
<b>80%</b>	24	3491709	23,088	98,519	98,743	0,543
		3522517	23,284	99,355		
		4452771	29,199	99,679		
<b>100%</b>	30	4394952	28,832	98,424	99,552	1,074
		4493020	29,456	100,553		
		5298393	34,578	98,364		
<b>120%</b>	36	5333731	34,802	99,003	99,317	1,150
		5421066	35,358	100,583		

### 5.5 Penetapan Kadar

Penetapan kadar total kurkumin dilakukan pada ekstrak temulawak yang dimaserasi menggunakan metode dan waktu yang berbeda dimana terdapat 2 golongan yaitu ekstrak maserasi selama 12 jam dan ekstrak yang diremaserasi tiap 3 jam dengan total waktu maserasi 9 jam. Untuk mengetahui konsentrasi sampel dalam satuan ppm maka area pada kromatogram yang terukur pada HPLC akan diolah ke dalam persamaan regresi  $173149x - 284981$  ( $r = 0,9996$ ). Pada persiapan sampel sendiri masing-masing sampel ditimbang sebanyak  $\pm 10$  mg dan

dilarutkan ke dalam labu ukur 10 ml menggunakan metanol pro HPLC. Lalu, diambil 3 ml dan kemudian dilarutkan ke dalam labu ukur 10 ml. sampel kemudian disaring menggunakan filter 0,2  $\mu$ l sebelum dimasukkan ke dalam vial. Untuk hasil penetapan kadar yang didapatkan dapat dilihat pada Tabel 5.8 berikut ini.

**Tabel 5. 8 Kandungan Total Kurkumin pada Ekstrak Etanol 96% Temualwak (*Curcuma xanthorrhiza*).**

Sampel	Area	Kons. (ppm) (n = 3)	Kandungan (mg)	Persen b/b Kurkumin (%)	$\bar{x}$ (%)	Persen RSD
MT1	3209245	20,180	0,673	6,727	6,666	2,415
	3083154	19,452	0,648	6,484		
	3241347	20,366	0,679	6,789		
MT2	3550656	22,152	0,738	7,239	7,204	0,554
	3508922	21,911	0,730	7,160		
	3508922	22,065	0,736	7,210		
MT3	3232659	20,316	0,677	6,704	6,633	0,934
	3173073	19,972	0,666	6,591		
	3180303	20,013	0,667	6,605		
RT1	3066654	19,357	0,645	6,452	6,458	2,114
	3000194	18,973	0,632	6,324		
	3141998	19,792	0,659	6,597		
RT2	2871841	18,232	0,608	6,017	6,075	2,025
	2858212	18,153	0,605	5,991		
	2976211	18,835	0,628	6,216		
RT3	3256965	20,456	0,682	6,685	6,617	1,379
	3165815	19,929	0,664	6,513		

3239281 20,354 0,678 6,652

## 5.6 Analisis Statistik

### 5.6.1 Uji Normalitas

Berdasarkan uji normalitas yang dilakukan pada data kadar kurkumin dari dua kelompok sampel (maserasi 12 jam dan remaserasi 9 jam) menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistic 23 dan JAPS 0.14.1.0 dengan metode Shapiro-Wilk terlampir pada Tabel 5.9 dan Lampiran 12. Populasi data dikatakan terdistribusi normal apabila hasil uji normalitas menunjukkan  $p > 0,05$ , sehingga dapat disimpulkan data pada penelitian ini terdistribusi normal untuk masing-masing kelompok sampel.

**Tabel 5. 9 Hasil Uji Normalitas Kadar Kurkumin.**

Kelompok Data	Nilai Signifikansi (p)	Keterangan
Maserasi	0,099	Normal
Remaserasi	0,323	Normal

### 5.6.2 Uji Homogenitas

Berdasarkan uji homogenitas yang dilakukan pada data kadar kurkumin dari dua kelompok sampel (maserasi 12 jam dan remaserasi 9 jam) menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistic 23 dan JAPS 0.14.1.0 dengan Levene's test terlampir pada Tabel 5.10 dan Lampiran 12. Populasi data dikatakan homogen apabila hasil uji homogenitas menunjukkan  $p > 0,05$ , sehingga dapat disimpulkan data pada penelitian ini terdistribusi normal untuk masing-masing kelompok sampel.

Tabel 5. 10 Hasil Uji Homogenitas Kadar Kurkumin.

Kelompok Data	Nilai Signifikansi (p)	Keterangan
Kadar Kurkumin	0,650	Homogen

### 5.6.3 Uji t tidak berpasangan

Uji t tidak berpasangan dapat dilakukan pada data penelitian ini karena telah terbukti bahwa data yang dihasilkan normal dan homogen (bukan syarat mutlak). Uji t tidak berpasangan pada data kadar total kurkumin pada dua kelompok sampel (maserasi 12 jam dan remaserasi 9 jam) dilakukan menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistic 23 dan JAPS 0.14.1.0 seperti yang terlampir pada Tabel 5.11 dan Lampiran 12. Hasil yang didapatkan akan dikatakan berbeda secara signifikan apabila antara kedua sampel ekstrak temulawak menunjukkan hasil uji  $p < 0,05$ . Hasil yang didapatkan pada penelitian ini adalah 0,003 sehingga kedua kelompok sampel yaitu maserasi dan remaserasi dapat dikatakan berbeda secara signifikan.

Tabel 5. 11 Hasil Uji t Tidak Berpasangan pada Kadar Kurkumin.

Kelompok Data	Nilai Signifikansi (p)	Keterangan
Kadar Kurkumin	0,003	Signifikan

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan kadar kurkumin yang berasal dari ekstrak etanol 96% pada simplisia rimpang temulawak. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan acuan mengenai total kadar kurkumin menggunakan 2 teknik ekstraksi secara terpisah. Teknik ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan penentuan kadar menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Maserasi digunakan karena tergolong metode ekstraksi yang paling sederhana, murah, dan tidak memerlukan peralatan yang cukup rumit. Maserasi juga merupakan teknik yang paling sesuai dan banyak digunakan baik dalam skala kecil maupun skala industri. HPLC digunakan untuk penetapan kadar karena kekuatan pemisahannya yang baik yaitu dapat memisahkan kurkumin dari turunannya yaitu bisdemetoksikurkumin dan demetoksinkurkumin (Fornstedt *et al.*, 2015).

Rimpang temulawak yang sudah berbentuk simplisia diekstraksi terlebih dahulu menggunakan etanol 96% sebanyak 300 ml (1:6) dengan dua teknik ekstraksi yaitu maserasi dan remaserasi. Maserasi merupakan metode yang ekstraksi dengan cara menempatkan simplisia atau bagian tanaman ke dalam wadah tertutup yang berisikan pelarut kemudian didiamkan selama waktu tertentu dengan pengadukan hingga senyawa target yang diinginkan larut ke dalam pelarut (Singh, 2008). Senyawa kurkumin pada tanaman temulawak diketahui termasuk ke dalam senyawa polifenol yang bersifat tahan terhadap pemanasan. Namun, kurkumin diketahui bersifat sangat sensitif terhadap cahaya matahari. Dengan



menggunakan metode maserasi kemungkinan senyawa terpapar cahaya matahari dapat di minimalisir, oleh karena itu metode ini dipilih. Etanol 96% dipilih sebagai pelarut karena sesuai dengan prinsip *like dissolves like*, kurkumin yang termasuk dalam senyawa polifenol yang bersifat polar sehingga akan lebih mudah larut pada pelarut polar (Zielinska, 2020). Pada penelitian sebelumnya juga diketahui etanol 96% merupakan pelarut yang dapat mengambil senyawa kurkumin paling banyak dibandingkan etanol lainnya (Ihsan *et al.*, 2018; Setiawansyah *et al.*, 2018; Anggoro *et al.*, 2015). Penggunaan perbandingan 1:6 ini juga dilakukan karena berdasarkan optimasi yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya perbandingan ini merupakan perbandingan terbaik (Paulucci *et al.*, 2012).

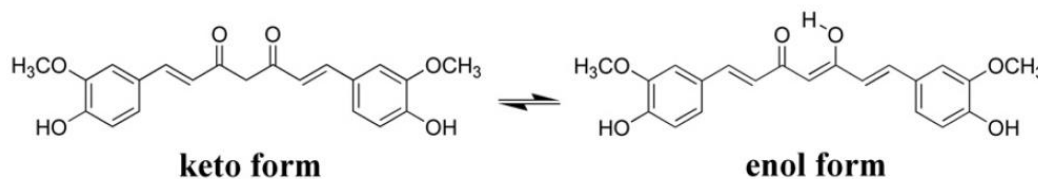
Pada penelitian ini didapatkan 6 hasil persen rendemen sebesar 6,17%; 5,73%; 5,74%; 5,85%; 5,87% dan 6,37% masing-masing untuk MT1, MT2, MT3, RT1, RT2, dan RT3. Hasil persen rendemen yang dihasilkan ini bernilai lebih sedikit dari penelitian yang dilakukan oleh Setiawansyah *et al.* (2018) yang menghasilkan persen rendemen sebesar 19,93%. Perbedaan hasil yang didapat ini dapat disebabkan oleh perbedaan waktu ekstraksi yang digunakan, dimana pada penelitian Setiawansyah *et al.* (2018) dilakukan selama 3 x 24 jam. Waktu merupakan salah satu parameter ekstraksi yang memberikan pengaruh, yaitu sekitar 3% terhadap hasil ekstraksi (Paulucci *et al.*, 2012). Kemudian apabila dilihat menurut rata-rata, persen rendemen yang dihasilkan menggunakan teknik maserasi bernilai lebih tinggi dibandingkan dengan teknik maserasi. Persen rendemen sendiri sebenarnya adalah nilai yang menggambarkan perbandingan antara jumlah ekstrak yang diperoleh dengan jumlah sampel awal yang ditimbang, artinya semakin tinggi jumlah ekstrak yang didapat maka akan semakin tinggi pula nilai persen rendemen yang dihasilkan (Nurhadi *et al.*, 2019). Hasil ini sesuai

dengan penelitian yang dilakukan oleh Fauzana (2010), dimana maserasi temulawak selama 12 jam (13,36%) menghasilkan persen rendemen yang lebih rendah dari remaserasi selama 8 jam (15,53%). Penelitian yang dilakukan oleh Anggoro *et al.* (2015) juga menyatakan bahwa ekstraksi dengan 3 tahap akan menghasilkan lebih banyak rendemen dibandingkan ekstraksi 2 tahap, dimana pada penelitian ini dilakukan remaserasi sebanyak setiap 3 jam dengan total waktu ekstraksi 9 jam. Selain itu, pada remaserasi terdapat tahap pergantian pelarut yang baru sehingga terjadi *driving force* yang mengakibatkan penarikan solut yang lebih banyak (Anggoro *et al.*, 2015).

Setelah proses ekstraksi berhasil dilakukan, dilanjutkan dengan melakukan validasi metode penetapan kadar kurkumin menggunakan HPLC. Parameter validasi metode yang dilakukan meliputi uji selektivitas, uji linieritas, uji LOD, uji LOQ, uji akurasi dan uji presisi. Validasi metode merupakan salah satu persyaratan dari *International Conference on Harmonisation* (ICH) untuk mengontrol kualitas metode analisis. ICH menunjukkan bahwa validasi berperan penting pada prosedur analisis seperti pada uji kuantitatif senyawa aktif dalam sampel (Watson, 2012). Tujuan dilakukan validasi metode adalah untuk memastikan bahwa metode yang digunakan untuk penetapan kadar pada ekstrak rimpang temulawak dengan HPLC telah memenuhi syarat dan bersifat konsisten, dapat dipercaya, serta bermutu.

Sebelum dilakukan validasi metode, diketahui bahwa kurkumin terdiri dari 2 bentuk yaitu kurkumin-keto dan kurkumin-enol, dimana kurkumin yang dianalisis biasanya berada dalam bentuk enol. Banyaknya kurkumin yang teranalisis dalam bentuk enol disebabkan karena kurkuminoid yang berada dalam bentuk larutan lebih stabil dalam bentuk enol dibandingkan dalam bentuk keto (Manimaran *et al.*,

2018; Cahyono *et al.*, 2011). Tautomeri keto-enol pada kurkumin terjadi karena adanya 2 gugus keton yang berdampingan namun kurkumin cenderung untuk mempertahankan ikatan hidrogen intramolekul antara proton enolik dengan atom O pada gugus  $\beta$ -diketo.



**Gambar 6. 1** Struktur Kurkumin dalam Bentuk Keto dan Enol (Mondal *et al.*, 2016)

Selain itu, dalam geometri planar, enolisasi memungkinkan konjugasi antara sistem elektron  $\pi$  dari dua kromofor feruloyl melalui atom karbon hibridisasi  $sp^2$  pusat, menghasilkan penyerapan cahaya dalam *visible light* yang menyebabkan warna kuning. Eksitasi elektron dari transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  inilah yang mengakibatkan kurkumin dapat diserap pada *visible light* (Kim *et al.*, 2013).

Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini telah melalui proses optimasi sebanyak 2 kali menggunakan asetontril, *water for injection* (WFI), dan asam asetat glasial dengan perbandingan yang berbeda. Asetonitril dipilih sebagai fase gerak karena merupakan pelarut yang sering digunakan untuk HPLC. Hal ini dikarenakan asetonitril bersifat murni, memiliki viskositas yang rendah, tidak mengganggu analisis, dan tidak merusak komponen HPLC. Selain itu, asetonitril merupakan pelarut yang bersifat polar sehingga dapat melarutkan kurkumin agar dapat terelusi (Agrahari *et al.*, 2013; Priyadarsini, 2014). Sedangkan asam asetat glasial digunakan sebagai pembuat suasana asam saat analisis. Penambahan asam ini dilakukan karena pada kromatografi fase terbalik umumnya menggunakan pH antara 2-8. pH rendah pada fase gerak dapat menekan ionisasi

dari analit yang bersifat asam lemah dan permukaan silanol sehingga mengurangi tailing pada peak sampel (Dong, 2006). Apabila pH bernilai dibawah 2 maka dapat terjadi hidrolisis pada gugus sampel yang terikat sedangkan pada pH diatas 8 fase diam silika cenderung terdisosiasi dan larut (Weston dan Phyllis, 1997). Kontrol pH pada fase gerak juga dapat mengontrol waktu retensi, selektivitas dan membantu meningkatkan pemisahan dan resolusi dari senyawa target (Agrahari et al, 2013; Dolan, 2017). Kurkumin juga diketahui dapat larut dalam asam asetat glasial dan lebih stabil pada pH rendah daripada pH tinggi (National Center for Biotechnology Information, 2021; Priyadarsini, 2014).

Fase gerak pertama yang digunakan merupakan campuran dengan perbandingan 50 : 49 : 1 dari asetonitril pro HPLC, *water for injection*, dan asam asetat glasial. Hasil rata-rata waktu retensi yang didapatkan adalah 6,558 menit (pH 3,050). Dari hasil yang didapat diketahui bahwa *reproducibility* dari fase gerak ini sangat buruk dimana seharusnya waktu retensi berdasarkan penelitian terdahulu berada pada menit ke 7,910 (Nugraheni, 2015). Apabila dilihat dari resolusi yang dihasilkan menggunakan fase gerak pertama didapatkan nilai  $R_s$  berkisar 1,535-1,543 dimana nilai ini sudah memenuhi persyaratan nilai resolusi yang baik yaitu bernilai  $> 1,5$  namun, nilai  $R_s$  ini sangat mendekati batas minimum sehingga dapat disimpulkan bahwa fase gerak ini kurang mampu memisahkan senyawa kurkumin dengan baik. Hal ini dapat terjadi karena beberapa hal seperti fase gerak yang tidak tercampur secara adekuat, proses *degassing* yang terlalu sebentar, ataupun pH dari fase gerak yang kurang stabil. Fase gerak yang tidak tercampur dengan baik dapat menyebabkan banyaknya gangguan (*noise*) pada *baseline*, dan buruknya *reproducibility* dari waktu retensi. Untuk meminimalkan masalah ini peneliti harus memastikan bahwa fase gerak benar-benar telah

tercampur dengan baik dengan melihat bahwa masing-masing larutan dapat larut bersama. Hal lain yang dapat dilakukan adalah dengan mengatur *flow rate* dan volume injeksi. *Degassing* berfungsi untuk mengurangi jumlah gas pada fase gerak sehingga dapat meningkatkan sensitifitas pada *signal to noise* (S/N) dan mengurangi penyimpangan waktu retensi. Sehingga semakin lama *degassing* dilakukan maka akan didapatkan waktu retensi yang lebih *reproduceable* dan nilai S/N yang lebih baik. pH dari fase gerak juga dapat mempengaruhi waktu retensi dan resolusi yang dihasilkan. Jika fase gerak dibuat terlalu jauh dari nilai pKa-nya maka dapat menghasilkan bentuk puncak yang buruk dan waktu retensi yang tidak stabil (Letter, 2015). Untuk mengatasi permasalahan waktu retensi yang tidak stabil dan resolusi yang rendah, akhirnya dilakukan pergantian fase gerak menggunakan asetonitril : asam asetat glasial 1% (pH diatur menjadi 2,660) dengan perbandingan 45 : 55 dimana pencampurannya dilakukan didalam HPLC. Hasil yang didapat lebih bersifat stabil dengan *reproducibility* yang lebih baik yaitu waktu retensi yang didapatkan pada sampel berada diantara 12,696-12,711 menit dengan resolusi berkisar antara 1,718-1,729. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kurniawan (2012) yang mendapatkan waktu retensi sekitar 13,9 menit dengan nilai resolusi 1,73 menggunakan fase gerak yang sama.

Selanjutnya, panjang gelombang maksimum pada penelitian ini ditentukan dengan melihat serapan larutan standar kurkumin sebesar 12 ppm, 24 ppm, 36 ppm, 48 ppm, dan 60 ppm. Masing-masing larutan standar diukur pada serapan 190-800 nm dan didapatkan hasil panjang gelombang maksimal antara 427,39-427,52 (Lampiran 6) dimana panjang gelombang ini sesuai dengan rentang panjang gelombang maksimal secara teoritis sehingga dipilihlah panjang gelombang 428 sesuai dengan pembulatan yang terdapat pada software

Labsolution. Kurkumin sendiri memiliki spektrum serapan UV yang luas dari 300 hingga 500 nm karena adanya gugus fenolik. Menurut penelitian Erpina *et al.* (2017) senyawa kurkumin sering terdektesi pada panjang gelombang maksimal 425 nm, pergeseran pada panjang gelombang maksimal pada penelitian ini dapat disebabkan karena penggunaan metanol sebagai pelarut dalam preparasi sampel, dimana absorpsi maksimal kurkumin dalam pelarut metanol adalah 430 nm (Bharat *et al.*, 2006). Menurut Farida (2008) pergeseran panjang gelombang maksimum masih dapat diterima sebesar  $\pm 20$  nm yang artinya apabila terdapat pergeseran atau perbedaan tidak akan menimbulkan kesalahan yang signifikan.

*System suitability testing* (SST) merupakan uji yang membantu untuk memastikan bahwa akurasi dan ketepatan data HPLC yang akan dilihat melalui sistem kromatografi berfungsi dengan baik (FDA, 1994). Jumlah tes yang dilakukan tergantung pada tujuan metode yang dilakukan. Apabila tujuan analisis adalah untuk melihat suatu kriteria penerimaan atau menganalisis data baru yang akan dirilis maka dengan melihat *theoretical plate number* ( $N$ ), *capacity factor* ( $k'$ ), *tailing factor* ( $T$ ), resolusi ( $R_s$ ), dan nilai RSD pada minimal 6 kali pengulangan (Shabir, 2003). Pada penelitian ini dilakukan SST dengan menginjeksikan larutan standar 36 ppm sebanyak 6 kali. *Theoretical Plate Number* adalah ukuran efisiensi dari kolom, artinya berapa banyak peak yang dapat dilihat per waktu running dari kromatogram, dimana nilai  $N$  yang baik adalah  $> 2000$ . *Capacity factor* ( $k'$ ) adalah letak dimana *peak* yang diinginkan berada sehubungan dengan waktu elusi dari komponen, dimana nilai  $k'$  yang baik adalah  $> 2$ . *Tailing factor* ( $T$ ) adalah pengekoran pada kromatogram karena sulitnya integrator menentukan kapan puncak berakhir, dimana nilai  $T$  yang dapat diterima adalah  $\leq 2$  (CDAR, 1994). Resolusi ( $R_s$ ) merupakan nilai yang mengukur seberapa baik 2 puncak terpisah,

nilai resolusi yang baik adalah  $> 2$  untuk senyawa sintesis namun untuk senyawa yang terdapat dalam makanan atau tumbuhan  $> 1,5$  sudah dianggap baik (AOAC, 2012). Hasil yang didapatkan pada tanggal 23 maret 2021 yaitu rata-rata N sebesar 6082, k' sebesar 8,356, T sebesar 1,261, Rs sebesar 23,924, RSD waktu retensi sebesar 0,00135% dan RSD area sebesar 0,00882% sedangkan pada tanggal 24 maret 2021 didapatkan nilai N sebesar 6464, k' sebesar 8,485, T sebesar 1,218, Rs sebesar 18,628, RSD waktu retensi sebesar 0,00131% dan RSD area sebesar 0,00432% dimana kedua hasil ini telah memenuhi persyaratan AOAC dan FDA sehingga dapat dikatakan bahwa sistem HPLC berfungsi dengan baik dan analisis selanjutnya dapat dipercaya, tepat dan akurat.

Istilah selektivitas lebih disukai oleh IUPAC daripada spesifisitas. Uji selektivitas adalah sejauh mana metode dapat mengukur analit target dengan adanya analit, matriks, atau bahan lain yang berpotensi mengganggu (AOAC, 2002). Uji ini dilakukan dengan melihat nilai resolusi dari masing-masing kromatogram larutan ekstrak rimpang temulawak. Kemudian spesifisitas akan ditentukan dengan mengamati kromatogram dan waktu retensi pada larutan standar kurkumin dan larutan sampel ekstrak rimpang temulawak. Pada larutan sampel ekstrak rimpang temulawak nilai resolusi yang didapatkan berkisar antara 1,718-1,729 dimana nilai ini sudah memenuhi persyaratan selektivitas yang baik dari AOAC (2002) yaitu nilai resolusi (Rs) lebih dari 1,5. Artinya metode HPLC dapat memisahkan senyawa kurkumin dengan baik dari campuran (ekstrak) dengan baik. Spesifisitas dilakukan untuk melihat apakah sampel yang analisis benar-benar mengandung kurkumin. Rata-rata waktu retensi larutan baku yaitu 12,756 menit dan larutan sampel berada diantara 12,696-12,711 menit sehingga selisih dari waktu retensi larutan standar dan sampel hanya berkisar 0,045-0,06

menit. Menurut *European Commission* (2002), toleransi dari variasi waktu retensi yang dapat diterima adalah  $\pm 2,5\%$  sehingga hasil ini dapat diterima. Apabila dilihat berdasarkan kromatografi, baik dari larutan standar maupun sampel terdapat peningkatan *peak* pada waktu yang hampir sama. Adapun berdasarkan spektrum pada panjang gelombang 427 nm, terlihat bentuk spektrum yang mirip antara standar 24 ppm dan sample dimana spektrum pada larutan standar ini diyakini mengandung kurkumin karena tingkat kemurniannya yang tinggi yaitu  $> 97\%$ . Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa dalam masing-masing sampel terdapat kandungan kurkumin.

Selanjutnya dilakukan uji linieritas, yaitu uji yang memperlihatkan apakah suatu seri konsentrasi dari standar kurkumin memberikan respon yang proporsional. Pada HPLC respon ini dilihat berdasarkan AUC (*Area Under Curve*). Penggunaan 5 konsentrasi pada uji linieritas sangat direkomendasikan (ICH, 2006), sehingga pada penelitian ini digunakan seri konsentrasi larutan standar kurkumin 12 ppm, 24 ppm, 36 ppm, 48 ppm, dan 54 ppm. Hasil yang didapat menunjukkan nilai  $r$  sebesar 0,9999 dengan persamaan garis linier  $y = 157248x - 138875$ . Linieritas yang baik ditunjukkan melalui nilai koefisien korelasi ( $r$ )  $\geq 0,99$  (AOAC, 2002) sehingga linieritas pada penelitian ini dapat dikatakan baik.

Uji LOD dan LOQ merupakan uji yang dapat dihitung menggunakan *signal to noise* maupun menggunakan standar deviasi dan *slope* dari persamaan garis regresi (ICH, 2006). Pada penelitian ini LOD dan LOQ dihitung menggunakan standar deviasi dan *slope*. Hasil perhitungan menunjukkan LOD sebesar 0,875 ppm dan LOQ sebesar 2,652 ppm yang artinya kadar paling minimal yang dapat dideteksi oleh HPLC adalah 0,875 ppm namun kadar ini tidak dapat dikuantifikasi karena kadar minimal yang dapat dikuantifikasi adalah 2,652 ppm. Kurva baku



yang digunakan untuk penetapan kadar pada penelitian ini berada pada rentang 12 ppm hingga 60 ppm dimana nilai ini berada diatas nilai LOQ sehingga kurva baku dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut.

Uji akurasi dan presisi merupakan uji yang menggambarkan kedekatan hasil uji dengan nilai sebenarnya serta dapat memberikan hasil yang sesuai apabila dilakukan secara berulang pada sampel yang homogen (AOAC, 2002).

Data yang direkomendasikan berdasarkan ICH (2006) adalah minimal menggunakan 9 sampel dengan 3 konsentrasi pada level yang berbeda, artinya terdapat 3 konsentrasi larutan sampel kemudian masing-masing konsentrasi direplikasi sebanyak 3 kali. Level konsentrasi larutan sampel yang direkomendasikan adalah 80, 100 dan 120% (CDER, 1994). Larutan yang digunakan untuk uji akurasi dan presisi pada penelitian ini adalah larutan standar kurkumin dengan uji presisi tingkat *repeatability* (dilakukan pengukuran pada hari yang sama). Akurasi presisi dilakukan dengan konsentrasi 30 ppm sebagai konsentrasi 100% karena kadar ini diperkirakan memiliki hasil yang mendekati dengan sampel ekstrak rimpang temulawak, sehingga untuk konsentrasi 80% didapatkan sebesar 24 ppm dan konsentrasi 120% sebesar 36 ppm. Setelah masing-masing sampel diinjeksikan ke dalam HPLC, masing-masing nilai AUC dari sampel dimasukkan ke dalam persamaan regresi untuk menemukan konsentrasi terukur lalu dimasukkan ke dalam rumus persen *recovery* dan RSD.

Hasil persen *recovery* dan RSD yang didapatkan pada penelitian ini berkisar antara 98,743-99,552% dan 0,543-1,150%. Berdasarkan AOAC (2002) persen *recovery* untuk analit dengan konsentrasi diatas 1% adalah 92-105% dan persen RSD yang diterima untuk konsentrasi analit yang sama adalah  $\leq 2\%$  sehingga akurasi dan presisi yang dilakukan pada penelitian ini dapat dikatakan

mampu memberikan perolehan kurkumin standar dengan baik. Penelitian lain yang dilakukan oleh Hanwar *et al.* (2020) juga menghasilkan akurasi dan presisi yang mendekati pada penelitian ini yaitu  $100,19 \pm 1,54\%$  dan  $1,54\%$ . Adapun penelitian yang dilakukan oleh Erpina *et al.* (2017) yang mendapatkan nilai akurasi dan presisi sebesar  $92,61\%$  dan  $2,32\%$ . Perbedaan dan pergeseran nilai akurasi dan presisi ini dapat disebabkan oleh metode yang berbeda dimana pada penelitian Erpina *et al.* (2017) menggunakan standar adisi sedangkan penelitian ini menggunakan metode eksternal standar. Metode ini dipilih karena merupakan metode yang paling sederhana. Penggunaan metode ini juga merujuk pada penelitian sebelumnya (Murti *et al.*, 2019) yang melakukan uji akurasi dan presisi hanya menggunakan larutan standar. Hal ini dilakukan untuk meminimalisir penggunaan standar mengingat harga standar yang cukup mahal dan sampel bahan sampel yang berupa ekstrak memiliki banyak matrix dan pengotor.

Penetapan kadar pada ekstrak etanol 96% rimpang temulawak menggunakan teknik maserasi dan remaserasi dilakukan dengan melarutkan masing-masing sampel kedalam metanol pro HPLC. Setelah dilakukan preparasi sampel masing-masing sampel ekstrak direplikasi sebanyak 3 kali. Oleh karena itu, terdapat 18 sampel ekstrak rimpang temulawak yang diinjeksikan kedalam HPLC. Hasil penetapan kadar kurkumin menggunakan teknik maserasi didapatkan sebesar  $6,666\%$ ,  $7,204\%$ , dan  $6,633\%$  (rata-rata  $6,834 \pm 0,320\%$ ) untuk MT1, MT2 dan MT3 sedangkan pada teknik remaserasi didapatkan kadar kurkumin sebesar  $6,458\%$ ,  $6,075\%$ , dan  $6,617\%$  (rata-rata  $6,383 \pm 0,278\%$ ) untuk RT1, RT2, dan RT3. Nilai persen RSD yang dihasilkan berkisar antara  $0,554-2,415\%$  untuk maserasi dan  $1,379-2,114\%$  untuk remaserasi. Nilai RSD ini sudah memenuhi persyaratan dari AOAC (2012), yaitu untuk konsentrasi analit 1-10% harus berada

pada rentang 1,9-2,7%. Kadar yang dihasilkan juga bernilai tidak terlalu jauh dengan persyaratan yang tertulis pada Farmakope Herbal Indonesia yaitu ekstrak kental rimpang kunyit harus mengandung paling sedikit 6,7% (FHI, 2017). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa metode HPLC yang telah divalidasi untuk penetapan kadar kurkumin dari ekstrak rimpang temulawak telah memenuhi persyaratan dan bersifat valid, akurat serta presisi.

Kedua kelompok sampel pada penelitian ini kemudian dianalisis secara statistik menggunakan uji t tidak berpasangan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar yang signifikan. Uji ini dipilih karena sampel merupakan 2 kelompok yang tidak berpasangan dan data yang didapat berupa data numerik. Namun, sebelum dilakukan uji t tidak berpasangan dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas terlebih dahulu sebagai syarat dapat dilakukannya uji parametrik. Uji normalitas yang digunakan menggunakan metode Shapiro-Wilk karena sampel yang akan dianalisis berjumlah  $\leq 50$  dengan nilai kemaknaan ( $p$ )  $> 0,05$  dianggap normal. Sedangkan untuk uji homogenitas dilakukan menggunakan Levene's test untuk mengetahui apakah kedua kompok sampel memiliki varian data yang sama dengan nilai kemaknaan ( $p$ )  $> 0,05$  berarti data yang akan dianalisis bersifat homogeny. Hasil pada penelitian ini didapatkan nilai uji normlitas sebesar 0,099 untuk maserasi dan 0,323 untuk remaserasi sedangkan uji homogenitas didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,650. Oleh karena itu, data pada penelitian ini dapat dikatakan normal dan homogen sehingga dapat dilakukan uji parametrik selanjutnya yaitu uji t tidak berpasangan dengan persyaratan nilai kemaknaan ( $p$ )  $< 0,05$ . Hasil uji t tidak berpasangan yang didapatkan pada penelitian ini adalah 0,003. Artinya kadar kurkumin pada kedua kelompok sampel yaitu maserasi dan remaserasi berbeda secara signifikan.

Uji statistik yang dilakukan terhadap dua kelompok sampel menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar kurkumin yang signifikan. Artinya, metode ekstraksi yang digunakan untuk mengekstrak kurkumin memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kadar kurkumin. Berdasarkan persen rendemen, didapatkan nilai metode remaserasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan maserasi. Secara teori, nilai rendemen ini akan berpengaruh terhadap banyaknya jumlah senyawa yang ingin diekstrak sehingga apabila rendemen semakin banyak maka dapat disimpulkan juga kandungan senyawa juga semakin banyak (Sayuti, 2017; Hasnaeni *et al.*, 2019). Namun pada saat dilakukan penetapan kadar hasil yang didapatkan kadar pada metode maserasi bernilai lebih tinggi dibandingkan dengan metode remaserasi. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, pertama, karena variasi parameter ekstraksi seperti lama waktu ekstraksi. Waktu ekstraksi pada proses maserasi pada penelitian ini adalah selama 12 jam sedangkan metode maserasi hanya selama 9 jam. Perbedaan waktu ekstraksi sendiri memiliki pengaruh sebesar 3% terhadap hasil ekstraksi (Paulicci *et al.*, 2012). Kedua, faktor kondisi lingkungan seperti iklim, sinar matahari, suhu, dan ketersediaan air dapat mempengaruhi kadar kurkumin (Rosidi *et al.*, 2020). Sinar matahari dapat mendegradasi senyawa kurkumin melalui reaksi siklisasi yang menghasilkan senyawa ferulat. Hal ini terjadi karena kurkumin memiliki gugus metilen aktif (-CH<sub>2</sub>-) diantara 2 gugus ketonnya (Sutaja, 2000).

Dengan diperolehnya hasil ini, hipotesis penelitian ini yaitu adanya perbedaan kadar kurkumin yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dan remaserasi pada rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dapat diterima. Penelitian ini dilakukan dengan mengukur perbedaan kadar kurkumin menggunakan 2 teknik ekstraksi yang berbeda yaitu maserasi selama 12 jam dan

remaserasi sebanyak 3 kali dengan total waktu 9 jam. Karena hipotesis pada penelitian dapat diterima, untuk penelitian terkait penggunaan kurkumin khususnya yang berasal dari tanaman temulawak dapat mempertimbangkan untuk menggunakan teknik maserasi selama 12 jam sebagai teknik ekstraksi yang digunakan karena dapat memberikan hasil kurkumin yang lebih banyak daripada remaserasi yang dilakukan sebanyak 3 kali dengan total waktu 9 jam.

## 6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian

Penelitian ini dapat dikembangkan dan dijadikan sebagai acuan atau sebuah rekomendasi kepada pihak produsen khususnya pada sediaan herbal yang mengandung temulawak maupun produk lainnya yang berkaitan dengan senyawa kurkumin. Dengan harapan didapatkan proses produksi yang lebih efektif sehingga didapatkan kualitas, kuantitas, dan secara keseluruhan, keefektifan dari standar produk dengan biaya yang lebih terjangkau.

## 6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini diantaranya sebagai berikut.

1. Informasi yang dipaparkan pada penelitian ini hanya mencakup kadar kurkumin yang terdapat dalam ekstrak etanol 96% menggunakan metode maserasi selama 12 jam dan remaserasi sebanyak 3 kali selama 9 jam tanpa adanya kontrol terhadap faktor eksternal lainnya seperti perbedaan kondisi geografis, kondisi tanah, iklim mengingat temulawak yang digunakan hanya berasal dari Batu Materia Medica (BMM) di Jalan Lahor No. 87 kota Batu, Jawa Timur.

## BAB 7 PENUTUP

### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengolahan data dan pembahasan pada penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan kadar kurkumin yang signifikan dengan maserasi 12 jam memiliki kadar kurkumin yang lebih tinggi yaitu  $6,834 \pm 0,320\%$  dibandingkan dengan remaserasi 3x selama 9 jam yang hanya menghasilkan kadar kurkumin sebesar  $6,383 \pm 0,278\%$  pada ekstrak etanol 96% rimpang temulawak.

### 7.2 Saran

1. Penelitian dapat dikembangkan dengan melakukan kontrol terhadap parameter ekstraksi lainnya seperti pelarut, waktu, rasio pelarut (nisbah) atau menggunakan sampel temulawak dari letak geografis, iklim, dan kondisi lingkungan yang berbeda.

## DAFTAR PUSTAKA

- 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): Hal 459–464.
- Akarchariya, N., Sasithorn Sirilun, Jakaphun Julsrigival, dan Sune Chansakaowa. 2017. Chemical profiling and antimicrobial activity of essential oil from *Curcuma aeruginosa* Roxb. *Curcuma glans* K. Larsen & J. Mood and *Curcuma cf. xanthorrhiza* Roxb. Collected in Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(10): Hal 881–885.
- Amelinda, E., I Wayan Rai Widarta, Luh Putu Trisna Darmayanti. 2018. The Effect of Maceration Time on Antioxidant Activity of Java Turmeric (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Rhizome Extract. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 7(4): Hal 165-174.
- Anggoro, D., Rajian Sobri Rezki, Siswarni MZ. 2015. Ekstraksi Multi Tahap Kurkumin dari Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Menggunakan Pelarut Etanol. *Jurnal Teknik Kimia USU*. 4(2): Hal 39-45.
- Arief, F.M. 2012. *Ekstraksi dengan pelarut*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Artanti, Enny K., Fadilah. 2007. *Pengaruh kecepatan putar pengadukan dan suhu operasi pada ekstraksi tannin dari jambu mete dengan pelarut aseton*. Solo: Teknik Kimia. Universitas Sebelas Maret.
- AOAC. 2002. *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*. Arlington: Association of Official Analytical Chemists International.
- AOAC. 2012. *AOAC Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals*. Arlington: Association of Official Analytical Chemists
- Azwanida, NN. 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants* 4: 196. doi:10.4172/2167-0412.1000196.
- Bharat, B., Aggarwal, Indra D. Bhatt, Haruyo Ichikawa, Kwang Seok Ahn, Gautam Sethi, Santosh K. Sandur, Chitra Natarajan, Navindra Seeram, and Shishir Shishodia. 2006. Curcumin. *Biological and Medicinal Properties*. Hal: 297-368.
- Cahyono, B., Muhammad Diah Khoirul Huda, dan Leenawaty Limantara. 2011. Pengaruh Proses Pengeringan Rimpang Temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza* Roxb) Terhadap Kandungan dan Komposisi Kurkuminoid. *Reaktor*, 13(3): Hal 165-171.
- Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1994. Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods. *Pharmacoepidemiology and Statistical Science Food and Drug Administration (FDA)*. United State of America.

Clara, Maria. 2018. Validasi Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Fase Terbalik Pada Penetapan Kadar Kafein Dalam Kopi Bubuk Murni Robusta Merek "X". Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Farmasi, Yogyakarta.

Commission of The European Communities. 2002. *Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning The Performance of Analytical Methods and The Interpretation of Results*. Commission of The European Communities.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2017, Farmakope Herbal Indonesia Edisi II. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal 502-505.

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: 5 Mei 2021).

Dong, Michael W. 2013. The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities. *LCGC North Am*, 31(6) : Hal 472-479.

Erpina, E., Mohamad Rafi, Latifah Kosim Darusman, Arum Vitasari, Budi Riza Putra dan Eti Rohaeti. 2017. Simultaneous quantification of curcuminoids and xanthorrhizol in *Curcuma xanthorrhiza* by highperformance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. DOI: 10.1080/10826076.2017.1343729.

Faridah, Novi Yantih, Netty Herawati. 2008. Penetapan Simultan Kadar Fenilpropanolamin Hidroklorida dan Klorfeniramin Maleat dalam Tablet secara Spektrofotometri. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 6(1): Hal 29-34.

Fauzana, Dianita L. 2010. Perbandingan Metode Maserasi, Remaserasi, Perkolasi, dan Reperkolasi Terhadap Rendemen Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*). Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Teknologi Pertanian Institute Pertanian Bogor, Bogor.

Foosie, S., Maedeh Mohammadi, Ghasem D. Najafpour dan Ali Akbar Moghadamnia. 2016. Extraction of Bioactive Compound Curcumin from Turmeric (*Curcuma Longa L.*) Via Different Routes: A Comparative Study. *J. Biotechnol.* 13(3): Hal 173 – 180.

Fornstedt, T., Patrik Forssén dan Douglas Westerlund. 2015. Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution. *Anal. Sep. Sci., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*. Hal: 1–24. DOI: 10.1002/9783527678129.assep001.

Gantait, A., Topu Barman, dan Pulok K. Mukherjee. 2011. Validated Method Form Estimation of Curcumin in Turmeric Powder. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 10(2) : Hal 247-250.

Halim, Mohd Rohaimi Bin Ab. 2014. *Validation of Gc-Ms Method for Standardization of Curcuma xanthorrhiza Extracts Using Biochemical Markers, Ar-Curcumene and Xanthorrhizol*. Malaysia: Universiti Sains Malaysia.



Hanwar D., Vivi Resty Handayani, Andi Suhendi. 2020. Validasi Metode HPLC untuk Analisis Kurkumin pada Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*). *The 12th University Research Colloquium*. Hal 371-378.

Hasnaeni, Wisdawati, Suriati Usman. 2019. The Effect of Extraction Method on Yield Value and Phenolic Content of Beta-Beta (*Lunasia amara Blanco*) Bark Extract. *Galenika Journal of Pharmacy*, 5(2): Hal 175-182.

Ihsan, Bachtiar Rifai P., Ika Putri Nurhayati, Intan Maysaroh. 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. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*. 4(1): Hal 29-34.

International Conference on Harmonisation. 2006. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *ICH Harmonised Tripartite Guideline*. 2(1): 6

Jantan, I., Fadlina Chany Saputri, Muhammad Naeem Qaisar, dan Fhataheya Buang. 2012. Correlation between Chemical Composition of *Curcuma domestica* and *Curcuma xanthorrhiza* and Their Antioxidant Effect on Human Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Hindawi Publishing Corporation*. Hal 1-10.

Jamal, S., Supardi S., Loupatty A.M. 2006. Beberapa Faktor yang Berhubungan dengan Penggunaan Obat Tradisional Dalam Pengobatan Sendiri di Indonesia. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 31(1): Hal 25-32.

Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2016. *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 6 Tahun 2016 Tentang Formularium Obat Herbal Asli Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Kim, Mi Bo, Changhee Kim, Youngwoo Song, dan Jae-Kwan Hwang. 2014. Antihyperglycemic and Anti-Inflammatory Effects of Standardized *Curcuma xanthorrhiza Roxb.* Extract and Its Active Compound Xanthorrhizol in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Hindawi Publishing Corporation*. Hal 1-10.

Khuri, Andre I. 2017. Response Surface Methodology and Its Applications in Agricultural and Food Science. *Biom Biostat International Journal*. 5(5): Hal 155-163.

Lee, Hyung Jung, Si-Mook Kang, Seung-Hwa Jeong, Ki-Ho Chunga, Baek-II Kim. 2017. Antibacterial photodynamic therapy with curcumin and *Curcuma xanthorrhiza* extract against *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 20(2017): Hal 116–119.

Li, Hai-Xia, Hong-Ling Zhang, Nan Zhang, Ning Wang, Yao Yang, Zhen-Zhong Zhang. 2014. Isolation of three curcuminoids for stability and simultaneous determination of only using one single standard substance in turmeric colour principles by HPLC with ternary gradient system. *Food Science and Technology*. 57: Hal 446-451.

Manimaran, S., K. Sambath Kumar, R. Gayathri, K. Raja, N. Rajkamal, M. Venkatachalapathy, G. Ravichandran, C. Lourdu EdisonRaj. 2018. Medicinal

Plant Using Ground State Stabilization of Natural Antioxidant Curcumin by Keto-Enol Tautomerisation. *Natural Products and Bioprospecting*. 2018(3): 369-390.

Marina, Nur Hidayat, Edi Priyono Utomo, Egi Agustian. 2013. *Pengaruh tekanan terhadap hasil refinery minyak nilam dengan metode ekstraksi fluida superkritik*. Malang: Universitas Brawijaya.

Moffat Anthony C., M. David Osselton, Brian Widdop. 2011. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material Fourth Edition*. London: Pharmaceutical Press.

Mondal, S., Soumen Ghosh, Satya P. Moulik. 2016. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV-visible and steady-state fluorescence spectral study. *Journal of Photochemistry & Photobiology*, 2016(158): 212-218.

National Center for Biotechnology Information. 2021. PubChem Compound Summary for CID 969516, Curcumin. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>. (Accessed: 2 Mei 2021).

Ningsih, G., Shela Ratri Utami, Ratri Ariatmi Nugrahani. 2015. Pengaruh Lamanya Waktu Ekstraksi Remaserasi Kulit Buah Durian Terhadap Rendemen Saponin dan Aplikasinya Sebagai Zat Aktif Anti Jamur. *KONVERSI*. 4(1): 8-16.

Ngadino, Setiawan, Koerniasari, Ernawati dan S. A. Sudjarwo. 2018. Evaluation of antimycobacterial activity of *Curcuma xanthorrhiza* ethanolic extract against Mycobacterium tuberculosis H37Rv in vitro. *Veterinary World*. 11(3): Hal 368-372.

Nugroho, L.H., 2014. Peran Anatomi dalam Studi Biosintesis dan Akumulasi Metabolit Sekunder pada Tumbuhan. Naskah Pidato Pengukuhan Guru Besar Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Nurhadi, B., R A Saputra, T A Setiawati, S N Husein, F R Faressi, C D Utari, N Sukri, I L Kayaputri and I S Setiasih. 2019. Comparison of *Curcuma domestica* and *Curcuma xanthorrhiza* oleoresins extracted using maceration, Soxhlet, and ultrasound-assisted extraction (UAE). *International Conference on Food and Bio-Industry*. Doi:10.1088/1755-1315/443/1/012074.

Pandey, Amita dan Shalini Tripathi. 2014. Concept of Standardization, Extraction and Pre-Phytochemical Screening Strategies for Herbal Drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2(5): Hal 115-119.

Patel, K., Namrata Panchal, Dr. Pradnya Ingle. 2019. Techniques Adopted for Extraction of Natural Products Extraction Methods: Maceration, Percolation, Soxhlet Extraction, Turbo distillation, Supercritical Fluid Extraction. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science (IJARCS)*. 6(4): Hal 1-12.

- Paulucci, Viviane P., Renê O. Couto, Cristiane C. C. Teixeira, Luis Alexandre P. Freitas. 2012. Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 23(1): Hal 94-100.
- Pramono, S., Fitriana Hayyu Arifah, Fitrawan Hernuza Pribadi, Agung Endro Nugroho. 2018. Hepatoprotective activity of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. on paracetamol-induced liver damage in rats and correlation with their chemical compounds. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 42(4): 188-195.
- Priyadarsini, K. I. 2014. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12), pp. 20091–20112. doi:10.3390/molecules191220091.
- Rosidi, Ali. 2020. The difference of Curcumin and Antioxidant activity in *Curcuma Xanthorrhiza* at different regions. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. 10(1): Hal 14-18.
- Rosidi, A., Ali Khomsan, Budi Setiawan, Hadi Riyadi, dan Dodik Briawan. 2016. Antioxidant Potentian of Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Pakistan Journal of Nutrition*. 15(6): Hal 556-560.
- Sayuti, M. 2017. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi, Bagian Dan Jenis Pelarut Terhadap Rendemen Dan Aktifitas Antioksidan Bambu Laut (*Isis Hippuris*). *Technology Science and Engineering Journal*, 1(3): Hal 166-174.
- Santoso, Yosua A. 2019. Validasi Metode Analisis *High Performance Liquid Chromatography* Fase Terbalik Pada Penetapan Kadar Kurkumin Dalam Ekstrak Rimpang Kunyit. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Setiawansyah, A., Sellyma Yousiberrica W, Nadya A Turisia, Rosnani, Yuni Aprianti. 2018. Optimization of Method and Extraction Solvent of Curcumin Content from *Curcuma xanthorrhiza*. *Politeknik Farma Husada Mataram*. ISBN: 978-602-50761-9-0.
- Shabir, Ghulam A. 2003. Validation of High-Performance Liquid Chromatography Methods For Pharmaceutical Analysis Understanding The Differences and Similarities Between Validation Requirements of The US Food and Drug Administration, The US Pharmacopeia and The International Conference On Harmonization. *Journal of Chromatography*, 987(2003): Hal 57–66.
- Singh, J. 2008. Maceration, Percolation and Infusion Techniques for the Extraction of Medicinal and Aromatic Plants. *Scientist E II, Botany and Pharmacognosy*. Hal 67-82.
- Sutaja, M.K., Indira Priyadarsini, Dipak K. Palit, Tulsi Mukherjee. 2000. Effect of Solvent on The Excited-State Photophysical Properties of Curcumin. *Photochemistry and Photobiology*, 72(5): Hal 625-631.
- Syamsuddin. Raden Aldizal Mahendra R., Farid Perdana, Firly Suci Mutiaz, Vicka Galuh, Apriliani Putri Ayu Rina, Novia Dwi Cahyani, Sri Aprilya, Rahma Yanti, Fezi Khendri. 2019. Temulawak Plant (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) as a Traditional Medicine. *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*. 10(1): Hal 51-65.

Synder, L. R., Kirkland, J. J. dan Glajch, J. L. 2010. *Practical HPLC Method Development, 2<sup>nd</sup> Edition*. New York: John Wiley and Sons. (Hal 687-688, 690, 691, 695).

Wahyono, Slamet dan Dyah Subositi. 2019. Study of the genus *Curcuma* in Indonesia used as traditional herbal medicines. *BIODIVERSITAS*. 20(5): Hal 1356-1361.

Wakte, P.S., B.S. Sachin, A.A. Patil, D.M. Mohato, T.H. Band, D.B. Shinde. 2011. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*. *Separation and Purification Technology*. 79: Hal 50–55.

Watson, David G. 2012. *Pharmaceutical Analysis: A textbook for Pharmacy Student and Pharmaceutical Chemists*. China: Churchill Livingstone ELSEVIER.

Weston, A., dan Phyllis R Brown. 1997. *HPLC and CE Principle and Practice*. California: W. B. Saunders Company

WHO. 2003. The world Health Report 2003. [https://www.who.int/whr/2003/en/whr03\\_en.pdf?ua=1](https://www.who.int/whr/2003/en/whr03_en.pdf?ua=1) (diakses pada 3 November 2020).

WHO. 1999. *WHO Monographs On Selected Medicinal Plants Volume 1*. Switzerland: WHO Library Cataloguing.

Williamson, Elizabeth, Samuel Driver, dan Karen Baxter. 2009. *Stockley's Herbal Medicines Interactions*. USA: Pharmaceutical Press.

Yuan, H., Qianqian Ma, Li Ye dan Guangchun Piao. 2016. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*. 21(559): Hal 1-18.

Zielinska, A., Henrique Alves, Vânia Marques, Alessandra Durazzo, Massimo Lucarini, Thais F. Alves, Margreet Morsink, Niels Willemen, Piotr Eder, Marco V. Chaud, Patricia Severino, Antonello Santini, dan Eliana B. Souto. 2020. Properties, Extraction Methods, and Delivery Systems for Curcumin as a Natural Source of Beneficial Health Effects. *Medicina*. 56(336): Hal 1-19. Doi:10.3390/medicina56070336.

Zhang, Qing-Wen, Li-Gen Lin and Wen-Cai Ye. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med*. 13(20): Hal 1-26.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Determinasi Tanaman Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)



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](mailto:materiamedicabatu@jatimprov.go.id)

**KOTA BATU 65313**

Nomor : 074/ 113/ 102.7-A/ 2021  
 Sifat : Biasa  
 Perihal : Determinasi Tanaman Temulawak

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : SHIFA NIDA'UL KHOFIYYA  
 NIM : 175070507111014  
 Fakultas : KEDOKTERAN (FARMASI), UNIVERSITAS BRAWIJAYA

1. Perihal determinasi tanaman temulawak

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)  
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)  
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)  
 Kelas : Liliopsida (berkeping satu / monokotil)  
 Bangsa : Zingiberales  
 Suku : Zingiberaceae  
 Marga : Curcuma  
 Jenis : *Curcuma xanthorrhiza* Roxb.  
 Sinonim : Temulawak, temu putih (Indonesia), Temulawak (Jawa), Koneng Gede (Sunda), Temulabak (Madura).  
 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

: Temulawak termasuk jenis tumbuh-tumbuhan herba yang batang pohonnya berbentuk batang semu dan tingginya dapat mencapai 2 meter. Daunnya lebar dan pada setiap helaian dihubungkan dengan pelepah dan tangkai daun yang agak panjang. Temulawak mempunyai bunga yang berbentuk unik (bergerombol) dan berwarna kuning tua. Rimpang temulawak sejak lama dikenal sebagai bahan ramuan obat. Aroma dan warna khas dari rimpang temulawak adalah berbau tajam dan daging buahnya berwarna kekuning-kuningan.

3. Bagian yang digunakan : Rimpang.

4. Penggunaan : Penelitian tugas akhir.

5. Daftar Pustaka

- Anonim. 2006. *Serial Tanaman Obat "Temulawak"*. 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.

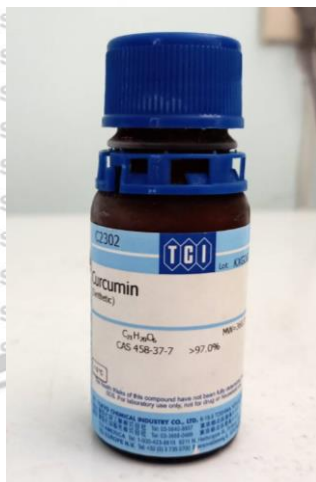
Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 04 Februari 2021

KEPALA UPT LABORATORIUM HERBAL  
 MATERIA MEDICA BATU



## Lampiran 2. coA Kurkumin TCI.



## 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](mailto:globalbusiness@TCIchemicals.com)

### Lampiran 3. Proses Ekstraksi Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*).



MT1: 50,0015 gram MT2: 50,0009 gram MT3: 50,0011 gram

RT1: 50,0008 gram RT2: 50,0015 gram RT3: 50,0003 gram

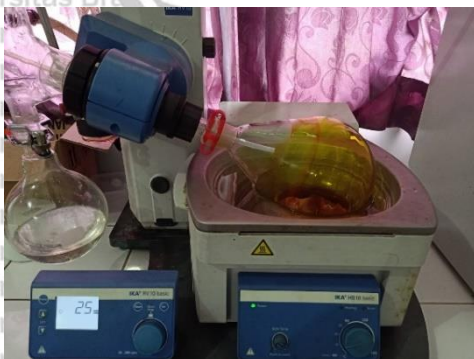
**Gambar 1. Penimbangan Simplisia**



**Gambar 2. Maserasi dan Remaserasi Simplisia Rimpang Temulawak**



**Gambar 3. Filtrasi menggunakan kain saring dan kertas saring**

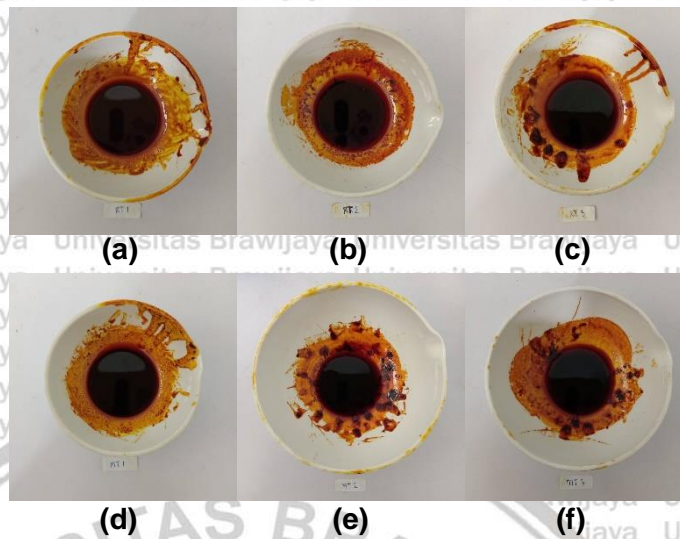


**Gambar 4. Evaporasi menggunakan Rotary Evaporator**



(a) (b)

**Gambar 5. Ekstrak (a) Remaserasi (b) Maserasi Kental setelah Evaporasi**



**Gambar 6. Ekstrak (a) RT1 (b) RT2 (c) RT3 (d) MT1 (e) MT2 (f) MT3 dengan Massa Konstan**





#### Lampiran 4. Perhitungan Bobot Susut Ekstrak Rimpang Temulawak.

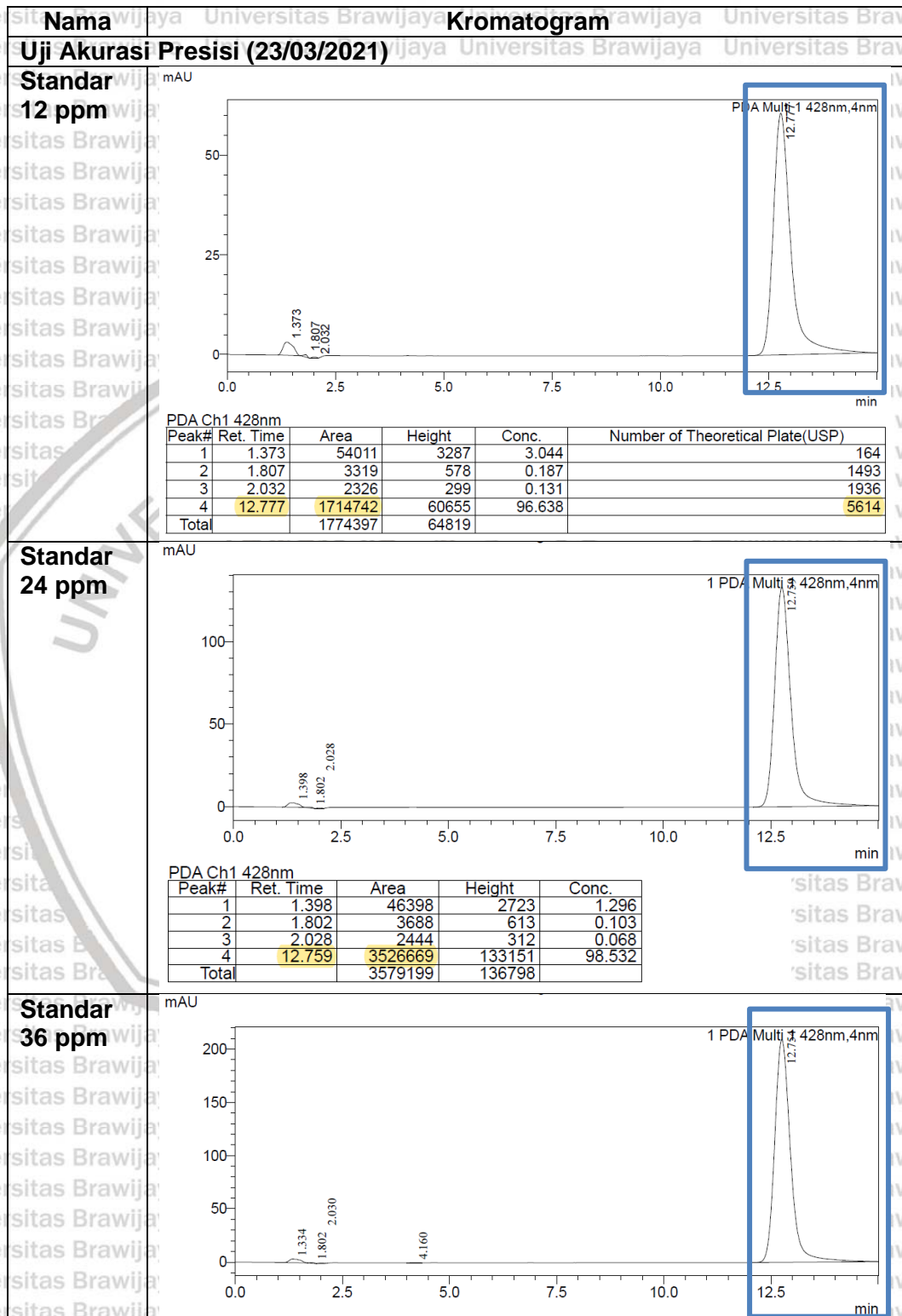
Nama Sampel	Berat Cawan Kosong (g)	Penimbangan 1 (g)	Penimbangan 2 (g)	Massa Ekstrak (g)	Persen bobot susut (%)
MT1	31,7092	35,1860	35,1709	0,0151	0,4343
MT2	67,4171	70,7328	70,7078	0,0250	0,7539
MT3	49,8505	53,1279	53,1061	0,0218	0,6651
RT1	30,9112	34,1310	34,1148	0,0162	0,5031
RT2	31,3768	34,7154	34,6978	0,0176	0,5271
RT3	50,8813	54,5165	54,4950	0,0215	0,5914

Nama Sampel	Berat Cawan Kosong (g)	Penimbangan 1 (g)	Penimbangan 2 (g)	Massa Ekstrak (g)	Persen bobot susut (%)
MT1	31,7092	34,8061	34,8025	0,0036	0,1162
MT2	67,4171	70,2956	70,2912	0,0044	0,1528
MT3	49,8505	52,7344	52,7296	0,0048	0,1664
RT1	30,9112	33,8433	33,8413	0,0020	0,0628
RT2	31,3768	34,3215	34,3183	0,0032	0,1087
RT3	50,8813	54,0783	54,0741	0,0042	0,1313

Nama Sampel	Berat Cawan Kosong (g)	Penimbangan 1 (g)	Penimbangan 2 (g)	Massa Ekstrak (g)	Persen bobot susut (%)
MT1	31,7092	34,8025	34,7993	0,0032	0,1034
MT2	67,4171	70,2912	70,2890	0,0022	0,0765
MT3	49,8505	52,7296	52,7255	0,0041	0,1424
RT1	30,9112	33,8413	33,8389	0,0024	0,0815
RT2	31,3768	34,3183	34,3157	0,0026	0,0883
RT3	50,8813	54,0741	54,0709	0,0032	0,1002

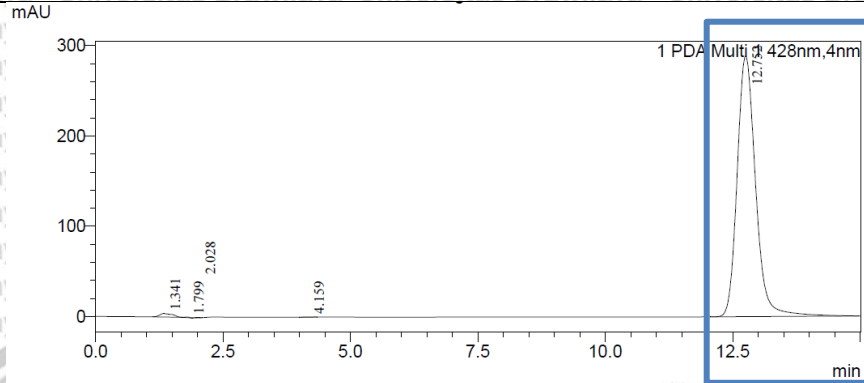
Bobot pengeringan ditimbang pada selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Farmakope Herbal Indonesia Edisi II, 2017).

## Lampiran 5. Kromatogram Standar Kurkumin.



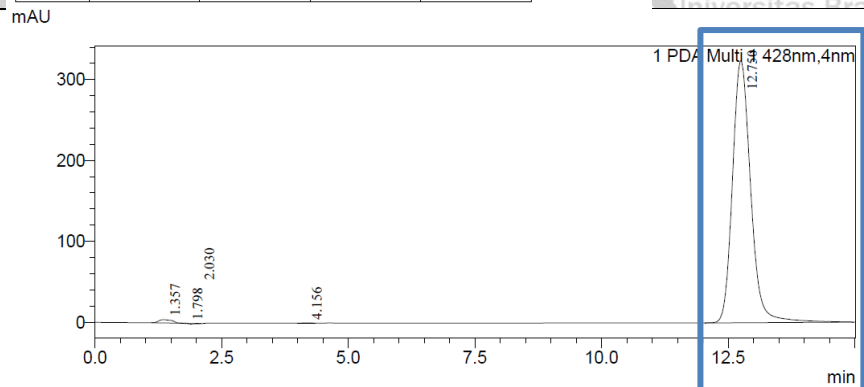
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	1.334	58890	3286	1.082
2	1.802	3293	582	0.060
3	2.030	2488	315	0.046
4	4.160	1422	135	0.026
5	12.754	5376735	209355	98.786
Total		5442828	213674	

**Standar  
48 ppm**



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	1.341	68330	3933	0.928
2	1.799	3134	565	0.043
3	2.028	2458	308	0.033
4	4.159	1845	178	0.025
5	12.752	7288400	288977	98.971
Total		7364166	293961	

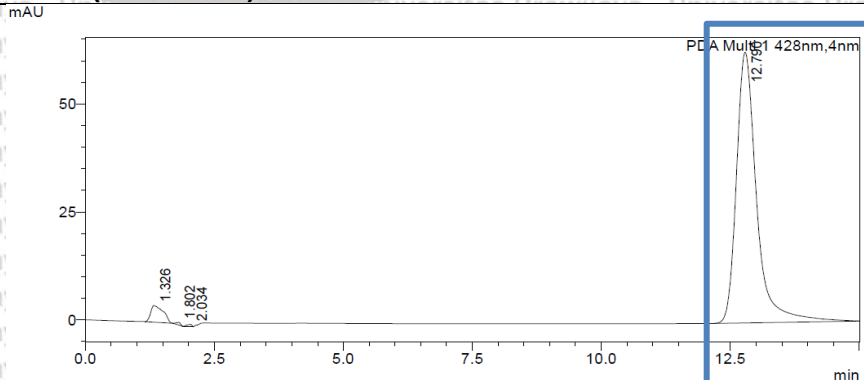
**Standar  
54 ppm**



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	1.357	76221	4127	0.930
2	1.798	3033	551	0.037
3	2.030	2472	306	0.030
4	4.156	1906	186	0.023
5	12.750	8116366	323642	98.980
Total		8199998	328812	

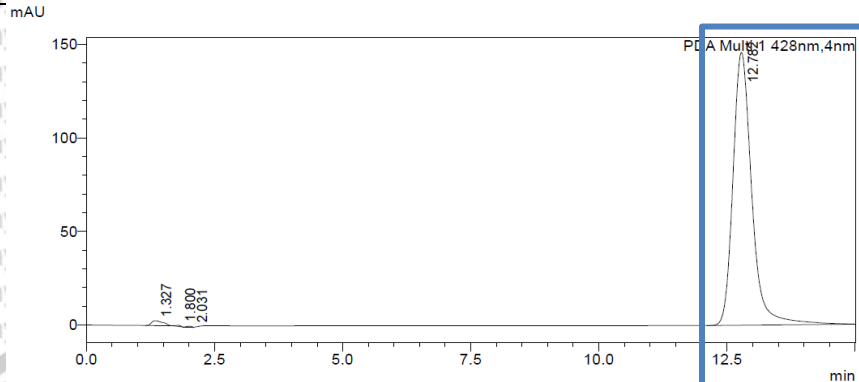
**Penetapan Kadar (24/03/2021)**

**Standar  
12 ppm**



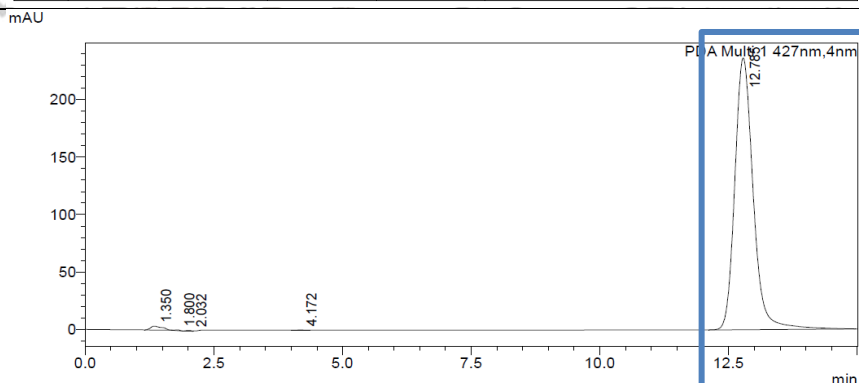
PDA Ch1 428nm					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Number of Theoretical Plate(USP)
1	1.326	65028	3848	3.655	146
2	1.802	3453	616	0.194	1644
3	2.034	3424	510	0.192	1933
4	12.790	1707199	62659	95.958	5955
Total		1779103	67632		

**Standar  
24 ppm**



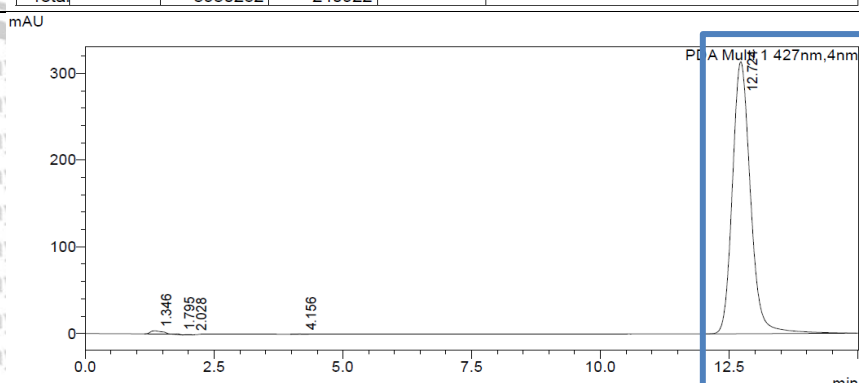
PDA Ch1 428nm					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Number of Theoretical Plate(USP)
1	1.327	41109	2569	1.089	155
2	1.800	3976	669	0.105	1442
3	2.031	3455	516	0.092	1948
4	12.782	3725732	145683	98.714	6369
Total		3774272	149437		

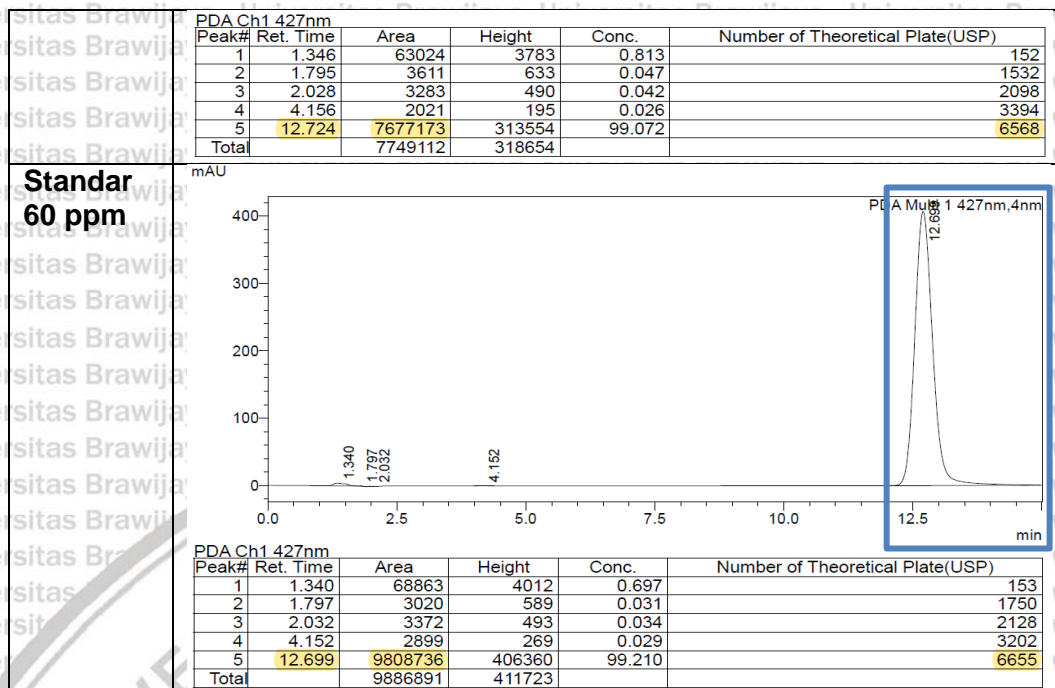
**Standar  
36 ppm**



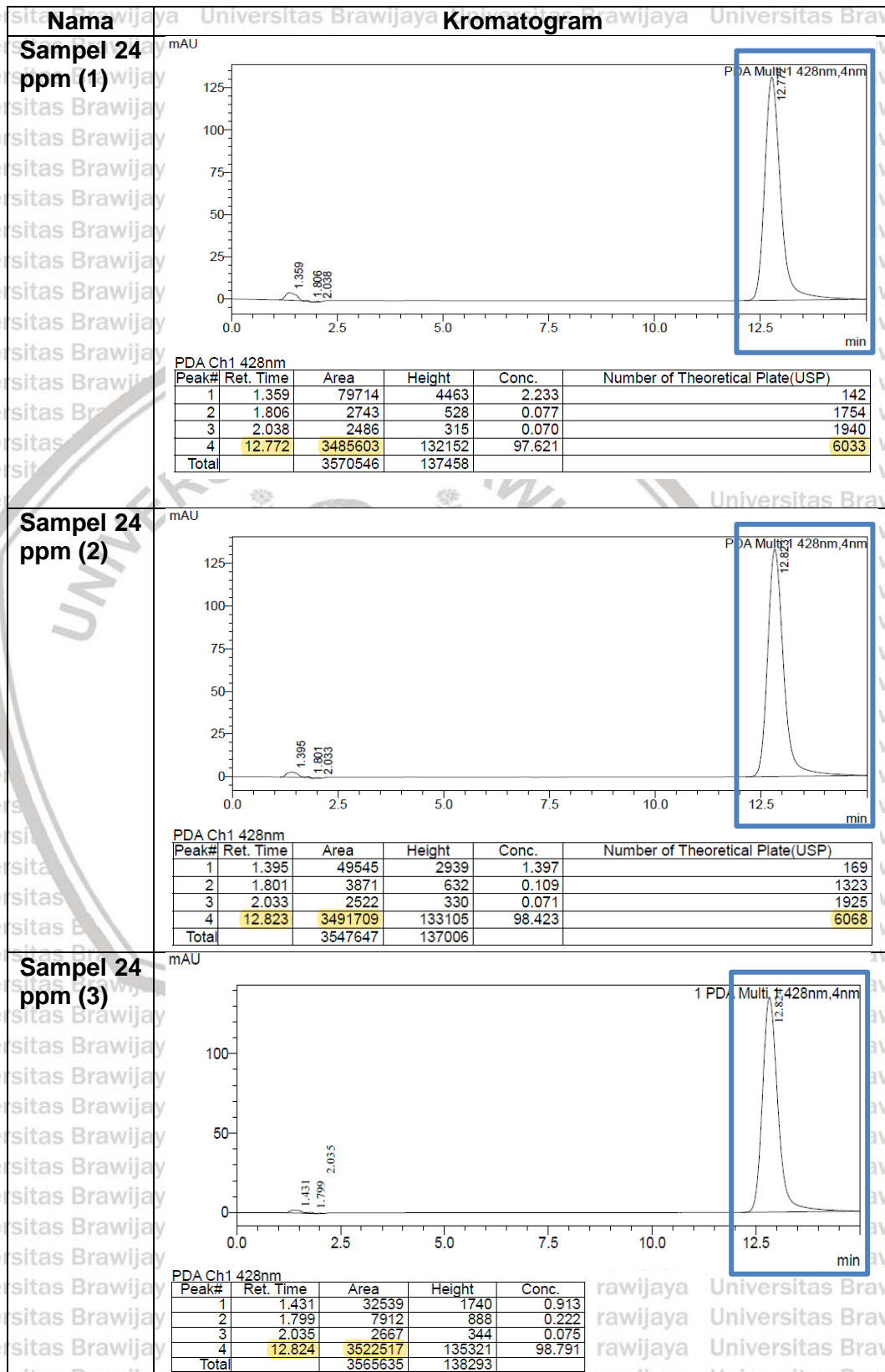
PDA Ch1 427nm					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Number of Theoretical Plate(USP)
1	1.350	53295	3236	0.896	157
2	1.800	3793	650	0.064	1437
3	2.032	3352	499	0.056	1934
4	4.172	1791	172	0.030	3378
5	12.785	5888030	236364	98.954	6503
Total		5950262	240922		

**Standar  
48 ppm**

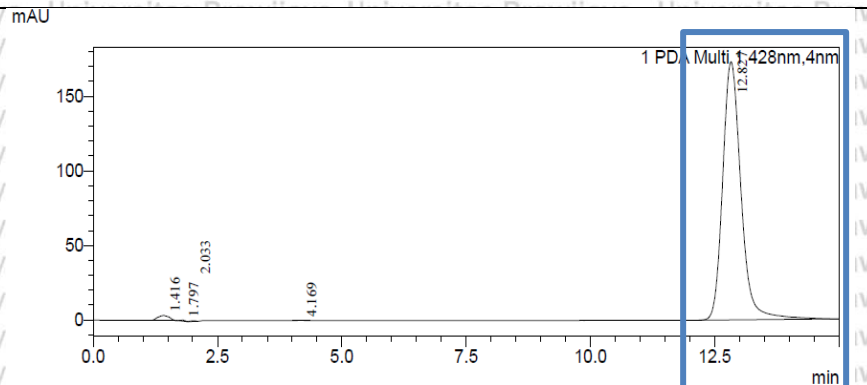




## Lampiran 6. Kromatogram Sampel Uji Akurasi dan Presisi.

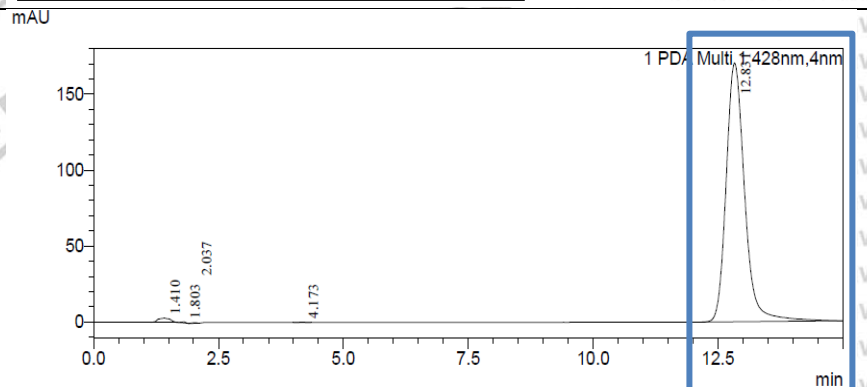


**Sampel 30  
ppm (1)**



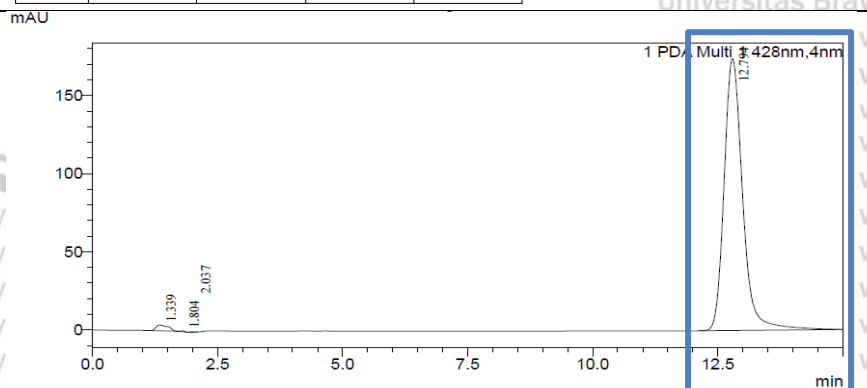
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	1.416	51680	3377	1.145
2	1.797	3806	621	0.084
3	2.033	2548	324	0.056
4	4.169	1547	154	0.034
5	12.827	4452771	172957	98.680
Total		4512353	177432	

**Sampel 30  
ppm (2)**



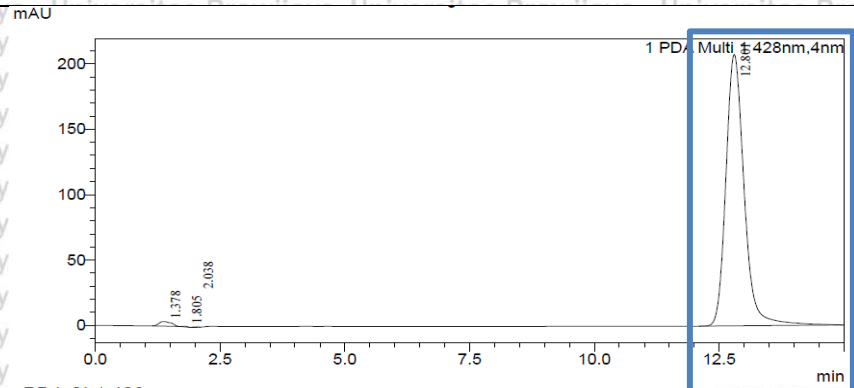
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	1.410	45607	2753	1.025
2	1.803	3822	627	0.086
3	2.037	2567	331	0.058
4	4.173	1524	155	0.034
5	12.831	4394952	170374	98.797
Total		4448472	174240	

**Sampel 30  
ppm (3)**



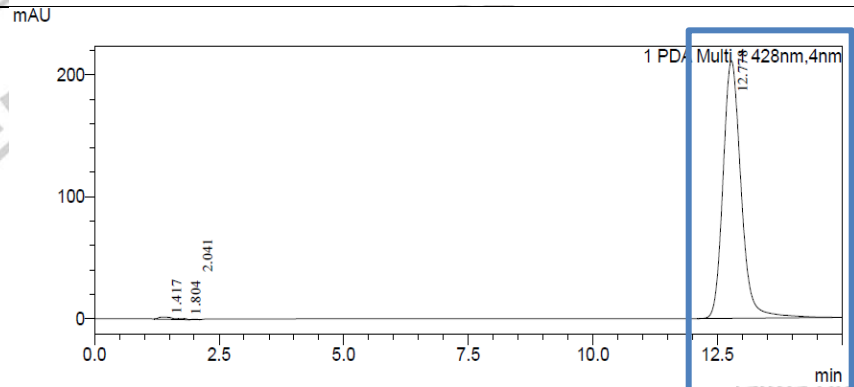
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	1.339	61950	3624	1.358
2	1.804	3264	573	0.072
3	2.037	2652	335	0.058
4	12.794	4493020	173858	98.512
Total		4560886	178390	

**Sampel 36  
ppm (1)**



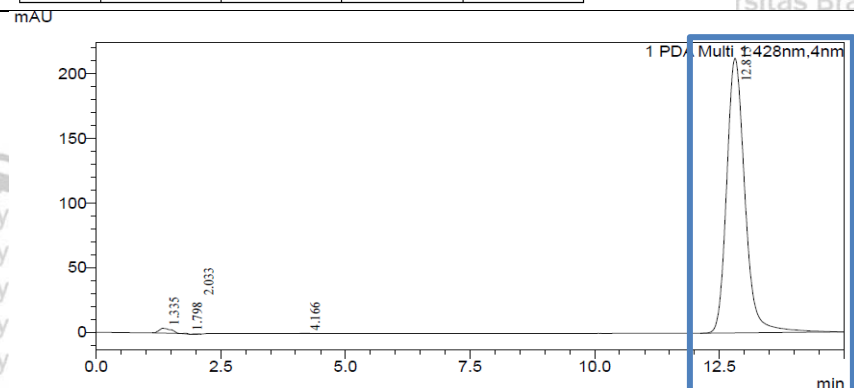
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	1.378	61919	3611	1.154
2	1.805	3296	577	0.061
3	2.038	2605	328	0.049
4	12.801	5298393	207502	98.736
Total		5366214	212017	

**Sampel 36  
ppm (2)**



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	1.417	29983	1643	0.558
2	1.804	7707	887	0.143
3	2.041	2699	342	0.050
4	12.778	5333731	211108	99.248
Total		5374120	213980	

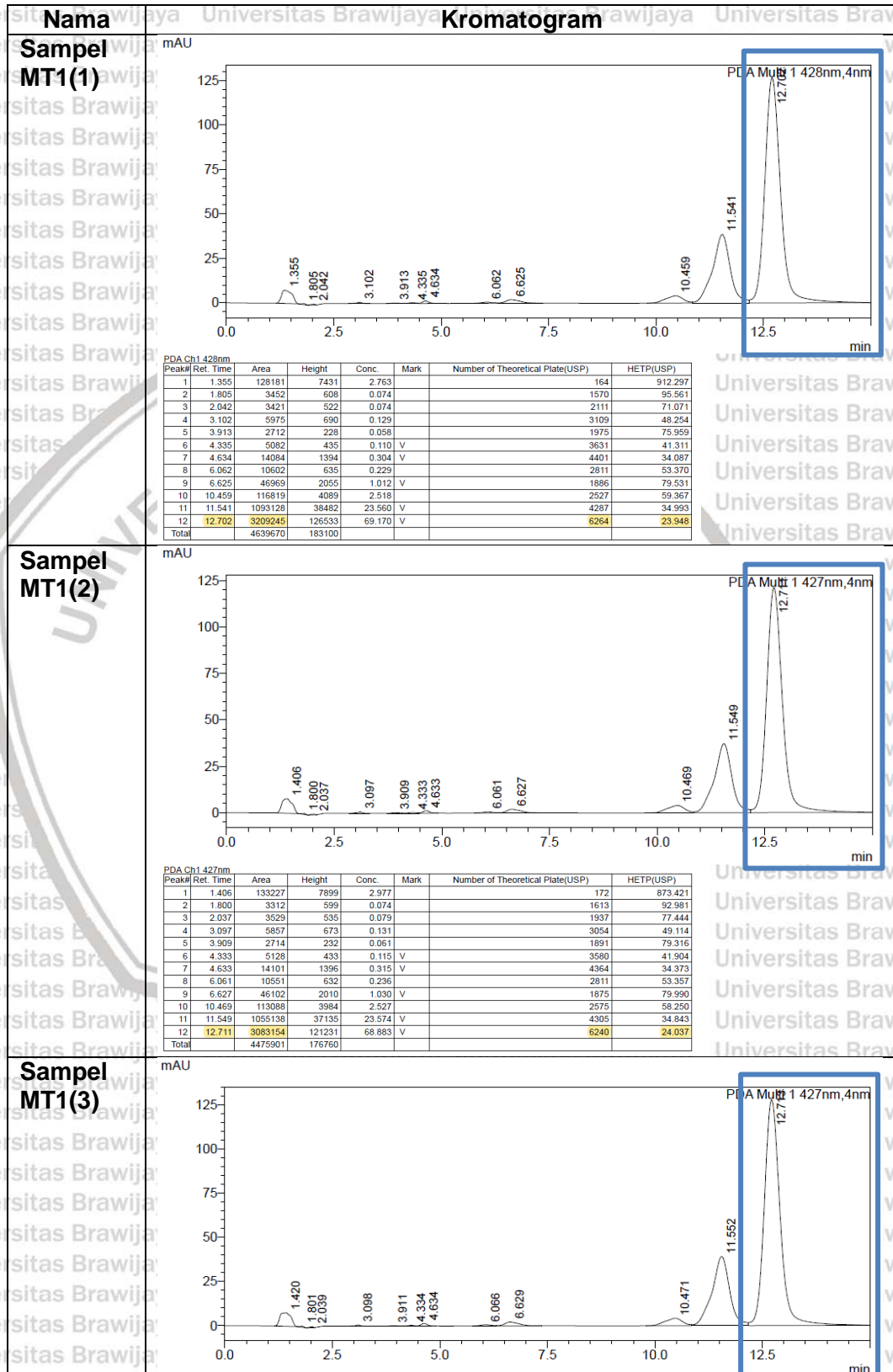
**Sampel 36  
ppm (3)**



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	1.335	64199	3810	1.169
2	1.798	3111	553	0.057
3	2.033	2595	317	0.047
4	4.166	1521	146	0.028
5	12.815	5421066	212388	98.700
Total		5492492	217214	

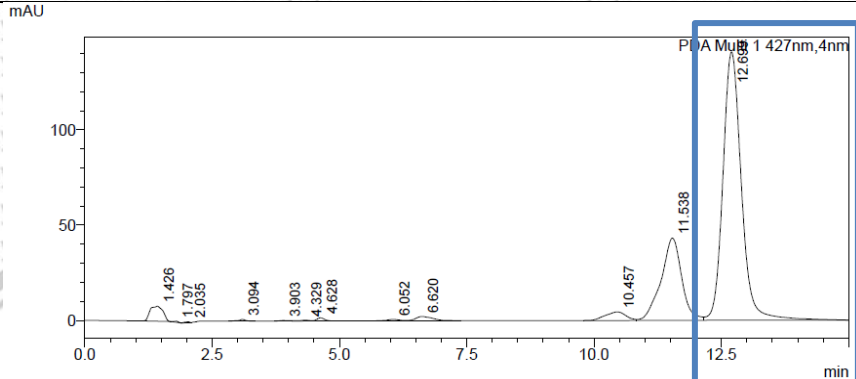


Lampiran 7. Kromatogram Sampel Ekstrak Temulawak.



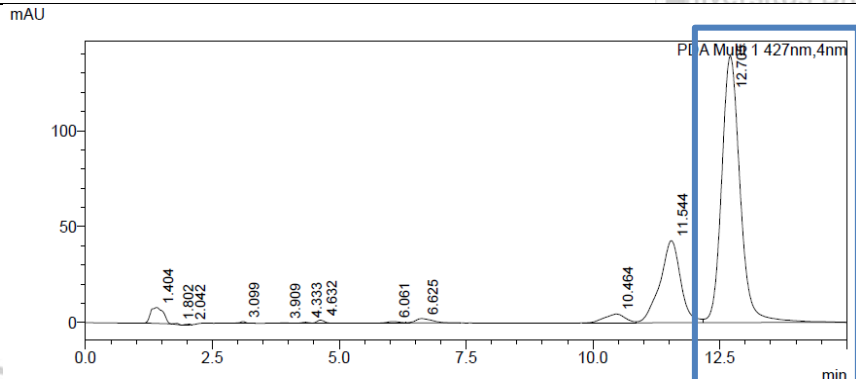
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.420	136396	7701	2.893		182	823.922
2	1.801	3386	607	0.072		1695	94.063
3	2.039	3498	525	0.074		1949	76.975
4	3.098	6321	717	0.134		3036	49.415
5	3.911	2862	252	0.061		1910	78.515
6	4.334	5619	464	0.119	V	3504	42.809
7	4.634	14872	1466	0.316	V	4360	34.406
8	6.066	11174	668	0.238		2740	54.736
9	6.629	48874	2135	1.039	V	1884	79.617
10	10.471	119897	4216	2.549		2956	57.773
11	11.552	1110527	39207	23.066	V	4326	34.675
12	12.713	3241347	127959	68.899	V	6259	23.967
Total		4704474	185917				

**Sampel MT2(1)**



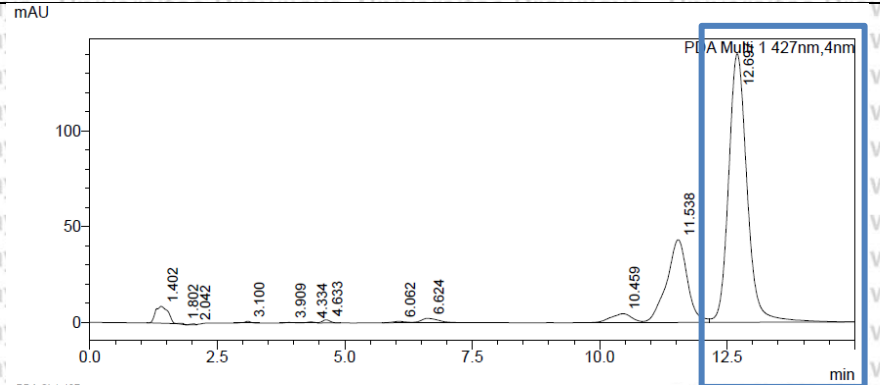
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.426	138702	7928	2.899		174	860.211
2	1.797	3141	580	0.061		1685	89.020
3	2.035	3526	526	0.069		1990	75.387
4	3.094	7655	877	0.149		3052	49.142
5	3.903	2993	259	0.058		2079	72.155
6	4.329	5922	508	0.115	V	3597	41.698
7	4.628	16693	1635	0.325	V	4343	34.535
8	6.052	12011	704	0.234		2699	55.582
9	6.620	51160	2208	0.995	V	1867	80.339
10	10.457	129414	4531	2.518		2470	60.736
11	11.538	1217723	43165	23.693	V	4340	34.561
12	12.699	3506656	140759	69.084	V	6264	23.947
Total		5139596	203681				

**Sampel MT2(2)**



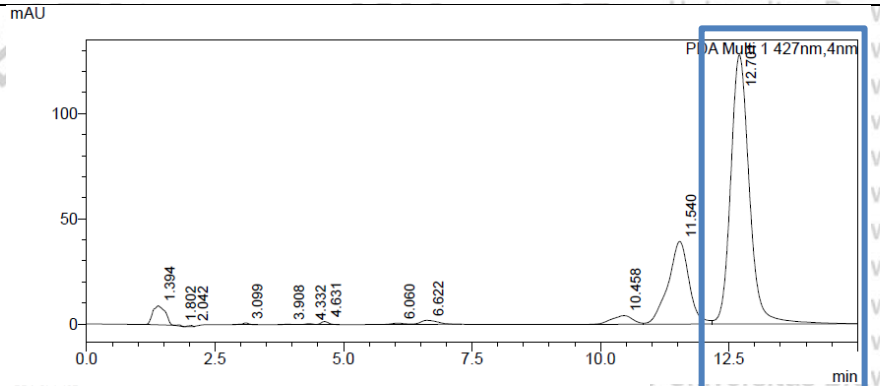
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.404	144178	8247	2.830		173	864.720
2	1.802	2988	571	0.059		1769	84.783
3	2.042	3533	520	0.069		1985	75.564
4	3.099	7909	899	0.155		3062	48.982
5	3.909	3143	270	0.062		1980	75.768
6	4.333	5920	502	0.116	V	3651	41.084
7	4.632	16234	1608	0.319	V	4373	34.301
8	6.061	12537	729	0.246		2659	56.406
9	6.625	52468	2273	1.030	V	1871	80.188
10	10.464	129333	4539	2.539		2524	59.427
11	11.544	1206577	42723	23.687	V	4344	34.529
12	12.705	3508922	139002	68.887	V	6264	23.948
Total		5093742	201883				

**Sampel MT2(3)**



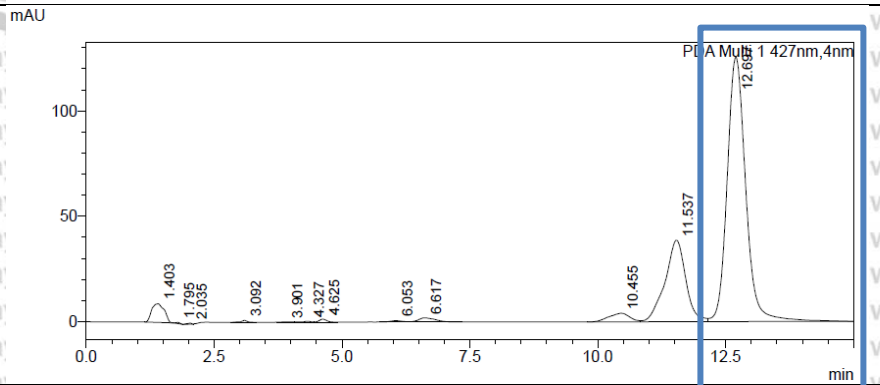
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.402	149404	8769	2.907		173	868.283
2	1.802	3028	571	0.059		1748	85.829
3	2.042	3486	511	0.068		1996	75.135
4	3.100	7894	912	0.154		3127	47.972
5	3.909	3171	271	0.062		2008	74.693
6	4.334	5862	506	0.114	V	3656	41.031
7	4.633	16309	1622	0.317	V	4405	34.049
8	6.062	12302	730	0.243		2674	56.104
9	6.624	52507	2398	1.022	V	1862	79.302
10	10.459	131513	4620	2.559		2550	58.813
11	11.538	121789	43202	23.698	V	4350	34.485
12	12.697	3535604	140385	68.797	V	6268	23.931
Total		5139168	204396				

**Sampel MT3(1)**



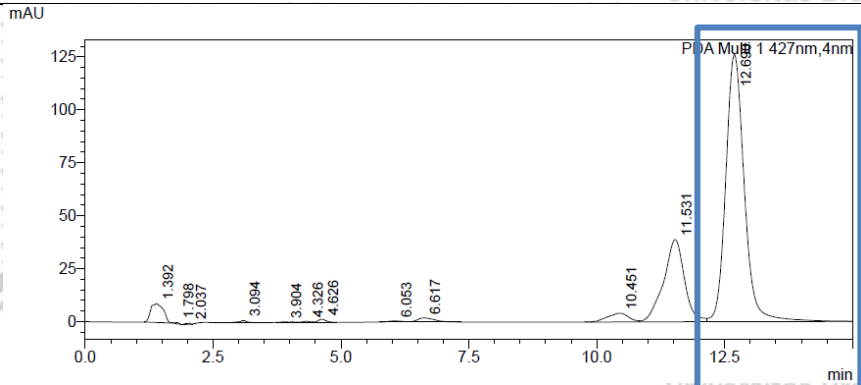
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.394	153066	9009	3.252		166	903.056
2	1.802	3010	569	0.064		1744	86.015
3	2.042	3456	508	0.073		1995	75.202
4	3.099	7743	887	0.165		3098	48.413
5	3.908	2566	232	0.055		2179	68.835
6	4.332	5265	448	0.112	V	3688	40.677
7	4.631	14758	1465	0.314	V	4386	34.202
8	6.060	10344	620	0.220		2783	53.693
9	6.622	44699	1952	0.950	V	1895	79.141
10	10.458	117883	4113	2.505		2783	53.899
11	11.540	111198	39261	23.609	V	4319	34.730
12	12.701	3232659	127903	68.683	V	6255	23.981
Total		4706647	186966				

**Sampel MT3(2)**



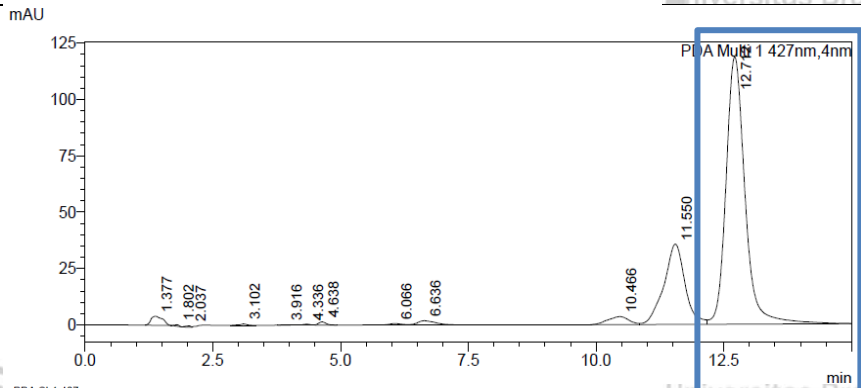
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.403	151071	8840	3.266		168	893.231
2	1.795	2931	566	0.063		1739	86.242
3	2.035	3509	520	0.076		1993	75.249
4	3.092	7701	886	0.166		3094	48.476
5	3.901	2737	236	0.059		2108	71.156
6	4.327	5228	452	0.113	V	3632	41.301
7	4.625	14663	1451	0.317	V	4371	34.320
8	6.053	10750	637	0.232		2762	54.308
9	6.617	45564	1972	0.985	V	1878	79.870
10	10.455	116430	4083	2.517		2496	60.107
11	11.537	1091885	38668	23.606	V	4344	34.531
12	12.697	3173073	125470	68.599	V	6237	24.048
Total		4625542	183783				

**Sampel MT3(3)**



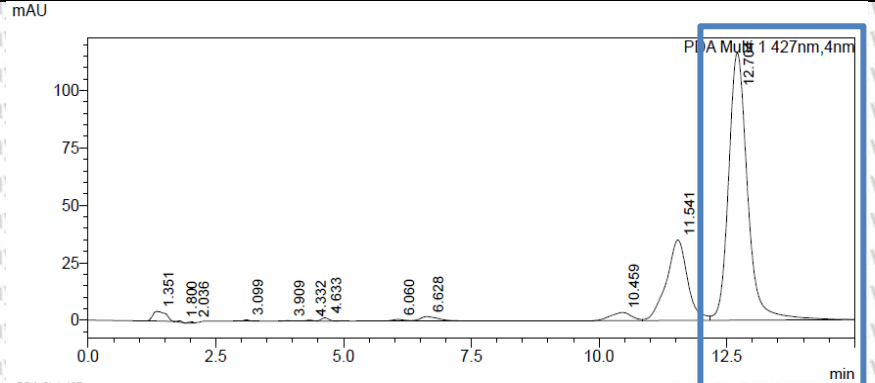
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.392	153069	8832	3.298		172	873.248
2	1.798	3291	598	0.071		1604	93.496
3	2.037	3532	519	0.076		1965	76.322
4	3.094	7973	914	0.172		3052	49.144
5	3.904	2726	240	0.059		2095	71.594
6	4.326	5454	457	0.118	V	3546	42.299
7	4.626	14872	1466	0.320	V	4352	34.466
8	6.053	10884	637	0.234		2734	54.859
9	6.617	45745	1990	0.986	V	1896	79.127
10	10.451	117667	4120	2.535		2476	60.576
11	11.531	1096321	38851	23.618	V	4334	34.608
12	12.690	3180303	126032	68.514	V	6260	23.961
Total		4641837	184657				

**Sampel RT1(1)**



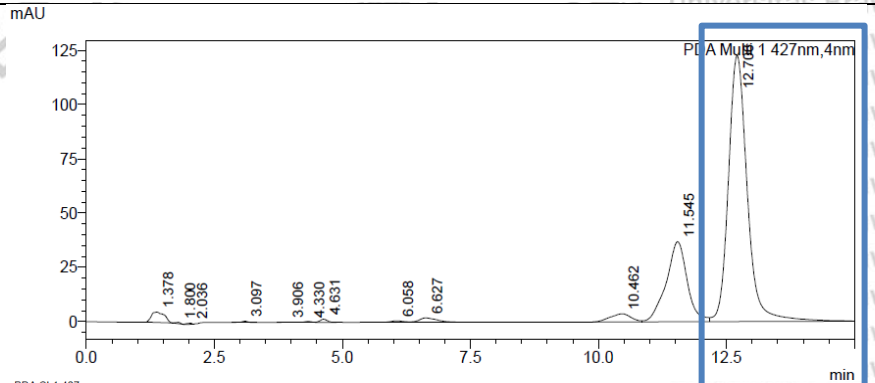
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.377	64345	3992	1.483		180	834.874
2	1.802	3468	613	0.080		1525	98.340
3	2.037	3569	554	0.082		1927	77.835
4	3.102	5339	605	0.123		3038	49.375
5	3.916	1440	165	0.033		4359	34.415
6	4.336	2902	353	0.067		5412	27.717
7	4.638	13467	1378	0.310	V	4604	32.579
8	6.066	10075	584	0.232		2564	58.511
9	6.636	44621	1852	1.028	V	1759	85.270
10	10.466	102368	3571	2.359		2459	60.989
11	11.550	1020583	35587	23.522	V	4253	35.269
12	12.712	3066654	118633	70.679	V	6193	24.221
Total		4338830	167885				

**Sampel RT1(2)**



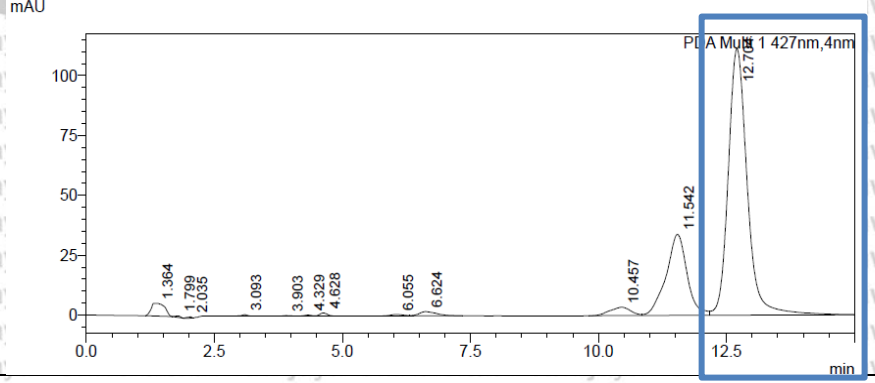
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.351	74859	4222	1.752		154	974.993
2	1.800	3364	609	0.079		1590	94.324
3	2.036	3677	560	0.086		1922	78.049
4	3.099	5409	617	0.127		3070	48.858
5	3.909	2758	238	0.065		1968	76.230
6	4.332	5528	452	0.129	V	3428	43.756
7	4.633	14500	1416	0.339	V	4300	34.885
8	6.060	10112	592	0.237		2599	57.708
9	6.628	44331	1865	1.038	V	1781	84.244
10	10.459	102781	3587	2.406		2507	59.823
11	11.541	1005162	35074	23.525	V	4256	35.244
12	12.704	3000194	116549	70.218	V	6208	24.163
Total		4272676	165780				

**Sampel RT1(3)**



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.378	84510	4775	1.886		159	941.045
2	1.800	3342	606	0.075		1599	93.809
3	2.036	3700	560	0.083		1987	75.502
4	3.097	5630	644	0.126		3013	49.790
5	3.906	2815	241	0.063		1982	75.680
6	4.330	5503	458	0.123	V	3548	42.278
7	4.631	14663	1450	0.327	V	4345	34.523
8	6.058	10761	620	0.240		2558	58.641
9	6.627	46117	1954	1.029	V	1786	83.988
10	10.462	108552	3788	2.422		2483	60.413
11	11.545	1053388	36872	23.508	V	4274	35.094
12	12.706	3141998	122620	70.119	V	6230	24.077
Total		4480979	174586				

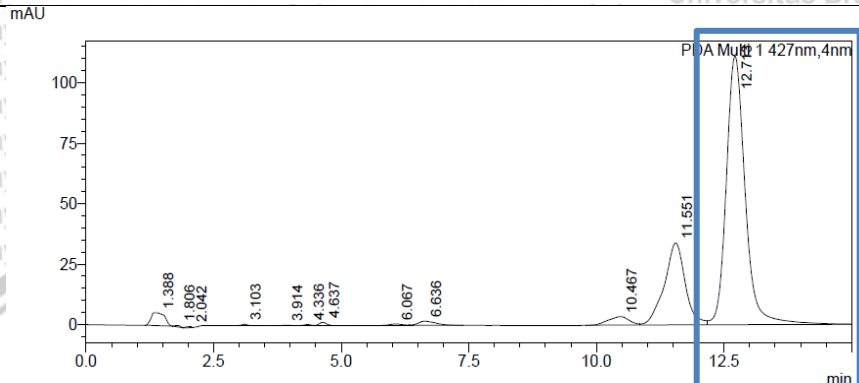
**Sampel RT2(1)**





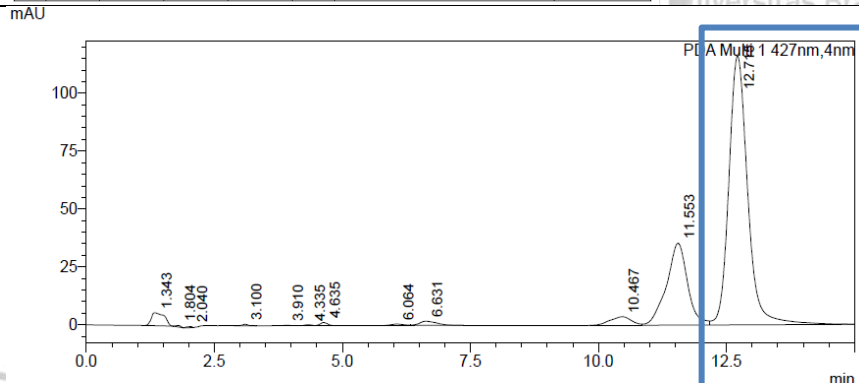
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.364	96579	5312	2.345		163	920.415
2	1.799	3737	641	0.091		1440	104.164
3	2.035	3395	513	0.082		1935	77.524
4	3.093	5255	601	0.128		3023	49.620
5	3.903	2541	220	0.062		2069	72.514
6	4.329	4847	414	0.118	V	3543	42.333
7	4.628	13499	1323	0.328	V	4314	34.769
8	6.055	9354	546	0.227		2620	57.242
9	6.624	40472	1723	0.983	V	1821	82.350
10	10.457	99981	3500	2.428		2512	59.707
11	11.542	966722	33847	23.474	V	4280	35.046
12	12.704	2871841	111369	69.735	V	6160	24.351
Total		4118224	160008				

**Sampel RT2(2)**



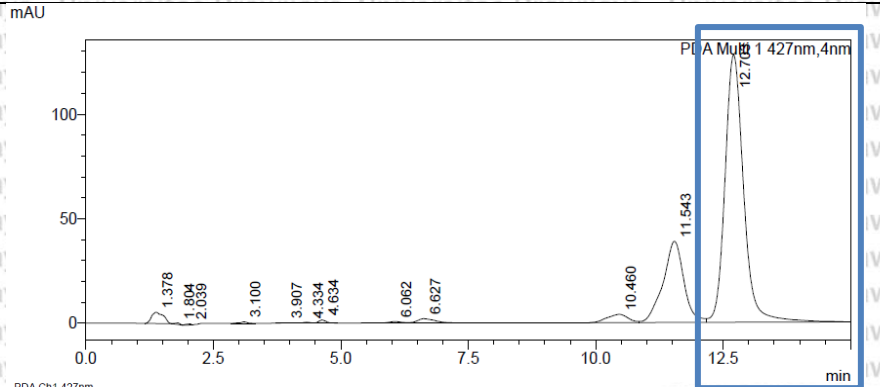
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.388	97060	5291	2.366		168	893.142
2	1.806	3514	627	0.086		1544	97.132
3	2.042	3333	500	0.081		2110	71.091
4	3.103	5288	604	0.129		3040	49.345
5	3.914	2407	215	0.059		2184	68.673
6	4.336	4784	408	0.117	V	3683	40.731
7	4.637	13327	1316	0.325	V	4365	34.362
8	6.067	9300	544	0.227		2696	56.648
9	6.636	40313	1711	0.983	V	1821	82.358
10	10.467	101221	3534	2.467		2506	59.846
11	11.551	964149	33876	23.499	V	4312	34.789
12	12.713	2858212	111082	69.663	V	6192	24.226
Total		4102907	159708				

**Sampel RT2(3)**



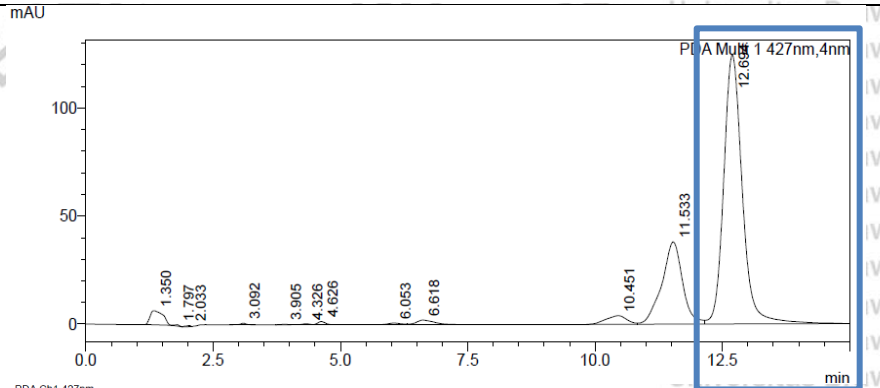
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.343	98595	5552	2.309		158	947.786
2	1.804	3466	625	0.081		1607	93.366
3	2.040	3565	534	0.083		2013	74.499
4	3.100	5460	624	0.128		3054	49.112
5	3.910	2528	220	0.059		2172	69.071
6	4.335	4820	418	0.113	V	3709	40.446
7	4.635	13540	1340	0.317	V	4381	34.237
8	6.064	9632	567	0.226		2674	56.098
9	6.631	42016	1800	0.984	V	1839	81.574
10	10.467	104470	3657	2.447		2506	59.868
11	11.553	1005667	35300	23.552	V	4292	34.950
12	12.715	2976211	116086	69.701	V	6210	24.155
Total		4269969	168724				

**Sampel RT3(1)**



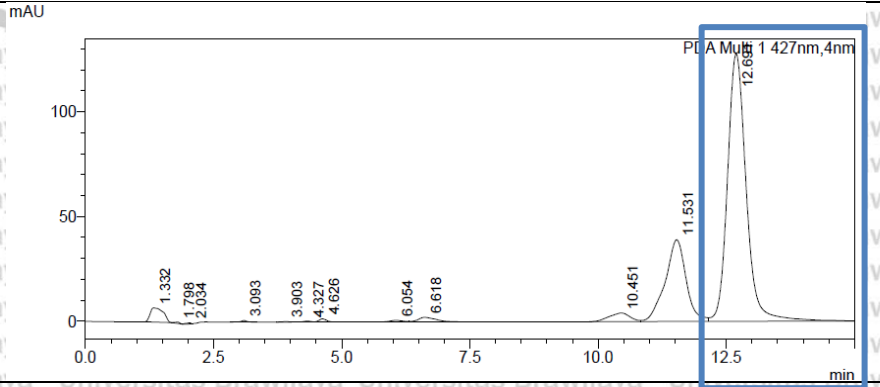
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.378	86514	5373	1.858		172	873.985
2	1.804	3624	642	0.078		1541	97.348
3	2.039	3694	554	0.079		1992	75.296
4	3.100	6231	712	0.134		3090	48.549
5	3.907	2772	242	0.060		2056	72.961
6	4.334	5478	469	0.118	V	3614	41.511
7	4.634	15160	1490	0.326	V	4338	34.579
8	6.062	10568	526	0.227		2738	54.793
9	6.627	4694	2000	1.007	V	1838	81.615
10	10.460	114793	3999	2.466	V	2442	61.423
11	11.543	1103215	38867	23.695	V	4299	34.892
12	12.703	3255965	128082	69.954	V	6257	23.974
Total		4655879	183096				

**Sampel RT3(2)**



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.350	113970	6496	2.497		154	974.629
2	1.797	2945	568	0.065		1743	86.083
3	2.033	3404	536	0.075		1355	110.664
4	3.092	6428	733	0.141		3049	49.189
5	3.905	2832	245	0.062		1947	77.041
6	4.326	5535	459	0.121	V	3513	42.701
7	4.626	14849	1463	0.325	V	4342	34.547
8	6.063	11833	544	0.242	V	2665	56.275
9	6.618	46705	2009	1.023	V	1837	81.658
10	10.451	113619	3988	2.489	V	2783	53.896
11	11.533	1076831	38034	23.594	V	4323	34.694
12	12.694	3165815	124534	69.965	V	6252	23.993
Total		4563965	179709				

**Sampel RT3(3)**

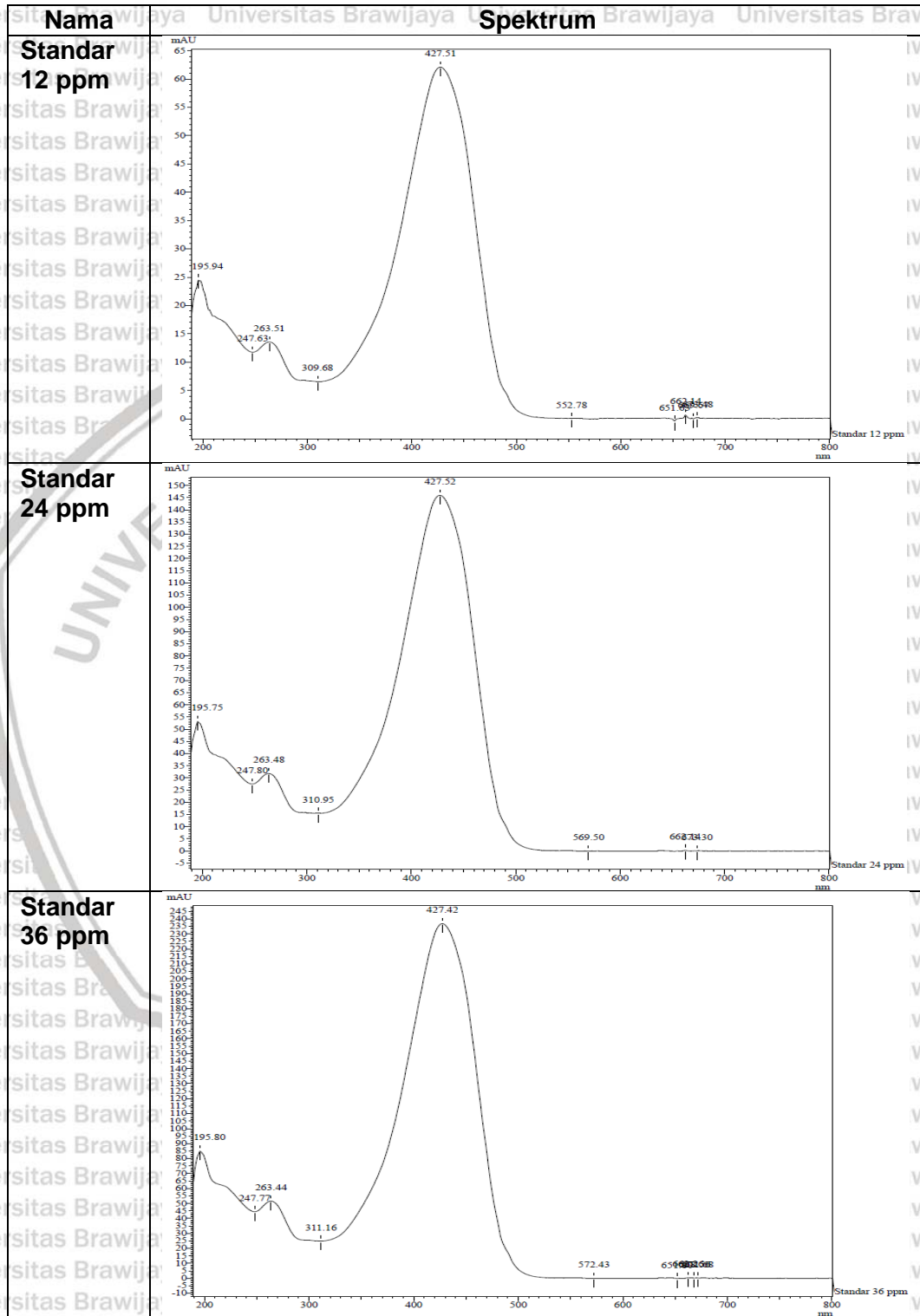


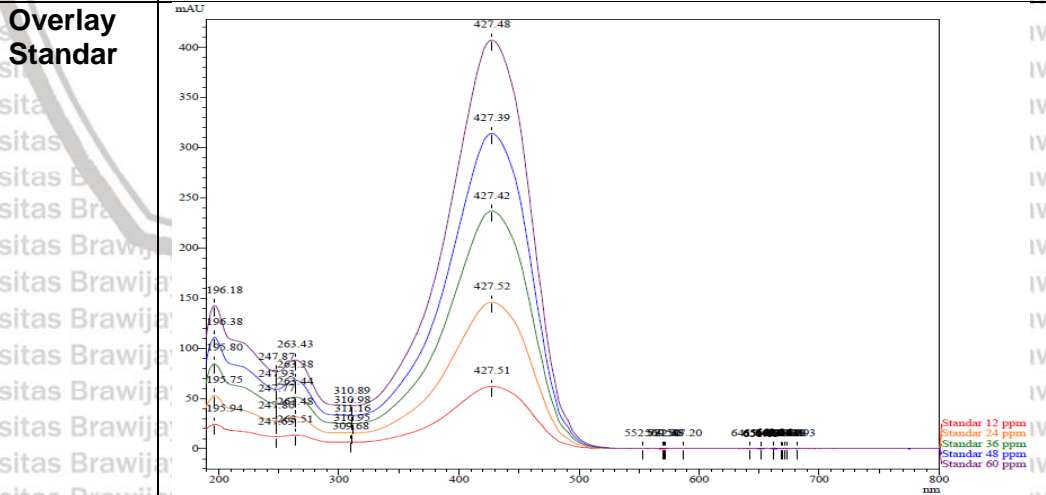
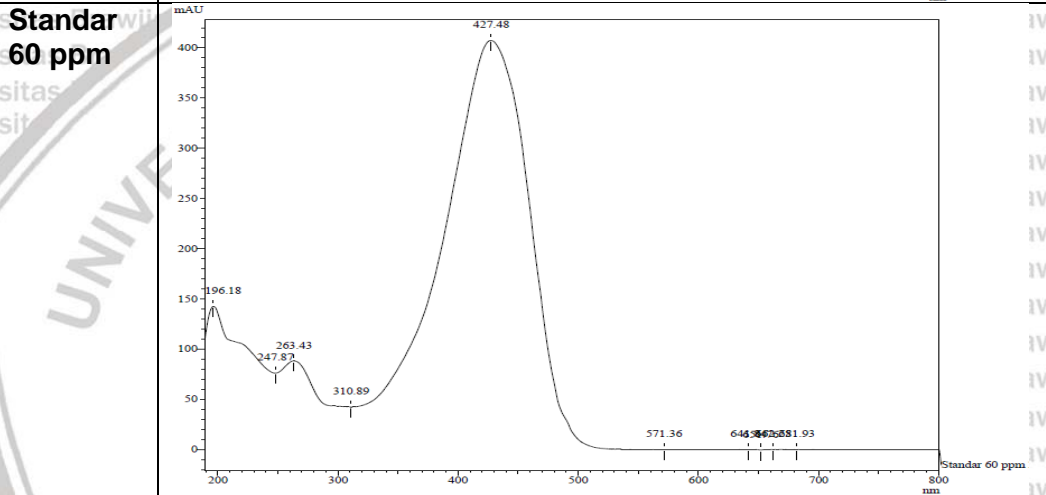
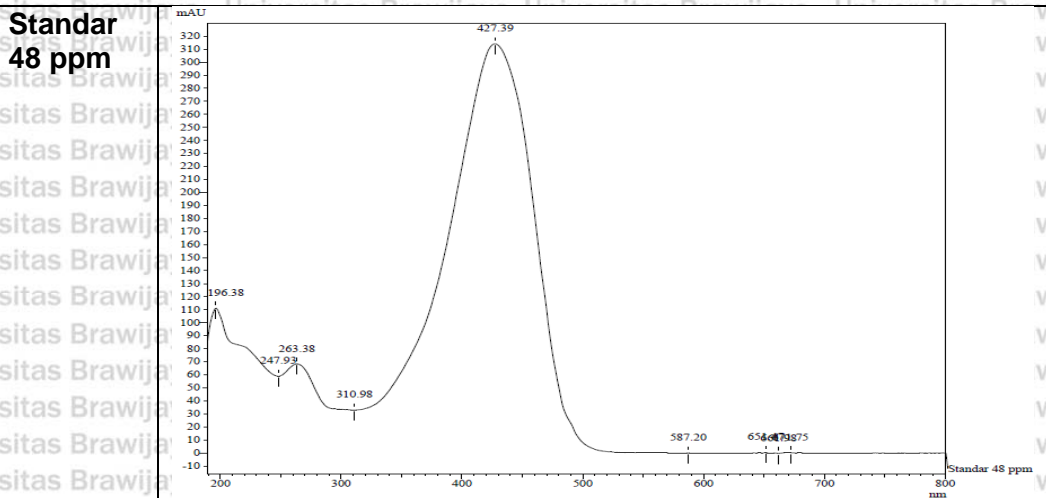
PDA Ch1 427nm							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Mark	Number of Theoretical Plate(USP)	HETP(USP)
1	1.332	120651	6760	2.580		151	993.754
2	1.798	3023	574	0.065		1663	90.204
3	2.034	3515	545	0.075		2023	74.138
4	3.093	6684	760	0.143		3035	49.417
5	3.903	2753	249	0.059		2009	74.654
6	4.327	5582	460	0.119	V	3581	41.884
7	4.626	14933	1476	0.319	V	4378	34.260
8	6.054	11281	657	0.241		2704	55.471
9	6.618	48214	2091	1.031	V	1855	80.882
10	10.451	116800	4099	2.497		2501	59.966
11	11.531	1104012	38979	23.607	V	4311	34.794
12	12.691	3239281	127706	69.264	V	6259	23.967
Total		4676730	184356				



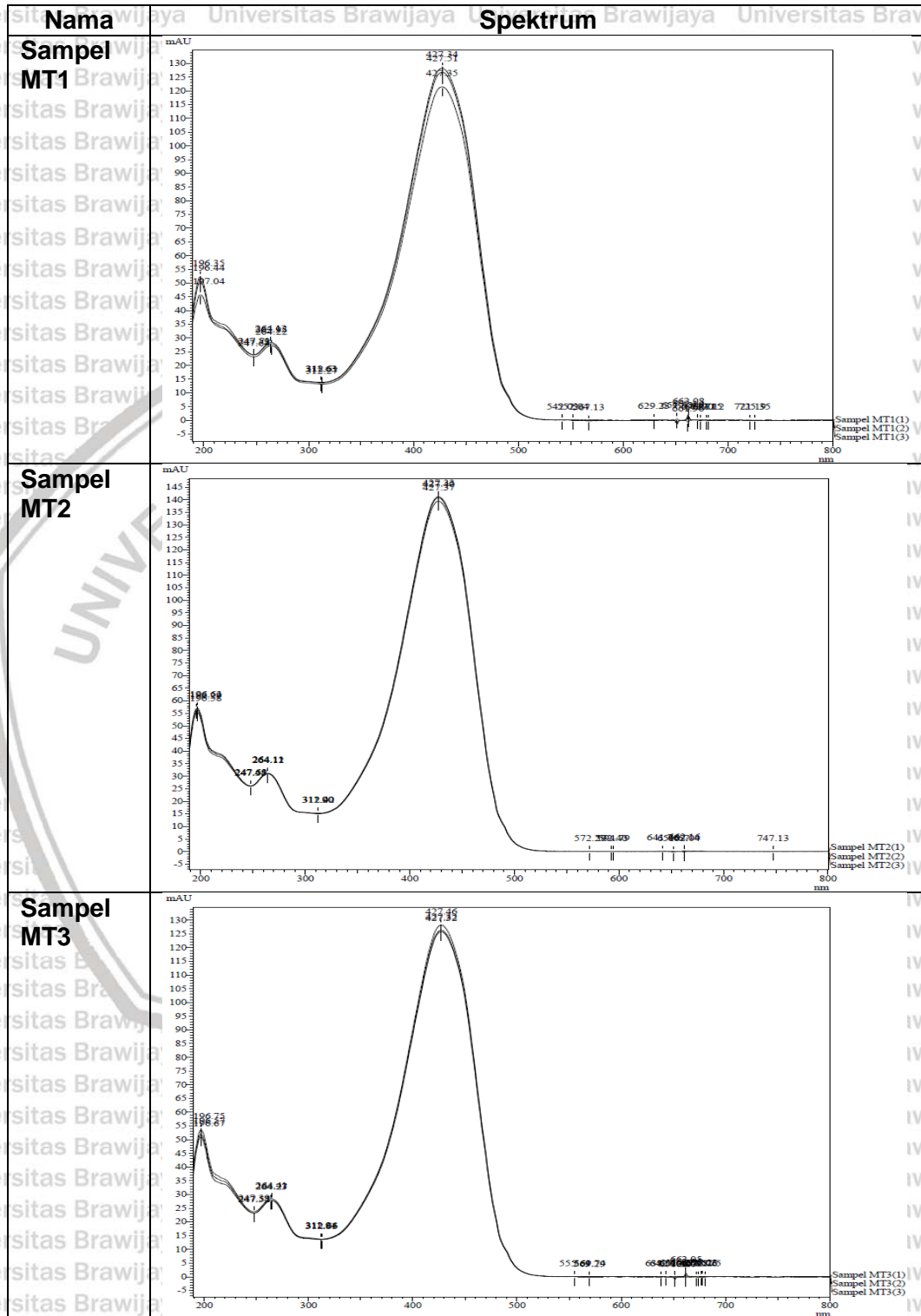


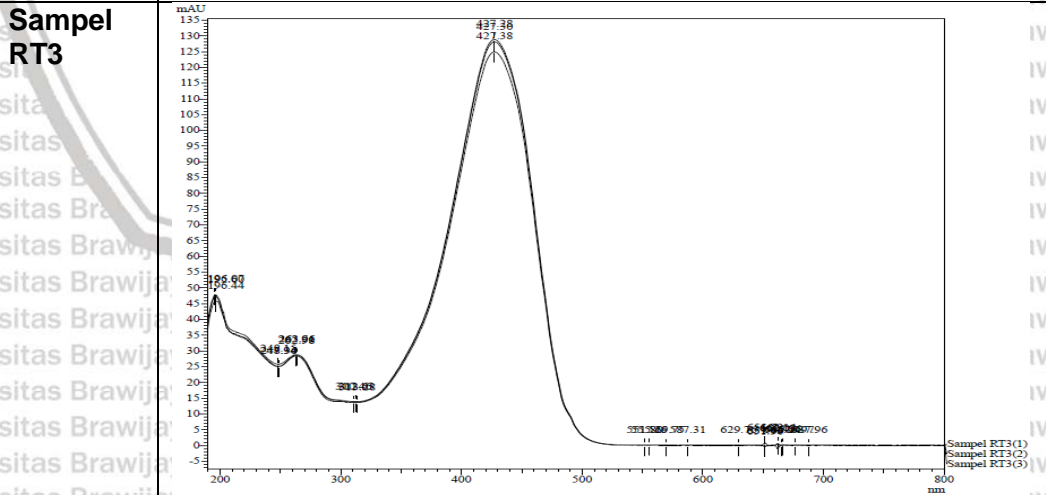
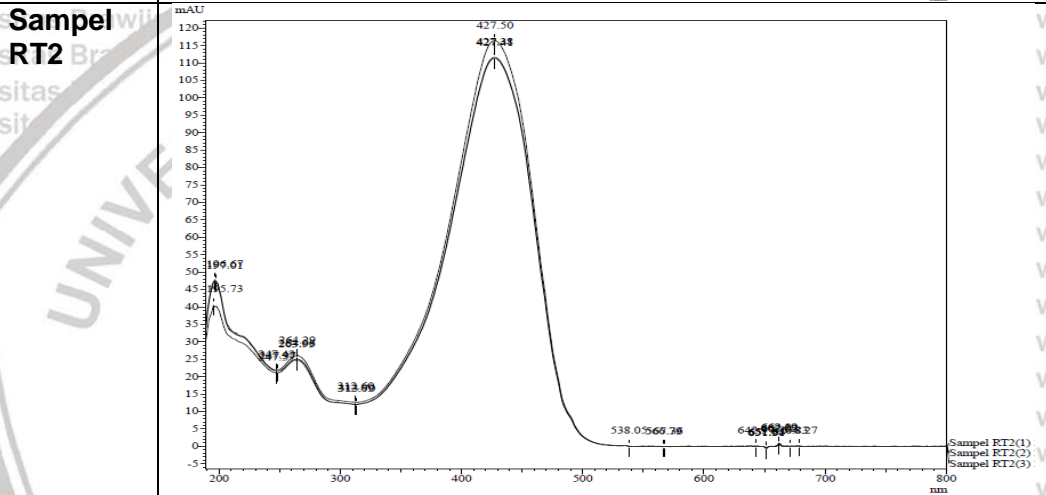
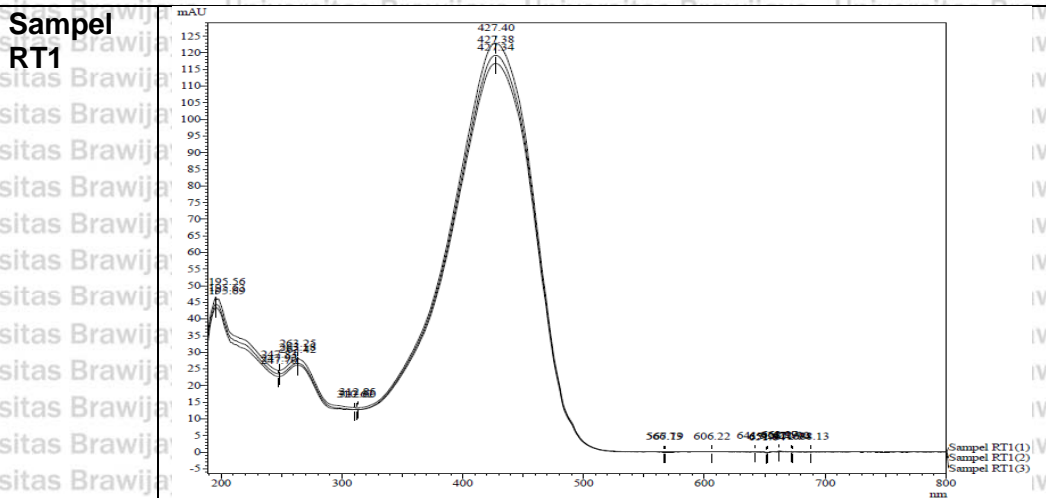
Lampiran 8. Spektrum Standar Kurkumin.



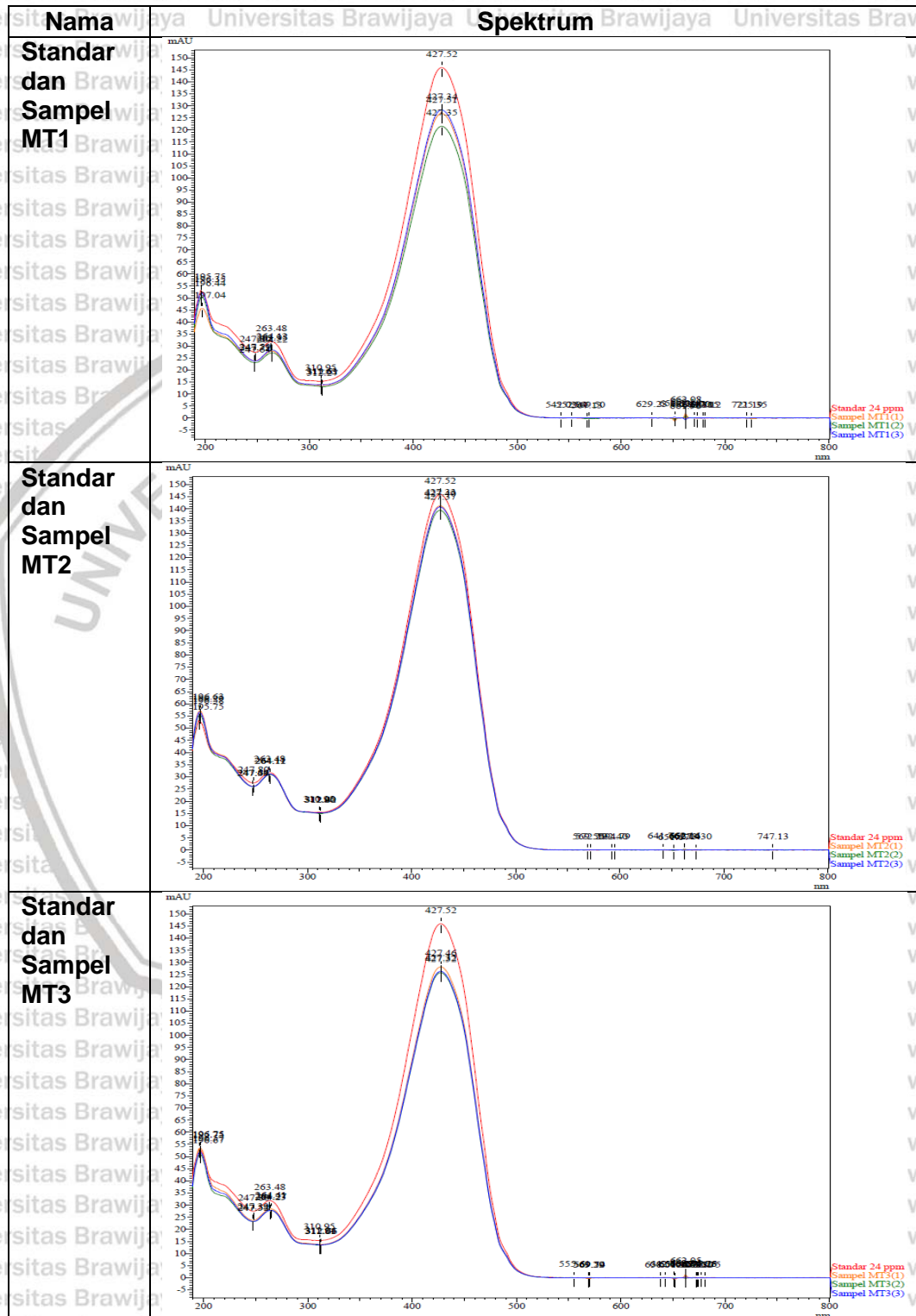


Lampiran 9. Spektrum Sampel Ekstrak Temulawak.

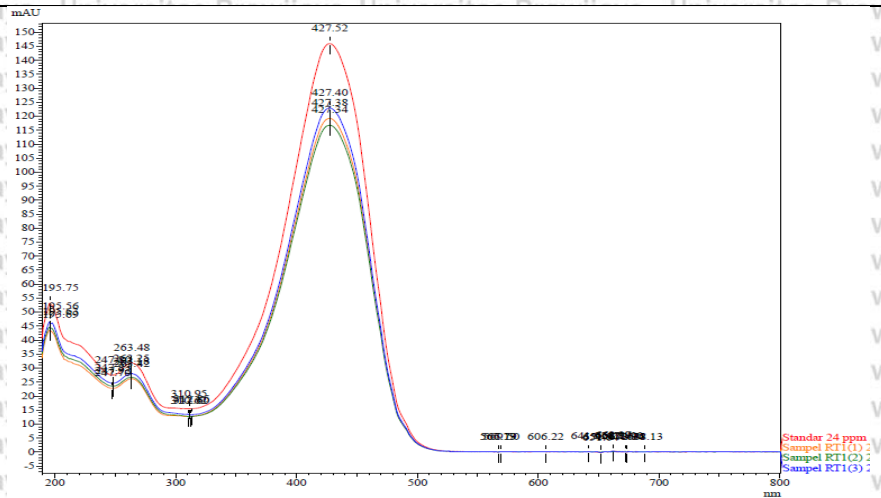




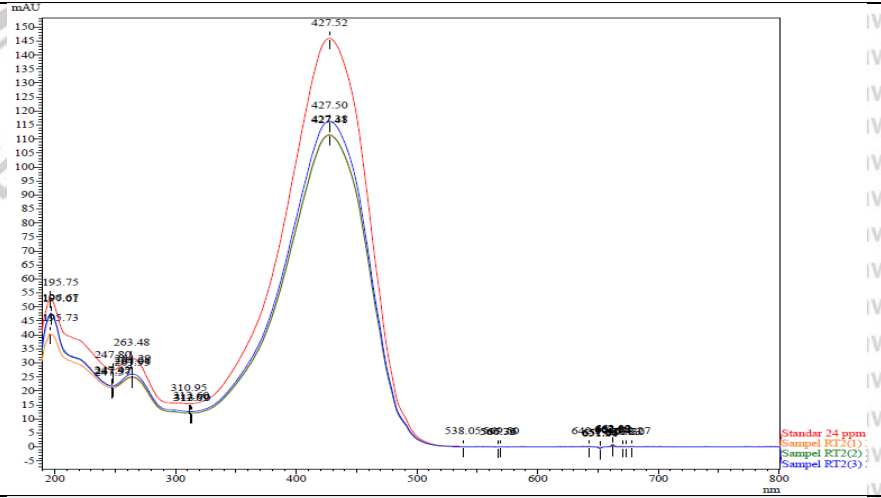
Lampiran 10. Grafik Overlay Spektrum Standar dan Sampel Ekstrak Temulawak.



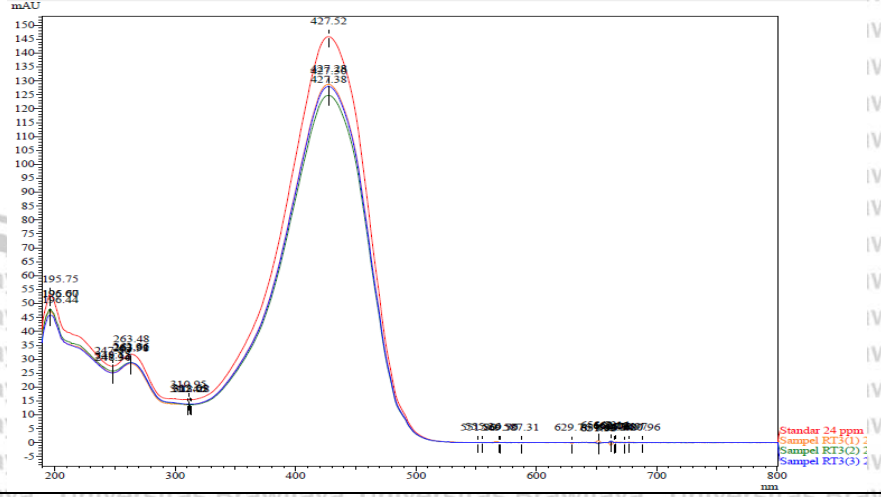
Standar dan Sampel RT1



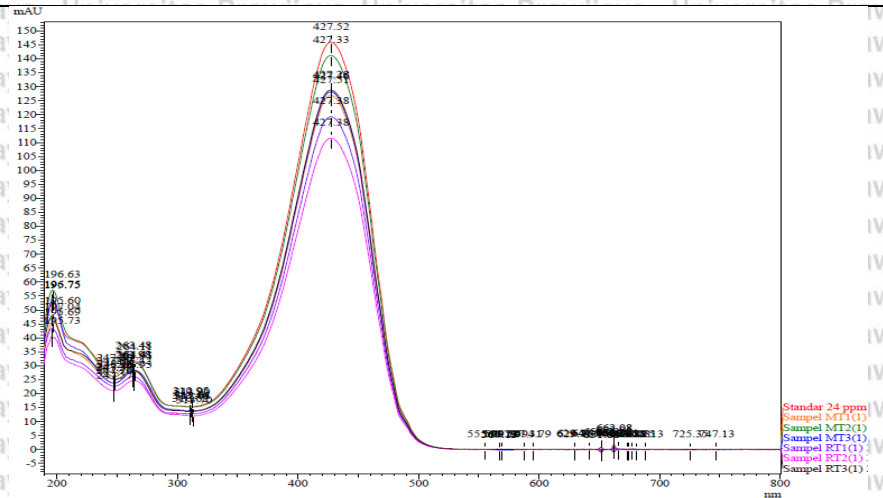
Standar dan Sampel RT2



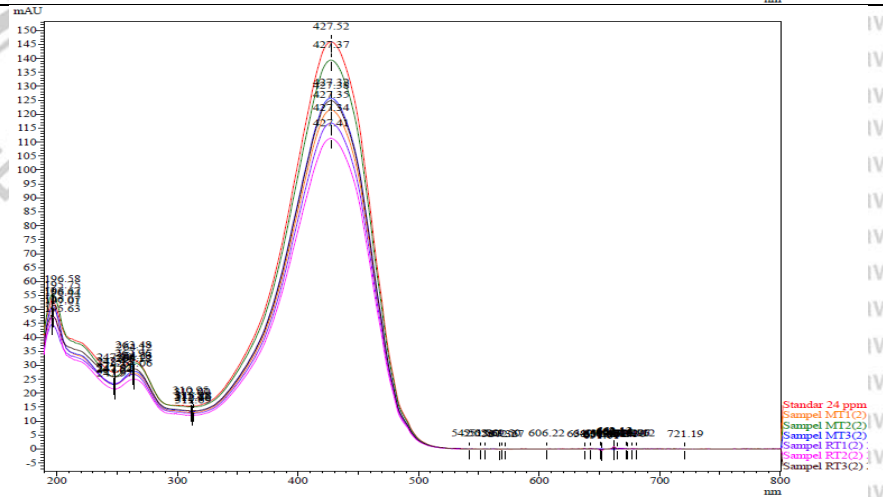
Standar dan Sampel RT3



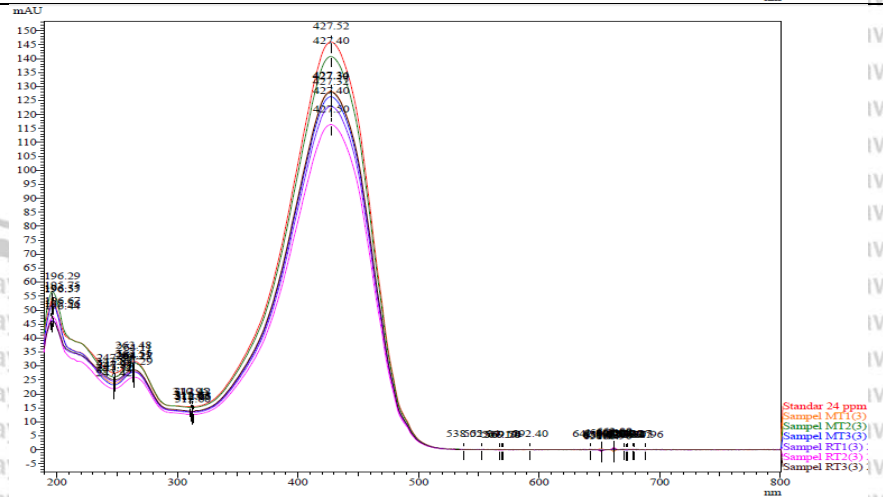
**Standar dan Sampel (1)**



**Standar dan Sampel (2)**



**Standar dan Sampel (3)**



### Lampiran 11. Perhitungan % Rendemen.

Rumus:

$$\%Rendemen = \frac{\text{Massa ekstrak}}{\text{Massa sampel segar}} \times 100\%$$

Massa ekstrak = massa konstan ekstrak yang diperoleh (g)

Massa sampel segar = massa simplisia sebelum diekstrak (g)

Sampel	Massa Sampel (g)	Massa Konstan Ekstrak (g)	%Rendemen (%)
MT1	50,0015	3,0858	6,2
MT2	50,0009	2,8672	5,7
MT3	50,0011	2,8870	5,7

Keterangan: MT1=Maserasi Temulawak 1; MT2=Maserasi Temulawak 2; MT3=Maserasi Temulawak 3

Contoh Perhitungan:

$$\%Rendemen = \frac{3,0858}{50,0015} \times 100\% = 6,2\%$$



## Lampiran 12. Perhitungan Linieritas, LOD, dan LOQ.

Rumus (Ihsan *et al.*, 2018):

- Area Intercept = memasukkan konsentrasi ke dalam persamaan regresi

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

$$LOD = \frac{3,3 \times S_y}{b}$$

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

Kons. (ppm)	Area (y)	Area Intercept ( $\bar{y}$ )	$(y - \bar{y})^2$	$\sum(y - \bar{y})^2$	$S_y$	LOD	LOQ
11,7176	1714742	1703696,341	122006572,507	5220312307,951	41714,55505	0,875	2,652
23,4352	3526669	3546267,951	384118888,905				
35,1528	5376735	5388839,561	146520396,412				
46,8704	7288400	7231411,171	3247726661,370				
52,7292	8116366	8152696,976	1319939788,757				

Persamaan Regresi:

$$y = 157248x - 138875$$

$$r = 0,9999$$

Contoh Perhitungan:

$$\bar{y} = 157248x - 138875 = 157248(11,7176) - 138875 = 1703696,341$$

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y-\bar{y})^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{5220312307,951}{5-2}} = 41714,55505$$

$$LOD = \frac{3,3 \times 41714,55505}{157248} = 0,875 \text{ ppm}$$

$$LOQ = \frac{10 \times 41714,55505}{157248} = 2,652 \text{ ppm}$$

### Lampiran 10. Perhitungan Akurasi Presisi.

Rumus:

$$\%Recovery = \frac{Kons. terukur}{Kons. sebenarnya} \times 100\%$$

$$\%RSD = \frac{SD}{\%Recovery \text{ rata - rata}} \times 100\%$$

	Kons. teoritis (ppm)	Kons. Area	Kons. terukur (ppm)	%Recovery (%)	Rata-rata %Recovery (%)	%RSD
80%	24	3485603	23,049	98,354	98,743	0,544
		3491709	23,088	98,519		
		3522517	23,284	99,355		
100%	30	4452771	29,199	99,679	99,552	1,074
		4394952	28,832	98,424		
		4493020	29,456	100,553		
120%	36	5298393	34,578	98,364	99,317	1,150
		5333731	34,802	99,003		
		5421066	35,358	100,583		

Persamaan Kurva Baku:

$$y = 15725x - 13887$$

$$r = 0,9999$$

Contoh Perhitungan:

$$\%Recovery = \frac{23,049}{24} \times 100\% = 98,354\%$$

$$\%RSD = \frac{0,126}{98,743} \times 100\% = 0,544\%$$

### Lampiran 13. Perhitungan Kadar Kurkumin.

Masing-masing ekstrak



10 mg/10 ml

10 ml

Sampel	Area	Kons. (ppm)	Kandungan (mg)	%b/b Kurkumin (%)
	3209245	20,180	0,673	6,727
MT1	3083154	19,452	0,648	6,484
	3241347	20,366	0,679	6,789

Contoh perhitungan:

Persamaan Kurva Baku:

$$y = 173149x - 284981 \quad (r = 0,9996)$$

Konsentrasi ekstrak yang terukur melalui persamaan kurva baku:

$$3209245 = 173149x - 284981$$

$$x = 20,180 \text{ ppm}$$

kadar kurkumin (%b/b) dalam ekstrak rimpang temulawak:

$$\text{kadar kurkumin} = \frac{\text{konsentrasi terukur} \times fp}{\text{bobot ekstrak (mg)}} \times 100\%$$

$$= \frac{20,180 \times \left(\frac{10}{300}\right)}{10} \times 100\%$$

$$= \frac{0,673}{10} \times 100\%$$

$$= 6,727\%$$

Lampiran 14. Analisis Statistik Kadar Ekstrak Rimpang Temulawak.

Menggunakan IBM SPSS Statistik 23

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Remaserasi	,160	9	,200*	,911	9	,323
Maserasi	,229	9	,189	,861	9	,099

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

a. Lilliefors Significance Correction

Gambar 11. Hasil Uji Normalitas

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
Hasil Persentase Kurkumin	Equal variances assumed	,214	,650
	Equal variances not assumed		

Gambar 12. Hasil Uji Homogenitas

T-Test

Group Statistics

	Metode	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Hasil Persentase Kurkumin	Remaserasi	9	6,38310	,262143	,087381
	Maserasi	9	6,83461	,290887	,096962

		t-test for Equality of Means						
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
							Lower	Upper
Hasil Persentase Kurkumin	Equal variances assumed	-3,459	16	,003	-,451503	,130526	-,728206	-,174800
	Equal variances not assumed	-3,459	15,830	,003	-,451503	,130526	-,728448	-,174558

Gambar 13. Hasil Uji t Tidak Berpasangan

Menggunakan JAPS 0.14.1.0

### Assumption Checks

Test of Normality (Shapiro-Wilk)

	W	p
Hasil % Kurkumin	0.911	0.323
Maserasi	0.861	0.099

Note. Significant results suggest a deviation from normality.

Gambar 14. Hasil Uji Normalitas

Test of Equality of Variances (Levene's)

	F	df	p
Hasil % Kurkumin	0.214	1	0.650

Gambar 15. Hasil Uji Homogenitas

### Independent Samples T-Test

Independent Samples T-Test

	Test	Statistic	df	p
Hasil % Kurkumin	Student	-3.459	16.000	0.003
	Welch	-3.459	15.830	0.003

Gambar 16. Hasil Uji t Tidak Berpasangan

### Lampiran 15. Analisis Statistik Rendemen Ekstrak Rimpang Temulawak.

Menggunakan IBM SPSS Statistik 23

Sebelum dilakukan transformasi data

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
persen rendemen maserasi	.378	3	.	.767	3	.038
persen rendemen remaserasi	.373	3	.	.779	3	.065

a. Lilliefors Significance Correction

Gambar 17. Uji Normalitas

### Test of Homogeneity of Variances

Persen Rendemen

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.199	1	4	.679

Gambar 18. Uji Homogenitas

### T-Test

#### Group Statistics

Teknik Ekstraksi		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Persen Rendemen	Maserasi	3	5.88000	.251197	.145029
	Remaserasi	3	6.03000	.294618	.170098

		t-test for Equality of Means						
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
							Lower	Upper
Persen Rendemen	Equal variances assumed	-.671	4	.539	-.150000	.223532	-.770625	.470625
	Equal variances not assumed	-.671	3.902	.540	-.150000	.223532	-.776792	.476792

Gambar 19. Uji t Tidak Berpasangan

Setelah dilakukan transformasi data

#### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Unstandardized Residual	.249	6	.200*	.878	6	.260

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

a. Lilliefors Significance Correction

**Gambar 20. Uji Normalitas**

#### Test of Homogeneity of Variances

Unstandardized Residual

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.199	1	4	.679

**Gambar 21. Uji Homogenitas**

#### T-Test

#### Group Statistics

	Teknik Ekstraksi	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Unstandardized Residual	Maserasi	3	-.4494079	.16944792	.09783080
	Remaserasi	3	.4494079	.19873824	.11474158

		t-test for Equality of Means						
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
							Lower	Upper
Unstandardized Residual	Equal variances assumed	-5.961	4	.004	-.89881577	.15078626	-1.31746554	-.48016600
	Equal variances not assumed	-5.961	3.902	.004	-.89881577	.15078626	-1.32162525	-.47600629

**Gambar 22. Uji t Tidak Berpasangan**