



**PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE KLT DENSITOMETRI
UNTUK PENETAPAN KADAR KURKUMIN DALAM EKSTRAK
ETANOL RIMPANG TEMULAWAK (*Curcuma xanthorrhiza*)**

SKRIPSI

Oleh

Denise Nur Kholida

NIM 102210101065

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE KLT DENSITOMETRI
UNTUK PENETAPAN KADAR KURKUMIN DALAM EKSTRAK
ETANOL RIMPANG TEMULAWAK (*Curcuma xanthorrhiza*)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi (SI)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

Denise Nur Kholida

NIM 102210101065

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang dengan petunjuk, rahmat, ridho, tuntunan serta limpahan kasih-Nya memberikan kemudahan, mengajarku arti dan kekuatan dalam hidup dan Nabi Muhammad SAW yang menjadi panutan dalam setiap jejak langkahku;
2. Ibuku Painah, Eyangku Tutik dan alm. Supardi serta alm. Bapakku Totok tercinta yang senantiasa menjadi semangat dan inspirasiku untuk tetap berjuang, terimakasih atas segala dorongan, motivasi, kepercayaan, semangat dan doanya yang selalu mengiringi jalanku;
3. Ibu Yuni Retnaningtyas, S.Si., Apt., M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama, Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm, selaku Dosen Pembimbing Anggota, atas bimbingan dan kesabaran yang berlimpah;
4. Bapak Prof. Drs. Bambang Kuswandi M.Sc., Ph.D dan Ibu Nia Kristiningrum S.Farm., Apt., M.farm selaku Dosen Penguji atas masukan dan bimbingan;
5. Keluargaku tercinta, adekku Wella D.F dan mbakku Cindy S.M, pakde, budhe, paklek dan bulek yang selalu memberikan kasih sayang dan menuntunku;
6. Rekan satu tim dalam pengerjaan skripsi, Arroofita Ani S atas segala bantuan, kerjasama, dan semangat bersama;
7. Sahabat spesial Dian Retno Palupi dan Febry Puji Astutik atas kesabaran dan kebaikannya, serta teman-teman farmasi angkatan 2009;
8. Bapak dan Ibu Guru di SDN Randuagung 1, SMPN 1 Randuagung, SMAN 2 Lumajang, dan dosen-dosenku di Fakultas Farmasi Universitas Jember. Pahlawan tanpa tanda jasa;
9. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

Bila engkau menghadapi kesulitan dalam urusanmu, janganlah berputus asa, gelisah dan bimbang. Percayalah bahwa jalan keluar pasti datang. Kebahagiaan bukan dari tangan orang lain, melainkan dari tanganmu sendiri.

(Dr. Aidh al-Qarni)^{*)}

Jadikanlah sabar dan sholat sebagai penolongmu. Dan sesungguhnya yang demikian itu sungguh berat, kecuali bagi orang-orang yang khusyu'

(terjemah *Q.S Al-Baqarah* ayat 45)^{**)}

Jika sesuatu digabung dengan yang lain, tidak ada gabungan yang lebih indah dari kesabaran yang digabung dengan ilmu, oleh karena itu untuk meraih ilmu belajarlah untuk tenang dan sabar.

(Umar bin Khattab)^{*)}

Do you know what kept me standing, through all those years in exile? Faith. Not in any god, not in myth and legends. In myself. In Daenerys Targaryen – I was born to rule the Seven Kingdoms, and I will.

(Game of Thrones season 7, 2017)^{***)}

*) Al-Qarni, 'Aidh. 2010. *Menjadi Wanita Paling Bahagia*. Jakarta: Qisthi Press

***) Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al-Qur'an dan Terjemahnya*. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo.

***) David Benioff, D. B. Weiss. (executive producer). 2017. *Game of Thrones Season 7*. HBO

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Denise Nur Kholida

NIM : 102210101065

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Pengembangan dan Validasi Metode KLT Densitometri untuk Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)“ adalah hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 31 Juli 2018

Yang menyatakan,

(Denise Nur Kholida)

NIM 102210101065

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengembangan dan Validasi Metode KLT Densitometri untuk Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)“ telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada :

hari, tanggal : 31 Juli 2018

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Lidya Ameliana, S.Si., Apt., M. Farm
NIP. 198004052005012005

Siti Muslichah, S.Si., M. Sc., Apt.
NIP. 197305132005012001

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

Lestyo Wulandari, S. Si., Apt, M. Farm.
NIP. 197604142002122001

Endah Puspitasari, S.Farm., M. Sc., Apt.
NIP. 198107232006042002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



Lestyo Wulandari, S.Si., Apt M.Farm
NIP. 197604142002122001

ABSTRACT

A simple, sensitive, selective and specific, precise and accurate TLC densitometry method has been developed and validated for determination of curcuma xanthorrhiza extracts. The method employed TLC silica gel 60 F₂₅₄ as the stationary phase and using chloroform : ethanol: glacial acetic acids (94:5:1 v/v/v) as mobile phase. Quantitative evaluation was performed by measuring the absorbance of the analyte spot at 424 nm. The linear regression data for the calibration plots of curcumin showed good linear relationship with $r = 0,9967$ in the concentration range 30-120 ppm of curcuminoid. The minimum detectable amounts were found to be 58,7ng curcumin/spot and the limits of quantitation were found to be 169,2 ng curcumin/spot. Repeatability precision, as RSD was 0,107% and Intermediet precision, as RSD was 0,14%. This TLC Densitometry method is selective and specific, precise, and can be used for routine analysis of curcumin.

Keywords :TLC, Validation, curcumin, curcuma xanthorrhiza extracts

RINGKASAN

Pengembangan dan Validasi Metode KLT Densitometri untuk Penetapan Kadar Curcumin dalam Ekstrak *Curcuma xanthorrhiza*; Denise Nur Kholida; 2018; 85 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Metode KLT densitometri yang sederhana, sensitif, selektif dan spesifik, tepat dan akurat telah dikembangkan dan divalidasi untuk penentuan ekstrak curcuma xanthorrhiza. Metode yang digunakan KLT silika gel 60 F254 sebagai fase diam dan menggunakan klorofom: etanol: asam asetat glasial (94: 5: 1 v / v / v) sebagai fase gerak. Evaluasi kuantitatif dilakukan dengan mengukur absorbansi tempat analit pada 424 nm. Data regresi linier untuk plot kalibrasi kurkumin menunjukkan hubungan linier yang baik dengan $r = 0,9967$ dalam rentang konsentrasi 30-120 ppm curcuminoid. Jumlah terdeteksi minimum ditemukan menjadi 58,7 ng curcumin / spot dan batas kuantitasi ditemukan menjadi 169,2 ng curcumin / spot. Ketepatan pengulangan, karena RSD adalah 0,107% dan ketelitian Intermediet, karena RSD adalah 0,14%. Metode KLT Densitometri ini selektif dan spesifik, presis, dan dapat digunakan untuk analisis rutin kurkumin.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengembangan dan Validasi Metode KLT Densitometri Untuk Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Lestyo Wulandari, S.Si., Apt, M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Lidya Ameliana, S.Si., Apt., M. Farm selaku Dosen Pembimbing Utama, Siti Muslichah, S.Si., M. Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota, yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian serta dengan sabar membimbing penulis dalam penulisan skripsi ini;
3. Ibu Lestyo Wulandari, S. Si., Apt, M. Farm. selaku Dosen Penguji I dan Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M. Sc.,Apt.selaku Dosen Penguji II yang telah bersedia menjadi Dosen Penguji dan memberikan saran serta kritik membangun bagi skripsi penulis;
4. Indah Purnama Sary, S. Si., Apt., M. Farm. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah banyak memberikan saran dan dengan sabar mengarahkan serta memberi masukan selama aktivitas perkuliahan penulis;
5. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu, bimbingan, pengorbanan, saran dan kritik kepada penulis.
6. Bu Widi, Mbak Anggra, dan Mbak Parka selaku teknisi Laboratorium Biologi Farmasi atas bantuannya selama penelitian;
7. Ayah, Ibu, dan adikku tersayang Umma yang telah memberikan pengorbanan, usaha, perhatian, kasih sayang, tenaga, pikiran, doa, dan

semangat yang tak terhingga pada penulis hingga terselesaikannya skripsi ini;

8. Oom Yudi dan Ooma Marlina yang telah membimbingku dan mengarahkanku untuk melewati masa suramku;
9. Sahabat-sahabat Sing Penting Rukun (Helmi, Dian, Fadilah, Wimala, Nissa, Novi, Ajeng, Shinta) yang setia memberiku dukungan, pengertian, dan jarak ketika dibutuhkan;
10. Kepada yang terkasih Fikri Amin, atas kepercayaan dan dukungannya;
11. Senpai-sepai dan kohai-kohai karate Jember University Karate Club (JUKC) yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, atas ilmu dan persahabatan yang telah diajarkan;
12. Mbak Nita, mas Pro, Jojo, dan Refa sekeluarga yang telah memberiku tempat sebagai bagian dari keluarga kalian;
- 13.
14. Seluruh civitas akademika dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan dan dukungan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT. Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
ABSTRAK	viii
RINGKASAN	ix
PRAKATA	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR RUMUS	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	01
1.1 Latar Belakang	01
1.2 Rumusan Masalah	02
1.3 Tujuan Penelitian	03
1.4 Manfaat Penelitian	03
1.5 Batasan Masalah	04
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	05
2.1 Tinjauan Tentang Temulawak	05
2.2 Tinjauan Tentang Kurkumin	08
2.2.1 Sifat Fisika Kimia	08
2.2.2 Diskripsi dan Kegunaan	09
2.2.3 Tinjauan Metode Analisis untuk Penetapan Kadar Kurkumin	10
2.3 Tinjauan Umum Tentang Metode Ekstraksi	12
2.3.1 Pengertian dan Tujuan Ekstraksi	12
2.3.2 Larutan Ekstraksi.....	12

2.3.3 Jenis-jenis Ekstraksi.....	12
2.3.3.1 Ekstraksi secara Sokhletasi.....	13
2.3.3.2 Ekstraksi secara Perkolasi.....	13
2.3.3.3 Ekstraksi secara Maserasi.....	13
2.3.3.4 Ekstraksi secara Reflux.....	14
2.3.3.5 Ekstraksi secara Penyulingan.....	14
2.4 Tinjauan Umum Tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	15
2.4.1 Fase Diam	16
2.4.2 Fase Gerak	17
2.4.3 Aplikasi Sampel (Penotolan Sampel)	17
2.4.4 Eluasi (Pengembangan)	18
2.4.5 Identifikasi Kromatogram	19
2.4.6 Efisiensi Kromatogram	19
2.4.7 Analisis Kualitatif	21
2.4.8 Analisis Kuantitatif	22
2.5 Densitometri	22
2.6 Optimasi Kondisi KLT	24
2.7 Validasi Metode Analisis	25
2.7.1 Selektivitas/ spesifisitas	25
2.7.2 Linieritas	25
2.7.3 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)	26
2.7.4 Presisi	27
2.7.5 Akurasi	28
BAB 3. METODE PENELITIAN	29
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	29
3.2 Rancangan Penelitian	29
3.2.1 Rancangan Percobaan	29
3.2.2 Alur Penelitian	29
3.3 Alat dan Bahan	29
3.3.1 Alat	29
3.3.2 Bahan	31

3.4 Ekstraksi Kurkumin dari Rimpang Temulawak	31
3.5 Optimasi Kondisi Analisis	31
3.5.1 Optimasi Eluen	32
3.5.2 Optimasi Panjang Gelombang.....	32
3.5.3 Optimasi Konsentrasi Uji	32
3.6 Validasi Metode Analisis	33
3.6.1 Linieritas	33
3.6.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)	34
3.6.3 Selektivitas/ Spesifisitas	34
3.6.4 Presisi	35
3.6.5 Akurasi	35
3.7 Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Rimpang	
Temulawak.....	36
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
4.1 Optimasi Kondisi Analisis.....	37
4.1.1 Optimasi Eluen.....	37
4.1.2 Optimasi Panjang Gelombang.....	38
4.1.3 Optimasi Konsentrasi Uji.....	39
4.2 Validasi Metode Analisis.....	40
4.2.1 Uji Linieritas.....	40
4.2.2 Uji Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK).....	42
4.2.3 Uji Selektivitas/Spesifisitas.....	44
4.2.4 Uji Presisi.....	48
4.2.5 Uji Akurasi.....	49
4.3 Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Etanol Rimpang	
Temulawak	50
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
5.1 Kesimpulan.....	51
5.2 Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	61

DAFTAR TABEL

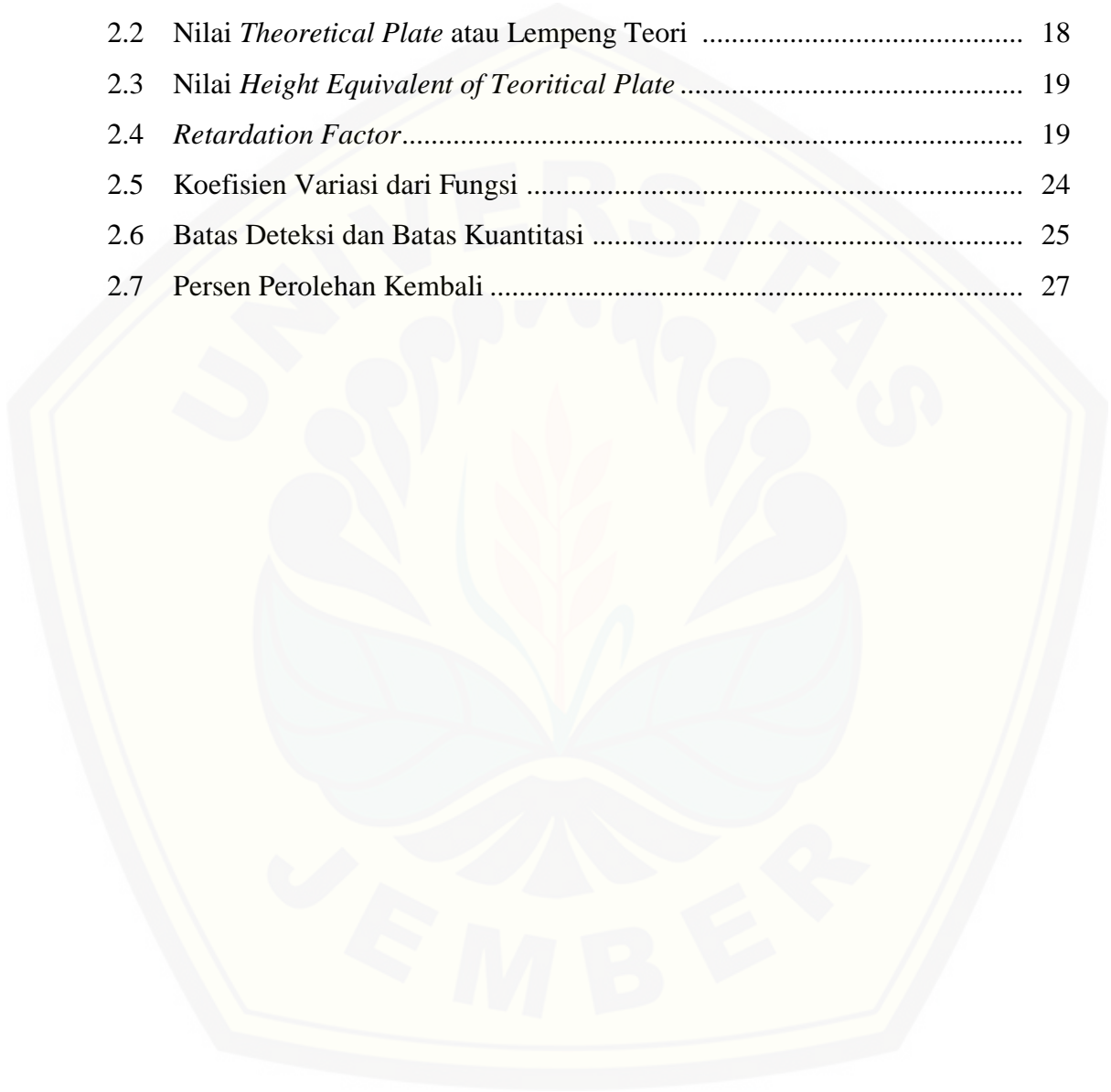
2.1	Parameter-parameter Aplikasi yang Direkomendasikan.....	16
2.2	Konsentrasi Analit Berbanding Presisi	26
2.3	Persen Perolehan Kembali (<i>% recovery</i>) Analit pada Konsentrasi yang Berbeda.....	27
4.1	Perbandingan Parameter Efisiensi Kromatogram dengan Berbagai Variasi Eluen yang Berbeda.....	38
4.2	Perbandingan Nilai Parameter Efisiensi Kromatogram pada Konsentrasi Analit yang Berbeda.....	40
4.3	Kondisi Analisis Kurkumin dengan Metode KLT Densitometri	40
4.4	Hasil Uji Linieritas Kurkumin	41
4.5	Hasil Uji BD dan BK Kurkumin.....	43
4.6	Hasil Uji Kemurnian Kurkumin.....	47
4.7	Hasil Uji Identitas Kurkumin	47
4.8	Hasil Uji Presisi Keterulangan Kurkumin.....	48
4.9	Hasil Uji Presisi Antara Kurkumin	49
4.10	Hasil Uji Akurasi Kurkumin	50
4.11	Hasil Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Rimpang Temulawak.....	51

DAFTAR GAMBAR

2.1	Struktur Kimia Kurkumin	09
2.2	Proses Pengembangan Lempeng	19
2.3	Ilustrasi Migrasi Analit dan Eluen pada Lempeng KLT	21
2.4	Densitometri Evaluasi Kromatogram dengan TLC Scanner.....	23
2.5	Skema Sistem Optik Densitometer	24
3.1	Diagram Alur Penelitian Analisis Kuantitatif Kurkumin dalam Ekstrak Etanol Rimpang Bangle dengan Metode KLT Densitometri.....	30
4.1	Spektra Standar Kurkumin pada Panjang Gelombang 200-700 nm	39
4.2	Kurva Linieritas Massa vs Area Kurkumin	42
4.3	Kurva Linieritas Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Massa vs Area Kurkumin.....	44
4.4	Kromatogram Pemisahan Kurkumin pada ekstrak rimpang temulawak	45
4.5 (a)	Spektra Kurkumin dalam Standar dan Sampel pada uji identitas	46
4.5 (b)	Spektra Kurkumin dalam Standar dan Sampel pada uji kemurnian.....	46

DAFTAR RUMUS

2.1	Resolusi	18
2.2	Nilai <i>Theoretical Plate</i> atau Lempeng Teori	18
2.3	Nilai <i>Height Equivalent of Teoritical Plate</i>	19
2.4	<i>Retardation Factor</i>	19
2.5	Koefisien Variasi dari Fungsi	24
2.6	Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	25
2.7	Persen Perolehan Kembali	27



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kurkumin yang juga disebut sebagai deferuloyl metana, merupakan senyawa turunan fenolik hidrofobik dari rimpang tumbuhan *Curcuma longa* (Anand *et al.*, 2008). Kurkumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] merupakan zat warna kuning yang terdapat pada rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.). Kurkumin merupakan pigmen yang tidak larut dalam air pada pH asam dan netral, sedangkan pada pH basa dapat larut, sukar larut heksan dan *light petroleum*, agak larut dalam benzen, kloroform dan eter, tetapi larut dalam alkohol, aseton dan asam asetat glasial. Kurkumin stabil pada suasana asam, namun tidak stabil pada kondisi basa dan adanya cahaya (Handayani *et al.*, 2008).

Secara tradisional kurkumin dikenal memiliki banyak khasiat, antara lain meliputi antiseptik, analgesik, antiinflamasi, antioksidan, antimalaria, penolak serangga/nyamuk, dan sebagai obat penyembuh luka (Aggarwal *et al.*, 2007). Kurkumin telah menunjukkan aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antimikroba, dan antikarsinogenik. Selain itu kurkumin juga memiliki aktivitas hepatoprotektif dan nefroprotektif, menekan trombosis, melindungi dari serangan jantung *myocardial*, dan memiliki sifat hipoglikemik dan antirematik (Anand *et al.*, 2008).

Secara umum tanaman yang termasuk dalam famili Zingiberaceae mengandung senyawa-senyawa golongan golongan terpenoid, fenolik, kurkuminoid, dan flavonoid, (Raharjo & Gunardi, 2009). Kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksi kurkumin dapat diisolasi dari tanaman *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma mangga*, *Curcuma zedoaria*, *Costus speciosus*, *Curcuma aromatica*, *Curcuma phaeocaulis*, *Etingera elatio*, dan *Zingiber cassumunar* (Aggarwal *et al.*, 2007). Rimpang *Curcuma xanthorrhiza* atau temulawak mengandung minyak volatil, saponin, flavonoid dan tanin. Analisis kimia menunjukka bahwa senyawa utama *Curcuma xanthorrhiza* adalah pati (48.18-59.64%), serat (2.58-4.83%), minyak volatil seperti fenendren, kamfer,

tumerol, sineol, borneol, dan xanthorrhizol (1.48-1.63%), dan juga senyawa kurkuminoid seperti kurkumin dan demetoksikurkumin (1.6-2.2%) (Mangunwardoyo *et al.*, 2012).

Xanthorrhizol yang diisolasi dari rimpang temulawak diketahui memiliki aktivitas antimetastatik karena kemampuannya untuk menekan massa tumor terhadap mencit C57BL6 yang telah diinokulasi oleh sel melanoma B16BL6 sebesar 97% dengan pemberian dosis 0,5 mg/kg selama dua minggu (Choi, M. A. *et al.*, 2005). Selain itu xanthorrhizol yang diisolasi dari fraksi etil asetat rimpang *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. mampu menghambat pertumbuhan *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus oryzae*, dan *Trichophyton mentagrophytes* secara signifikan (Rukayadi & Hwang, 2007). Aktivitas antioksidan temulawak dapat dilihat dari penelitian yang dilakukan oleh Ruslay *et al.* (2007) di mana kurkuminoid *freeze-dried* yang diisolasi dari ekstrak etil asetat rimpang *C. xanthorrhiza* mampu menghambat peroksidasi lipid sebesar 98,4% dibandingkan dengan BHT (99,7%) dan sebesar $98,3 \pm 0.010\%$ dibandingkan dengan kuersetin. Selain itu *Curcuma xanthorrhiza* juga berpotensi memiliki aktivitas antibakteri, antikanker, antitumor, anti-inflamasi, antiplatelet, immunostimulasi, antinosisseptik, dan estrogenik (globinmed.com)

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang di atas, maka dapat dibuat rumusan masalah yang meliputi:

- a. Bagaimanakah kondisi optimum penetapan kadar kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temulawak dengan metode KLT Densitometri?
- b. Apakah penetapan kadar kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temulawak dengan metode KLT Densitometri dapat memberikan hasil analisis yang memenuhi syarat linearitas, batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK), selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi?

- c. Berapakah kadar kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk menjawab rumusan masalah yang ada, yakni :

- a. Menentukan kondisi optimum penetapan kadar kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb. dengan metode KLT densitometri.
- b. Menentukan validitas metode yang meliputi parameter kespesifikan dan selektifan, kelinieran, kepekaan, keseksamaan, serta keakuratan penetapan kadar kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dengan metode KLT densitometri.
- c. Menentukan kadar kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.).

1.4 Manfaat Penelitian

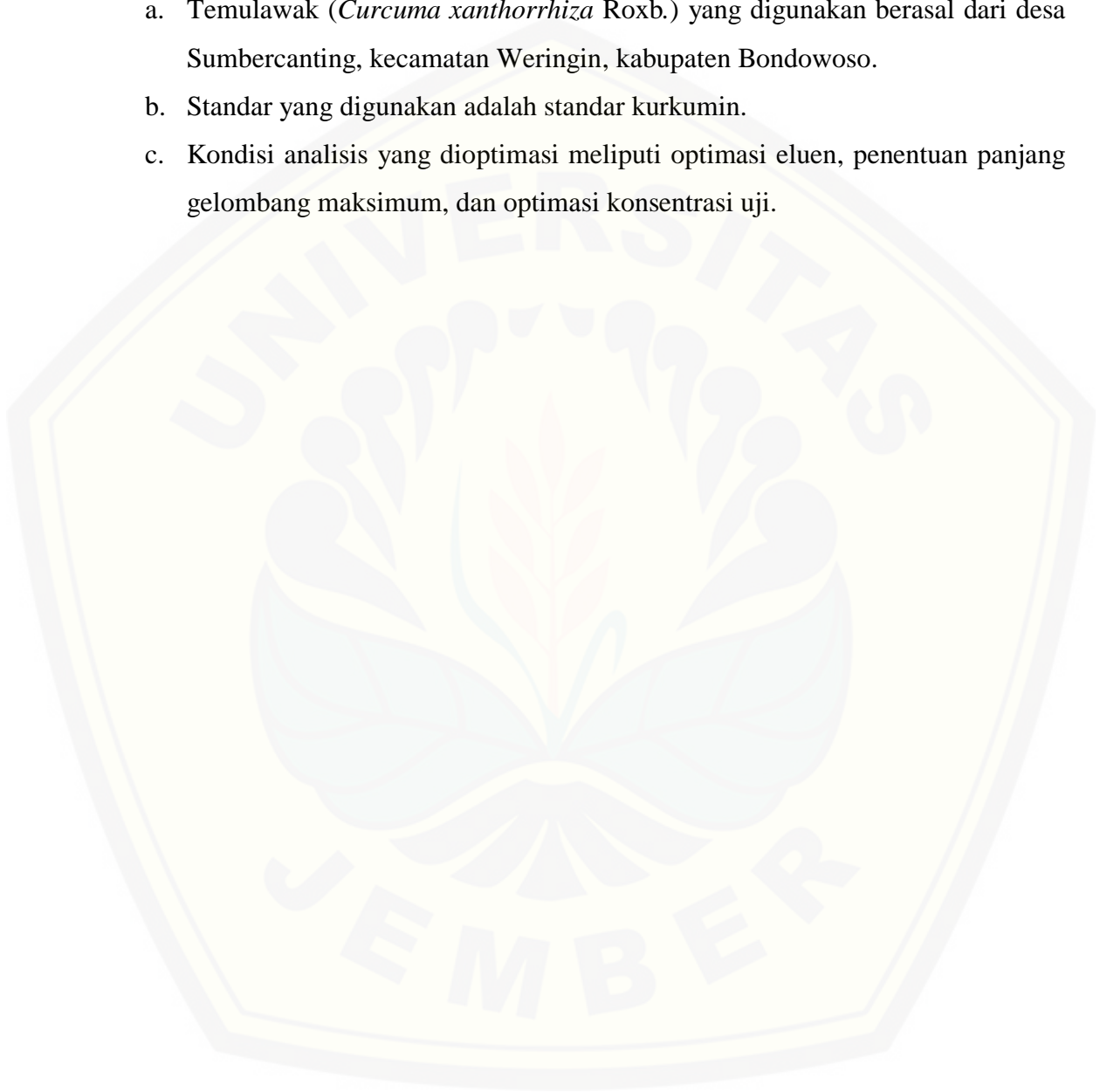
Adapun manfaat yang dapat diambil dari hasil penelitian ini antara lain:

- a. Membantu pengembangan obat herbal terstandar yang membutuhkan metode penetapan kadar yang tepat sebagai acuan untuk menentukan dosis kurkumin dalam sediaan.
- b. Memberikan informasi pada masyarakat tentang jumlah kandungan kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temulawak.
- c. Mengasah kemampuan, kreativitas, dan keahlian di bidang Farmasi Analisis bagi mahasiswa pelaksana.

1.5 Batasan Penelitian

Adapun batasan dalam penelitian ini antara lain:

- a. Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) yang digunakan berasal dari desa Sumbercanting, kecamatan Weringin, kabupaten Bondowoso.
- b. Standar yang digunakan adalah standar kurkumin.
- c. Kondisi analisis yang dioptimasi meliputi optimasi eluen, penentuan panjang gelombang maksimum, dan optimasi konsentrasi uji.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Temulawak

Temulawak merupakan salah satu spesies *Curcuma* yang paling sering ditemukan di Malaysia, juga banyak ditemukan di India Tenggara dan Indonesia. Tanaman ini memiliki rasa pahit sehingga tidak digunakan sebagai bumbu, meskipun memiliki warna yang mirip dengan kunyit. Namun tanaman ini dipakai secara luas dalam pengobatan dan kosmetik tradisional (Ravindran *et al.*, 2007).

Secara tradisional, rendaman *C. xanthorrhiza* beserta jahe-jahean dan biji merica digunakan untuk mengobati gangguan pencernaan dan rematik. Tanaman ini juga digunakan sebagai pelancar haid pada wanita yang haidnya tidak lancar, sebagai tonik setelah melahirkan serta dioleskan ke badan setelah melahirkan dalam bentuk pasta. Rimpangnya juga diyakini dapat menyembuhkan penyakit liver dan irisan atau parutannya direndam untuk menyembuhkan batu empedu (Burkill IH., 1935).

Begitu banyak penelitian yang dilakukan terhadap rimpang temulawak akan aktivitas farmakologisnya. Rimpang temulawak diketahui memiliki aktivitas antara lain antimetastatik di mana xanthorrhizol yang diisolasi dari rimpang *C. xanthorrhiza* diberikan secara intraperitoneal terhadap mencit C57BL6 yang telah diinokulasi sel melanoma B16BL6 mampu menekan pembentukan massa tumor intra-abdominal dengan reduksi sebesar 97% dengan pemberian dosis 0,5 mg/kg selama 2 minggu (Choi M.A. *et al.*, 2005).

Contoh aktivitas antifungi dapat dilihat berdasarkan penelitian berikut di mana xanthorrhizol yang diisolasi dari fraksi etil asetat rimpang *C. xanthorrhiza* mampu menginhibisi pertumbuhan *Aspergillus flavus* (konsentrasi inhibitori minimum (MIC) 2 µg/mL, konsentrasi fungisidal minimum (MFC) 4 µg/mL), *Aspergillus fumigatus* (MIC 2 µg/mL, MFC 4 µg/mL), *Aspergillus niger* (MIC 2 µg/mL, MFC 4 µg/mL), *Fusarium oxysporum* (MIC 4 µg/mL, MFC 8 µg/mL), *Rhizopus oryzae* (MIC 1 µg/mL, MFC 2 µg/mL), dan *Trichophyton mentagrophytes* (MIC 1 µg/mL, MFC 2 µg/mL) (Rukayadi & Hwang, 2007). Salah satu aktivitas antibakteri antara

lain adalah xanthorrhizol yang diisolasi dari rimpang *C. xanthorrhiza* mampu menghambat secara signifikan ($0 < 0,05$) pembentukan biofilm pada pertumbuhan fase adheren *Streptococcus mutants* (76%) setelah 60 menit. (Rukayadi & Hwang, 2006).

Contoh aktivitas antioksidan temulawak dapat dilihat dari penelitian berikut di mana kurkuminoid *freeze-dried* yang diisolasi dari ekstrak etil asetat dari rimpang *C. xanthorrhiza* mampu menghambat peroksidasi lipid sebesar 98,4% dibandingkan dengan BHT (*butylated hydroxytoluene*) (99,7%) menggunakan metode pengujian nilai FTC (*ferric thiocyanate*), sebesar $(99.7 \pm 0.001\%)$ menggunakan metode pengujian nilai TBA dibandingkan terhadap kuersetin ($98.3 \pm 0.010\%$). (Ruslay S. *et al.*, 2007). Baik ekstrak kloroform (40 $\mu\text{g/mL}$) maupun etanol (160 $\mu\text{g/mL}$) dari rimpang *C. xanthorrhiza* memiliki aktivitas antitumor berdasarkan kemampuannya menghambat aktivitas promoter antitumor dengan efek inhibisi 100% (Vimala S, *et al.*, 1999)

Klasifikasi temulawak menurut www.ncbi.nlm.nih.gov adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida/Monocotyledonae
Subkelas	: Zingiberidae
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: Curcuma
Jenis	: <i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.
Sinonim	: <i>Curcuma zanthorrhiza</i> Roxb.
Nama umum	: Temulawak

Tanaman tegak, tumbuh hingga setinggi 2 meter. **Rimpang** bercabang, membulat/oval, umbi menjari dan menggantung berwarna kuning gelap, di dalamnya berwarna oranye atau oranye kemerahan, warnanya lebih terang pada bagian-bagian yang lebih muda, memiliki bau tajam dan rasa pahit. **Daun** sedikit tegak, kaku pada bagian pelepah yang masih hijau, batang pelepah berbentuk oval dan memiliki lanceolar lebar; pinggirannya daun agak bergelombang; daun berwarna hijau memilah dengan pembuluh keunguan, berbentuk oval dengan garis ungu jelas di sebelah tulang daun yang berwarna hijau, berukuran antara 10-18 cm x 30-80 cm, tidak berambut; ligula kecil; petiola kira-kira 10 cm. **Bunga** berukuran sampai 25 cm, tunas terpisah tumbuh dari rhizoma; gagang bunga berukuran 15-25 cm; puncak bunga berukuran 16-25 x 8-10 cm; braktus fertil hijau pucat, berukuran kira-kira 1,4 cm, berambut, puncak bergigi tiga; batang corolla berukuran kira-kira 3,5 cm, lobus ungu pucat, berbentuk oval sebesar 1,7x1,5 cm. **Akar** pendek berumbi besar; bentuk batang bawah oval, pendek, berwarna kuning kemerahan. (Ravindran *et al.*, 2007).

Ekstrak etil asetat rimpang temulawak telah diketahui mengandung kurkuminoid (bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin, kurkumin) (Ruslay *et al.*, 2007 dan Sari *et al.*, 2013). Ekstrak air rimpang temulawak telah diketahui mengandung monoterpen (misal camphor), seskuiterpen (misal Ar-curcumene, α -cedrene, β -elemenone) and seskuiterpenoid (misal xanthorrhizol) (Sari *et al.*, 2013 & Ab Halim *et al.*, 2012). Ekstrak aseton rimpang temulawak juga diketahui mengandung kurkuminoid. (Sari *et al.*, 2013). Ekstrak etanol rimpang temulawak ditemukan mengandung senyawa monoterpen (misal camphor), seskuiterpen (misal zingiberin, γ -elemene, trans β -farnesene, Ar-curcumene, α -cedrene, β -elemenone), seskuiterpen (misal xanthorrhizol) dan lain-lain (misal kurkumin, benzofuran). (Devaraj *et al.*, 2010)

Minyak esensial rimpang temulawak diketahui mengandung monoterpen (di antaranya borneol, δ -terpineol, camphene, α -pinene, α -thujene, β -pinene, myrcene, linalool, cis-pinene, α -phellandrene, α -terpinene, (Z)- β -ocimene, β -ocimene, p-cymene, γ -terpinene, camphor, α -terpineol, terpinen-4-ol, limonene, terpinolene, p-

cymene-8-ol, cis-dehydro- β -terpineol), kurkuminoid (misal curcumin), seskuiterpen (antara lain α -curcumene, zingiberene, α -cubebene, β -humulene, humulene, (Z)- β -farnesene, γ -elemene, (E)- β -farnesene, Ar-curcumene, γ -curcumene, β -bisabolene, (Z)- γ -bisabolene, β -curcumene, β -sesquiphellandrene, caryophyllene oxide, thujopsan-2- α -ol, sesquithuriferol, 1,10-di-epi-cubenol, β -bisabolol, Ar-curcumen-15-al, (E, Z)-farnesol, α -bisabolol oxide A, β -elemene, β -caryophyllene, humuleneoxide, curzerenone, trans- α -bergamotene, germacrone), seskuiterpenoid (antara lain xanthorrhizol, cubenol, α -eudesmol, α -cis-bergamotene), monoterpenoids (1,8-cineole, 6,7-epoxymyrcene), phenylpropene (misal (Z)-isoeugenol,), ester (antara lain methyl undecanoate, (E)-ethyl cinnamate, butyl dodecanoate), dan lainnya (antara lain ethyl-4E-octenoate, dihydro citronellol acetate, methyl perillate, 1,10-decanediol, (Z)-isoeugenol acetate, citronellyl pentanoate, cis-cadin-4-en-7-ol, (E)-amyl-cinnamic alcohol, (E)-citronellyl tiglate, 1-phenyl-hepta-1,3,5-triyne, 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde, chamazulene, α -p-dimethylstyrene, 2-nonanol) (Mary *et al.*, 2012; Jantan *et al.*, 1999; Jantan *et al.*, 2012; Yasni *et al.*, 1994; Jarikasem *et al.*, 2005; Zwaving, 2006)

2.2 Tinjauan Tentang Kurkumin

2.2.1 Sifat Fisika Kimia

Sifat-sifat kurkumin antara lain:

Nama Lain : (E,E)-1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione;

Berat molekul : 368.39;

Formula molekuler : C₂₁H₂₀O₆;

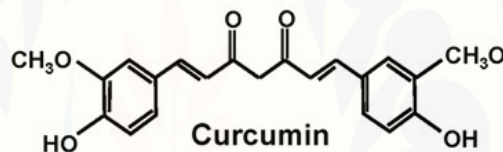
Prosentase komposisi : C 68.47%, H 5.47%, O 26.06%;

Kurkumin atau juga disebut diferulil metana, merupakan senyawa fitokimia turunan polifenol hidrofobik yang memberikan warna kuning alami pada rimpang *Curcuma longa* L., *Zingiberaceae* (Budavari, 1996; Anand *et al.*, 2008). Serbuk kurkumin berupa kristal berwarna oranye kekuningan, memiliki titik leleh 183⁰C. Kurkumin tidak larut dalam air dan eter, namun larut dalam dimetilsulfoksida, aseton, minyak, alkohol (etanol), dan asam asetat glasial. Senyawa ini memiliki

absorbansi maksimal pada sekitar panjang gelombang 420nm. Kurkumin memberikan warna merah kecokelatan dalam suasana basa; warna kuning muda dalam suasana asam (Budavari, 1996; Aggarwal *et al.*, 2007). Kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin telah diketahui dapat diisolasi dari *Curcuma mangga*, *Curcuma zedoaria*, *Costus speciosus*, *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma aromatica*, *Curcuma phaeocaulis*, *Etingera elatior*, dan *Zingiber cassumunar* (Aggarwal *et al.*, 2007).

2.2.2 Deskripsi dan Kegunaan

Kurkumin merupakan senyawa anggota kelas diarylheptanoid linier dari senyawa alami di mana di dalamnya dua gugus aryl yang tersubstitusi oksigen terhubung melalui tujuh rantai karbon, seperti yang dapat dilihat pada gambar 2.2 di bawah ini:



Gambar 2.1 Struktur Kimia Kurkumin (Anand *et al.*, 2008)

Rantai C7 yang linier terhadap diarylheptanoid dikenal memiliki gugus fungsi okso yang tidak jenuh, paruhan enon, dan gugus 1,3-diketon. Kecuali gugus fungsi okso dan hidroksi, rantai C7 umumnya tidak tersubstitusi. Ketidakjenuhan pada unit penghubung memiliki konfigurasi E (ikatan C_C trans). Cincin aril bisa tersubstitusi secara simetris maupu tidak simetris; substituen alami yang paling umum adalah tipe okso, seperti unsur hidroksi atau metoksi (Anand *et al.*, 2008).

Kurkumin telah menunjukkan aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, antimikrobia, antikarsinogenik. Kurkumin juga menunjukkan aktivitas hepatoprotektif dan nefroprotektif, menekan trombosis, melindungi dari infarksi miokardial, dan bersifat hipoglikemik dan antirheumatik (Anand *et al.*, 2008). Selain itu kurkumin juga memiliki aktivitas antioksidan dan bersifat sitotoksik (Harborne *et al.*, 1999).

Banyak bukti yang menyatakan bahwa kurkumin merupakan antiinflamasi yang poten. Pertama, kurkumin menekan aktivasi dari faktor transkripsi NF-κB, yang mengontrol ekspresi produk gen pro-inflamasi. Kedua, kurkumin menurunkan

ekspresi COX-2, enzim yang terhubung dengan kebanyakan jenis inflamasi. Ketiga, kurkumin menghalangi ekspresi enzim pro-inflamasi lain yaitu 5-LOX, selain itu kurkumin juga berikatan dengan situs aktif 5-LOX dan menghalangi aktivitasnya. Keempat, kurkumin mengurangi ekspresi berbagai molekul adesi permukaan sel yang berhubungan dengan inflamasi. Kelima, kurkumin mengurangi dari berbagai sitokin inflamasi termasuk TNF, IL-1, IL-6, IL-8, dan *chemokine*. Keenam, kurkumin terbukti menghalangi aksi TNF, salah satu sitokin yang paling pro-inflamasi. Ketujuh, kurkumin merupakan antioksidan yang poten, yang mungkin berperan pada aktivitas antiinflamasi (Aggarwal *et al.*, 2007).

Sebagaimana yang dikutip oleh Nurrochmad (2004), kurkumin berpotensi sebagai antikanker dengan berperan sebagai penangkal radikal dengan memiliki aktivitas antioksidan dan penangkal radikal, juga bertindak sebagai katalisator pembentukan radikal hidroksil, sehingga kurkumin mampu bertindak sebagai *radical scavenger* terhadap metabolit antara reaktif senyawa karsinogen dan mengurangi insiden terjadinya kanker; sebagai inhibitor siklooksigenase yang mengakibatkan akumulasi asam arakidonat yang akan memicu apoptosis dengan mengaktifkan enzim sphingomielinase yang mengkatalis pembentukan seramid (pemacu positif apoptosis) dari sphingomielin; sebagai senyawa antiproliferasi dengan berbagai mekanisme antara lain menghambat aktivitas protein kinase C yang berperan penting pada proses awal pembelahan sel, mengaktifasi reseptor estrogen sehingga menghambat proliferasi sel pada kanker payudara; dan sebagai senyawa pemacu apoptosis melalui berbagai cara, misalnya dengan menekan ekspresi *Bcl2* melalui penghambatan prostaglandin, kurkumin dilaporkan mampu meningkatkan level kaspase 3 dan mengaktifkannya yang berakibat terjadinya apoptosis, disebabkan karena kurkumin dapat memacu *cyt c* dengan cara memacu terjadinya oksigen reaktif dan hilangnya potensial membran pada mitokondria.

2.2.3 Tinjauan Metode Analisis untuk Penetapan Kadar Kurkumin

Pada penelitian yang dilakukan oleh Widjaja (2011), kurkumin dianalisis secara kuantitatif menggunakan sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik dengan detektor visibel pada panjang gelombang 432 nm, fase diam oktadesilsilan (C₁₈), dan fase gerak metanol : asam asetat glasial 2% (90 : 10 v/v)

dengan kecepatan alir 0,5 ml/menit. Validitas metode yang digunakan adalah parameter linieritas, selektivitas, akurasi, dan presisi. Nilai hasil penelitian menunjukkan bahwa metode memiliki selektivitas yang baik dengan nilai resolusi (R_s) 1,4383 dan linearitas yang baik dengan nilai koefisien korelasi (r) 0.9992 pada konsentrasi 1,515-4,545 ppm. Nilai *recovery* dan KV untuk baku kurkumin pada konsentrasi 1,515 ppm; 3,030 ppm, dan 4,545 ppm berturut-turut adalah 101,9208-107,5049% dan 2,3435%; 99,1947-101,9703% dan 1,1346% serta 92,3524-108,4202% dan 5,8678%, sedangkan untuk baku kurkumin yang diadisi dalam sampel adalah 102,9600-106,8267% dan 1,4504%. B.

Penetapan kadar kurkumin dengan metode KLT (kromatografi lapis tipis) dalam penelitian Azizah, *et al.* (2013) menggunakan rimpang kunyit, determinasi dilakukan pada kondisi analisis sebagai berikut: fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄ yang diaktifkan dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C selama 15 menit, dengan fase gerak kloroform : etanol : asam asetat glasial (94 : 5 : 1), dideteksi di bawah lampu UV 366 nm. Dari hasil analisis dan penetapan kadar menunjukkan rata-rata kadar kurkumin dari sampel ekstrak etanol (% b/b) ± SD sebesar 19,628% ± 3,11%, dengan nilai CV sebesar 0,6105%; rata-rata kadar kurkumin dari sampel ekstrak terpurifikasi (% b/b) ± SD sebesar 26,217% ± 4,96%, dengan nilai CV sebesar 1,3022%.

Penetapan kadar kurkumin dengan metode lain yaitu dengan metode spektrofotometri oleh Kusriani *et al.*, (2017) di mana metode tersebut digunakan untuk mengetahui kadar kurkuminoid dalam lima sampel sediaan sirup temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). Pengukuran kurkuminoid dilakukan menggunakan spektrofotometer *visible* pada panjang gelombang 425 nm. Hasil menunjukkan bahwa diperoleh batas deteksi dan batas kuantisasi metode analisis berturut-turut adalah 0,27 ppm dan 0,91 ppm dan persentase perolehan kembali sebesar 94,05% ± 0,97%. Kadar kurkuminoid dalam 5 sampel berturut-turut adalah 350 ppm, 347 ppm; 308 ppm; 163 ppm; dan 359 ppm.

2.3 Tinjauan Umum Tentang Metode Ekstraksi

2.3.1 Pengertian dan Tujuan Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang ditetapkan. Sebagian besar ekstrak dibuat dengan mengekstrak bahan baku dengan cara perkolasi (Depkes RI, 2014). Berdasarkan penjelasan dalam Farmakope Herbal Indonesia (2008) maka dapat diartikan bahwa ekstraksi atau penyarian merupakan perpindahan zat aktif dari bahan baku yang ditarik oleh cairan atau pelarut penyari dengan metode tertentu dan dilanjutkan dengan mengurangi pelarut cair dengan dikentalkan atau dicairkan. Pemilihan metode ekstraksi dan cairan mana yang sebaiknya digunakan tergantung pada sumber bahan alam, kelarutan bahan kandungan serta stabilitasnya (Voigh, 1994).

2.3.2 Larutan Ekstraksi

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, sehingga senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya. Faktor utama yang dipertimbangkan dalam pemilihan cairan penyari adalah selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan, dan keamanan. Sampai saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperbolehkan adalah air dan alkohol (etanol) serta campurannya. Alkohol merupakan pelarut yang paling umum digunakan untuk ekstraksi. Alkohol dapat digunakan pada ekstraksi pendahuluan karena kemampuannya untuk menarik sebagian besar senyawa yang terkandung dalam tumbuhan. Jika tidak dinyatakan lain maka ekstraksi dilakukan dengan etanol 70% P (Depkes RI, 2000; Depkes RI, 2008; Harborne, 1987).

2.3.3 Jenis-jenis Ekstraksi

Jenis ekstraksi bahan alam yang sering dilakukan dibagi menjadi dua, yaitu cara panas dan cara kering. Ekstraksi cara panas antara lain dengan cara refluks dan

penyulingan uap air. Ekstraksi cara dingin antara lain dengan cara maserasi, perkolasi, dan alat sokhlet (Dirjen POM, 1986).

2.3.3.1 Ekstraksi secara sokhletasi

Ekstraksi secara sokhletasi pada dasarnya adalah ekstraksi yang berkesinambungan, di mana cairan penyari dipanaskan sampai mendidih. Uap penyari akan naik melalui pipa samping, selanjutnya diembungkan lagi oleh pendingin tegak. Cairan penyari turun untuk menyari zat aktif dalam simplisia. Saat cairan penyari mencapai sifon, maka seluruh cairan penyari akan turun ke labu alas bulat dan proses sirkulasi berlanjut hingga zat aktif yang terdapat dalam simplisia tersari seluruhnya dengan ditandai jernihnya cairan yang lewat pada tabung sifon (Harborne, 1987).

2.3.3.2 Ekstraksi secara perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna dan tergolong metode ekstraksi berkesinambungan. Ekstraksi berkesinambungan adalah proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang baru atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya diulang berurutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi jumlah pelarut. Proses ekstraksi perkolasi terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahapan maserasi antara, dan tahapan perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh perkolat yang jumlahnya 1-5 kali bahan. Metode perkolasi memiliki beberapa keuntungan dan kerugian dari metode maserasi, keuntungannya adalah dengan metode perkolasi jumlah pelarut yang dibutuhkan lebih sedikit, dan lebih efisien karena pelarut yang digunakan selalu baru; sedangkan kerugiannya adalah metode perkolasi harus dilakukan dengan bejana khusus atau perkolator, dan jumlah simplisia yang dapat ditampung dalam bejana perkolator sedikit (Depkes RI, 2000; Kristanti *et al.*, 2008).

2.3.3.3 Ekstraksi secara maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu

ruangan. Maserasi merupakan salah satu contoh ekstraksi padat-cair dan merupakan ekstraksi bertahap. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada kesetimbangan. Setelah dilakukan penyaringan dapat dilakukan remaserasi, yang berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah penyaringan maserat pertama dan seterusnya. Jika pelarut yang digunakan berbeda dengan pelarut sebelumnya, maka sisa pelarut sebelumnya harus dihilangkan dengan cara dikeringkan terlebih dahulu. Keuntungan ekstraksi dengan metode maserasi antara lain adalah metode ini sederhana/mudah dilakukan, alat yang digunakan sederhana dan mudah didapat, dan dapat mengesktraksi simplisia dalam jumlah banyak. Kerugian ekstraksi dengan metode maserasi antara lain adalah membutuhkan pelarut dalam jumlah yang besar, membutuhkan waktu yang lama, dan kurang efektif (Depkes RI, 2000; Kristanti *et al.*, 2008).

2.3.3.4 Ekstraksi secara reflux

Ekstraksi ini juga pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak, lalu dipanaskan hingga mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembunkan oleh pendingin tegak dan akan menyari kembali zat aktif dalam simplisia, demikian siklus berulang seterusnya. Ekstraksi dengan cara ini biasanya dilakukan tiga kali dengan durasi selama empat jam tiap kali ekstraksi (Harborne, 1987)

2.3.3.5 Ekstraksi secara penyulingan

Ekstraksi penyulingan dilakukan untuk menyari serbuk simplisia yang mengandung komponen kimia yang memiliki titik didih yang tinggi pada tekanan udara normal, di mana pada kondisi pemanasan akan merusak zat aktifnya. Untuk mencegah hal tersebut maka dilakukan penyulingan terhadap penyari (Harborne, 1987).

2.4 Tinjauan Umum Tentang KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Kromatografi merupakan suatu proses pemisahan yang mana analit-analit dalam sampel terdistribusi antara 2 fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam dapat berupa bahan padat atau porus dalam molekul kecil, atau dalam bentuk cairan yang dilapiskan pada pendukung padat atau dilapiskan pada dinding kolom. Fase gerak dapat berupa gas atau cairan. Dalam kromatografi cair dan kromatografi lapis tipis, fase gerak yang digunakan selalu cair (Rohman, 2009).

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Pada kromatografi, komponen-komponennya akan dipisahkan antara dua buah fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal. Sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat (Haqiqi, 2008).

Kromatografi lapis tipis (KLT) dengan kromatografi kertas (KKr) dengan berbagai variasinya tergolong dalam kromatografi planar. KLT adalah metode kromatografi paling sederhana yang banyak digunakan (Wulandari, 2011). Pada KLT fase diamnya berupa lapisan yang seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik.

Dibandingkan dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan kromatografi gas (KG), KLT memiliki beberapa keuntungan, yaitu:

1. KLT memberikan fleksibilitas yang lebih besar, dalam hal memilih fase gerak.
2. Berbagai macam tehnik untuk optimasi pemisahan seperti pengembangan dua dimensi, pengembangan bertingkat, dan pembaceman penjerap dapat dilakukan pada KLT.
3. Proses kromatografi dapat diikuti dengan mudah dan dapat dihentikan kapan saja.
4. Semua komponen dalam sampel dapat dideteksi (Rohman, 2009).

2.4.1 Fase Diam

Pemilihan fase diam pada KLT didasarkan pada sifat fisika kima komponen sampel yang akan dipisahkan meliputi polaritas, kelarutan, kemampuan mengion, berat molekul, bentuk, dan ukuran analit. Sifat fisika kimia tersebut berperan penting dalam menentukan mekanisme pemisahan dalam KLT. Sorben fase diam pada KLT dapat berupa senyawa anorganik maupun organik. Sorben anorganik misalnya aluminium oksida, silikon oksida, magnesium karbonat, kalsium karbonat, dan lain lain. Sedangkan sorben organik misalnya pati dan selulosa (Wulandari, 2011).

Menurut Wulandari (2011) sorben yang paling populer adalah silika gel (64%), diikuti oleh selulosa (9%), dan alumina (3%). Berikut adalah beberapa jenis silika gel:

- a. Gel silika G : mengandung 13% pengikat kalsium sulfat
- b. Gel silika H : tidak mengandung pengikat
- c. Gel silika F254 : memiliki indikator fluoresensi
- d. Gel silika UV254 : memiliki indikator fluoresensi (Hamilton & Hamilton, 1987)

Berdasarkan pertimbangan polaritas komponen sampel, sorben dapat dikelompokkan sebagai berikut:

- a. Sorben untuk sampel lipofilik menggunakan aluminium oksida, silika, selulosa terasetilasi, poliamida.
- b. Sorben untuk sampel hidrofilik menggunakan selulosa, selulosa penukar ion, kieselguhr, poliamida, dan silika fase terbalik yang sudah termodifikasi (Wulandari, 2011).

Lempeng silika gel siap pakai dapat langsung digunakan tanpa adanya aktivasi lempeng. Aktivasi lempeng hanya diperlukan jika lempeng KLT berada pada ruangan dengan kelembapan tinggi. Aktivasi dilakukan dengan memanaskan lempeng sampai 105⁰C selama 30 menit diikuti dengan pendinginan dalam suhu ruangan dengan kelembapan relatif 40-50% (Wulandari, 2011).

2.4.2 Fase Gerak

Fase gerak atau disebut juga dengan eluen, berperan penting pada proses elusi bagi larutan umpan (*feed*) untuk melewati fase diam (adsorben). Interaksi antara adsorben dengan eluen sangat menentukan terjadinya pemisahan komponen (Haqiqi, 2008). Fase gerak pada KLT memiliki dua tugas penting, yaitu memindahkan solut dari adsorben sehingga solut bisa dibawa oleh fase gerak melewati lempeng, dan membantu pemisahan campuran solut sehingga bisa terdeposit di beberapa tempat yang berbeda dan setelah itu dapat teridentifikasi yang juga disebut juga sebagai selektifitas solven (Hamilton & Hamilton, 1987).

Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba-coba karena waktu yang diperlukan hanya sebentar (Rohman, 2009). Pemilihan fase gerak dapat mengacu pada literatur pustaka untuk menemukan fase gerak yang sesuai (Sherma and Fried, 2003). Pemilihan eluen yang cocok dapat dilakukan melalui tahapan optimasi eluen. Optimasi eluen diawali dengan menentukan sifat fisika kimia yang akan dianalisis dan jenis sorben fase diam yang digunakan (Wulandari, 2012).

2.4.3 Aplikasi Sampel (penotolan Sampel)

Untuk mendapatkan pemisahan yang optimal pada kromatografi lapis tipis maka diperlukan penotolan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin, sebab jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka hal ini dapat menurunkan resolusi (Wulandari, 2012). Penotolan sampel yang tidak tepat dapat menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda (Rohman, 2009). Berdasarkan tujuan analisis, berikut adalah jumlah sampel yang disarankan untuk digunakan:

Tabel 2.1 Parameter-parameter Aplikasi yang Direkomendasikan (Rohman, 2009).

Tujuan	Diameter bercak (mm)	Konsentrasi sampel (%)	Banyak sampel (μg)
Densitometri	2 mm untuk volume sampel 0,5 μl	0,02-0,2	0,1-1 (untuk KLT-KT) 1-10 (konvensional)

Identifikasi	3 mm untuk volume sampel 1 μ l	0,1-1	1-20
Uji kemurnian	4 mm untuk volume sampel 4 μ l	5	100

Untuk memperoleh reproduisibilitas, volume sampel yang ditotolkan paling sedikit 0,5 μ l. Jika volume sampel yang ditotolkan lebih besar dari 2-10 μ l maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan pengeringan antar totolan (Rohman, 2009). Pelarut yang dipakai untuk penotolan harus betul-betul dihilangkan dari lapisan fase diam sebelum dieluasi, jika perlu dengan penyemprot udara panas atau pengering rambut listrik. Hal ini terutama penting jika pelarut yang digunakan adalah air (Gritter *et al.*, 1991).

2.4.4 Eluasi (Pengembangan)

Menurut Wulandari (2009), eluasi adalah impregnasi lempeng yang bertujuan untuk memisahkan senyawa alkaloid (dengan cara mengontrol pH) dan untuk mengubah polaritas lempeng silika gel. Pengembangan pelarut biasanya dilakukan dengan cara menaik (*ascending*), di mana ujung bawah lempeng dicelupkan ke dalam pelarut pengembang (Rohman, 2009). Eluen bermigrasi dari bawah lempeng menuju ke atas dengan gaya kapilaritas (Wulandari, 2009).

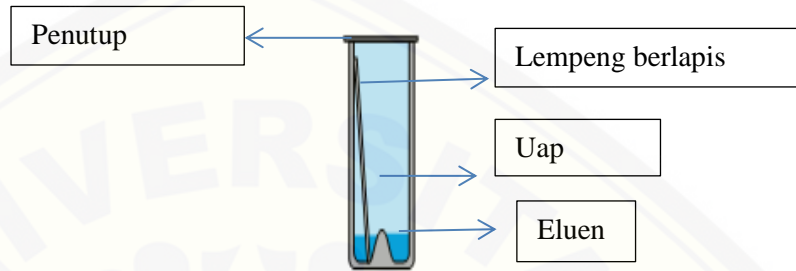
Untuk menghasilkan reproduisibilitas yang baik, maka *chamber* harus dijenuhkan dengan fase gerak (Rohman, 2009). Fase gerak dalam *chamber* harus berada di bawah tempat penotolan pada lempeng. Fase gerak ditambahkan sedalam 0,5-1 cm, dan untuk menjenuhkan menjenuhkan udara dengan uap fase gerak *chamber* dikocok agar membasahi kertas saring dan didiamkan setidaknya 15 menit agar atmosfer dalam *chamber* mencapai kesetimbangan (Hamilton & Hamilton, 1987).

Berikut adalah hal-hal yang perlu diperhatikan selama pengembangan menurut Wulandari (2009):

- Selama pengembangan, *chamber* harus berada di atas bidang datar, permukaan *chamber* juga harus sejajar (tidak miring), dan pastikan selama pengembangan tidak terganggu oleh hal-hal yang tidak diinginkan.

- b. Selama pengembangan, dalam keadaan apapun tidak diperkenankan menggerakkan *chamber* untuk mengamati proses pengembangan.
- c. Selama pengembangan juga tidak diperkenankan membuka tutup *chamber* untuk melihat garis depan eluen.

Ilustrasi proses pengembangan lempeng dalam *chamber* dapat dilihat pada gambar 2.3 di bawah ini:



Gambar 2.3 Proses Pengembangan Lempeng (Wulandari, 2011)

2.4.5 Identifikasi Kromatogram

Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna (Rohman, 2009). Untuk dapat mengamati pemisahan maka diperlukan proses visualisasi, di mana visualisasi dimaksudkan untuk melihat komponen penyusun yang sudah terpisah setelah proses pengembangan (Mulja & Suharman, 1995). Metode visualisasi dapat dibagi menjadi dua golongan pembagian, yaitu cara fisika dan kimia, dan cara destruktif dan non destruktif.

Metode visualisasi fisika yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan pencacahan radioaktif dan dengan fluoresensi di bawah sinar ultraviolet. Metode visualisasi kimia digunakan dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi kimia melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas (Rohman, 2009).

2.4.6 Efisiensi Kromatogram

Pemilihan kondisi analisis yang digunakan dapat dilihat berdasarkan penilaian parameter efisiensi sistem kromatografi. Adapun parameter yang menentukan efisiensi kromatogram tersebut antara lain: resolusi (R_s), nilai *theoretical plate*/lempeng teori (N), dan nilai HETP (*height equivalent of theoretical plate*).

- a. Resolusi (R_s) merupakan kemampuan kondisi analisis untuk memisahkan dua senyawa dalam sampel. Secara matematik dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$R_s = \frac{2[(Z)_A - (Z)_B]}{W_A + W_B} \dots\dots\dots(2.1)$$

Di mana:

R_s = pemisahan antara dua puncak kromatogram (zat A dan zat B)

$(Z)_A$ = jarak migrasi zat A

$(Z)_B$ = jarak migrasi zat B

W_A = lebar dasar puncak zat A

W_B = lebar dasar puncak zat B

Resolusi analit dengan zat lain sebaiknya lebih dari 1,5. Semakin besar nilai resolusi semakin baik pemisahan terjadi. Apabila resolusi kromatogram kecil yaitu kurang dari 1,5 maka perlu dilakukan evaluasi kondisi analisis yang digunakan pada metode tersebut.

- b. Nilai *theoretical plate* atau lempeng teori (N) merupakan nilai atau angka pelebaran zona yang menunjukkan satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam. Secara matematik dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$N = 16 \left[\frac{Z_s}{W} \right]^2 \dots\dots\dots(2.2)$$

Di mana:

N = nilai pelebaran zona untuk satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam,

W = lebar dasar puncak,

Z_s = jarak migrasi analit.

- c. Nilai HETP (*height equivalent of theoretical plate*)/ H merupakan panjang jarak tempuh eluen yang dibutuhkan sampai terjadinya satu kali kesetimbangan dalam fase gerak dan fase diam. Secara matematik dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$H = \left[\frac{Z_f}{N} \right]^2 \dots\dots\dots(2.3)$$

Di mana:

H = jarak tempuh atau migrasi analit untuk satu kali kesetimbangan dalam fase diam dan fase gerak

N = nilai pelebaran zona untuk satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam

Z_f = jarak migrasi fase gerak

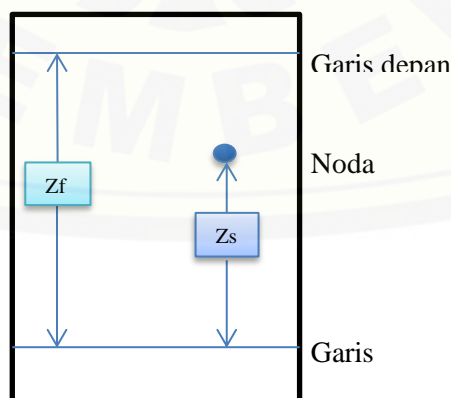
(Wulandari, 2011)

2.4.7 Analisis Kualitatif

Analisis kualitatif pada kromatografi planar (kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis) dapat dilakukan dengan cara membandingkan faktor retardasi (R_f) senyawa baku dan senyawa yang tidak diketahui (Rohman, 2009). Faktor retardasi (R_f) adalah parameter yang digunakan untuk menggambarkan migrasi senyawa dalam KLT yang menyatakan posisi noda pada fase diam setelah dielusi. Penentuan R_f analit, yaitu membandingkan jarak migrasi noda analit dengan jarak migrasi fase gerak/eluen (gambar), dapat dihitung dengan persamaan:

$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi analit}}{\text{Jarak migrasi eluen}} = \frac{Z_s}{Z_f} \dots \dots \dots (2.4)$$

Nilai R_f berkisar antara 0 dan 1, dan nilai terbaik adalah antara 0,2 – 0,8 (Wulandari, 2011). Untuk menghasilkan R_f yang reproduibel maka perlu memperhatikan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi nilai R_f , seperti kejenuhan *chamber*, kualitas dan kuantitas fase gerak, aktivitas adsorben, dan tehnik dan kondisi kromatografi (Hamilton & Hamilton, 1987). Ilustrasi migrasi analit dan eluen dapat dilihat pada gambar 2.4 berikut ini:



Gambar 2.3 Ilustrasi Migrasi Analit dan Eluen pada Lempeng KLT (Wulandari, 2011)

2.4.8 Analisis Kuantitatif

Metode kuantitasi analit KLT dapat dilakukan dengan metode ekstraksi noda yang meliputi tahap pengeringan lempeng, penandaan noda analit, pemotongan bagian lempeng yang mengandung analit, pengumpulan sorben, ekstraksi analit dari sorben, dan pengukuran dengan dibandingkan standar secara mikroanatikal seperti spektrofotometri fluorosensi. Metode ini biasanya memakan waktu lama dan sering kurang akurat karena sulitnya menentukan tempat lingkaran noda secara tepat, hilangnya sorben selama pemotongan dan pengumpulan, ekstraksi yang kurang reproduibel dan tidak sempurna dari sorben. Metode kuantitasi lain yang lebih umum digunakan adalah KLT-densitometri, di mana parameter kuantitatif yang digunakan adalah tinggi puncak kurva densitometri dan area di bawah puncak kurva densitometri (Wulandari, 2011).

2.5 Densitometri

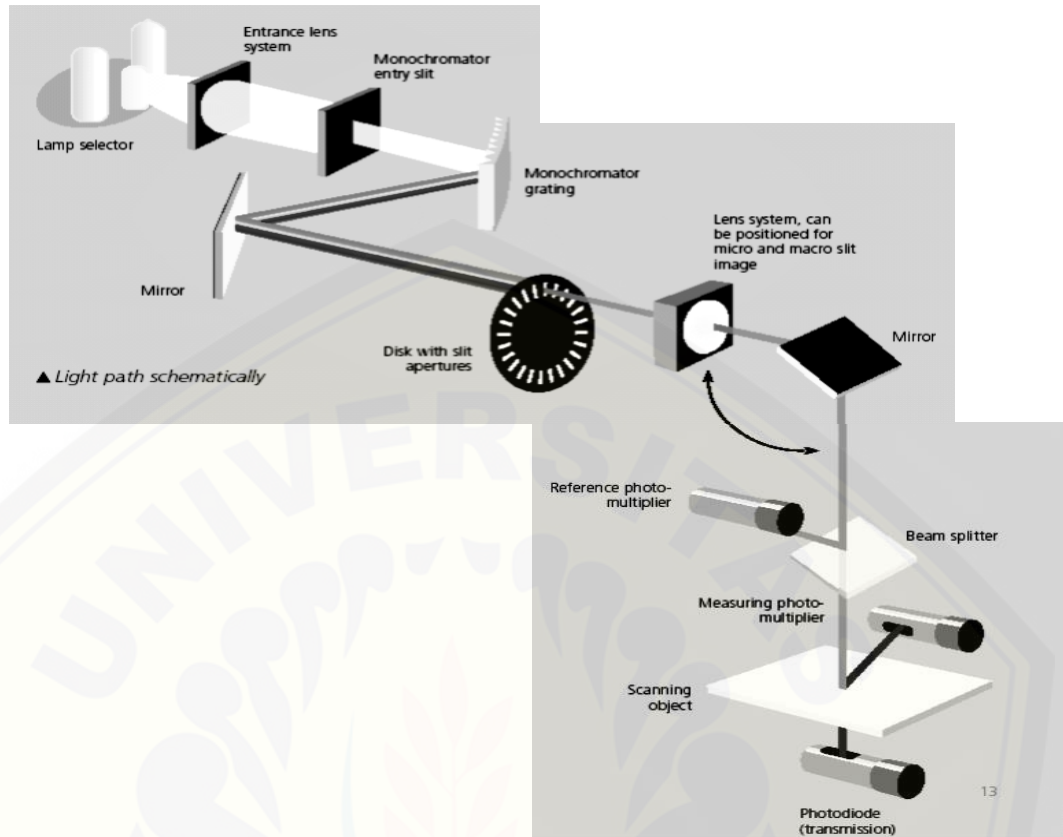
Densitometri merupakan metode analisis instrumental penentuan analit secara kualitatif maupun secara kuantitatif berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT (Wulandari, 2011). Analisis kualitatif ditentukan dengan cara membandingkan nilai R_f analit dengan nilai R_f standar. Noda analit yang memiliki R_f yang sama dengan standar diidentifikasi kemurnian analit dengan cara membandingkan spektrum pada tiga posisi dalam noda (awal, tengah, dan akhir noda), sedangkan uji identitas dilakukan dengan membandingkan spektrum analit dengan spektrum standar. Sedangkan analisis kuantitatif ditentukan dengan cara membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda standar pada fase diam yang diketahui konsentrasinya (Wulandari, 2011).



Gambar 2.4 Densitometri Evaluasi Kromatogram dengan TLC Scanner (CAMAG, 2012)

Interaksi radiasi elektromagnetik (REM) merupakan intensitas cahaya yang mengenai molekul senyawa dalam noda. REM dengan noda pada fase diam KLT menentukan intensitas cahaya yang diabsorpsi, ditransmisi, dipantulkan (refleksi) oleh noda analit dari intensitas REM semula. Jika pada fase diam tidak ditemukan noda, maka cahaya yang jatuh akan dipantulkan kembali. Namun jika cahaya tersebut jatuh pada pelat yang terdapat noda dari suatu senyawa maka sebagian cahaya akan diserap dan intensitas yang dipantulkan akan berbeda dari intensitas cahaya yang datang (Wulandari, 2011).

Skema sistem optik densitometri dapat dilihat pada gambar 2.6. Sumber radiasi yang digunakan dapat dipilih yaitu sinar UV (lampu deuterium), sinar VIS (lampu tungsten) dan sinar fluoresensi (lampu merkuri). Sinar yang dipancarkan berupa sinar polikromatik masuk melewati celah monokromator. Didalam monokromator sinar didispersikan menjadi sinar monokromatik dengan teknik grating. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih keluar melalui celah keluar monokromator. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih dipantulkan melalui cermin sehingga mengenai objek (lempeng KLT). Sinar yang datang dapat dipantulkan maupun diteruskan. Sinar yang dipantulkan atau diteruskan ditangkap oleh pengganda foton (*photomultiplier*) berfungsi untuk menggandakan sinar yang datang sehingga dihasilkan elektron yang terbaca oleh sistem komputer sebagai data *output* (Wulandari, 2011).



Gambar 2.5 Skema Sistem Optik Densitometer (CAMAG, 2012)

2.6 Optimasi Kondisi KLT

Pada analisis menggunakan metode KLT, ada beberapa faktor yang berperan memberikan keberagaman terhadap KLT yaitu kelembaban lingkungan, bagaimana cara sampel diaplikasikan pada lempeng, ukuran dan tipe *chamber* pengembang, pengkondisian lempeng dalam keberadaan uap fase gerak, dan komposisi fase gerak, dan faktor-faktor lainnya (Costanzo, 1997). Tujuan optimasi adalah menghemat biaya, waktu dan tenaga; menghasilkan efisiensi pemisahan sampel yang paling baik; memilih fase gerak dan fase diam; serta mendapatkan kecepatan elusi yang optimal (Ahuja, 1989). Tujuan optimasi menurut Costanzo (1997) adalah mengembangkan metode analisis terkontrol yang mampu mempertahankan batas ketangguhan metode analisis untuk dipakai sehari-hari. Pemilihan kondisi analisis dapat dilihat berdasarkan penilaian parameter efisiensi sistem kromatografi, antara lain: nilai R_s , nilai N , dan H (Wulandari, 2011).

2.7 Validasi Metode Analisis

2.7.1 Selektivitas/Spesifisitas

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel (Harmita, 2004). Suatu metode dikatakan spesifik apabila metode tersebut hanya memberikan respon untuk suatu analit tunggal (*single analyte*) sedangkan metode dapat dikatakan selektif apabila metode tersebut memberikan respon untuk beberapa senyawa kimia yang dapat dengan jelas dibedakan satu sama lain.

Selektivitas suatu metode dapat ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s). Resolusi analit dengan zat lain sebaiknya lebih dari 1,5. Bila resolusinya kecil ($<1,2$) perlu dilakukan optimalisasi lagi dari kondisi analisis atau kondisi kromatografi yang dilakukan (Harmita, 2004). Untuk mengetahui spesifisitas metode dapat ditentukan berdasarkan pengamatan identitas (*identity*) dan kemurnian (*purity*) analit dalam sampel. Uji kemurnian spektra diambil dari lereng puncak pertama berkorelasi dengan puncak maksimum spektra. Korelasi ini diidentifikasi sebagai $r(s, m)$ pada winCATS, dengan s menunjukkan mulai puncak dan m puncak maksimum. Korelasi dari spektra diambil pada puncak maksimum dengan salah satu lereng bawah atau akhir puncak, di winCATS bernama $r(m)$ (*middle*), e (*end*)), digunakan sebagai referensi untuk perhitungan statistik (Indrayanto & Yuwono, 2003).

2.7.2 Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode analisis untuk memberikan respon secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Harmita, 2004). Penentuan linieritas minimal menggunakan lima macam konsentrasi antara 0,25-2,00 kali dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto & Yuwono, 2003).

Uji linieritas suatu metode analisis dilakukan untuk membuktikan adanya hubungan antara konsentrasi analit terhadap respon detektor. Hubungan tersebut dianggap linier apabila harga koefisien korelasi (r) dari perhitungan mendekati ± 1 tergantung dari arah garis kurva hubungan konsentrasi analit terhadap respon

detektor (Harmita, 2004). Selain harga r sebagai penentuan parameter linieritas, hal tersebut juga ditentukan berdasarkan harga S_y (simpangan baku residual dari garis regresi), S_{x_0} (standar deviasi dari fungsi), dan V_{x_0} (koefisien variasi dari fungsi). Secara matematika dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$S_y = \sum(y - y_i)^2, \text{ untuk } y_i = a + bx$$

$$S_{x_0} = \frac{S_y}{b}$$

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{x}} \times 100\% \dots \dots \dots (2.5)$$

Di mana:

S_y = simpangan baku residual dari garis regresi,

S_{x_0} = standart deviasi dari fungsi

V_{x_0} = koefisien variasi dan fungsi

\bar{x} = rata-rata konsentrasi uji

b = slope atau kemiringan garis regresi antara konsentrasi terhadap luas area dari persamaan garis regresi $y = a + bx$

N = jumlah konsentrasi uji (Indrayanto & Yuwono, 2003)

Menurut Indrayanto & Yuwono (2003), persyaratan data linieritas untuk validasi metode bisa diterima jika memenuhi nilai koefisien korelasi (r) lebih besar dari 0,99 atau memiliki nilai koefisien variasi fungsi (V_{x_0}) yang lebih kecil dari 5%.

2.7.3 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantitasi. Batas kuantitasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan (Rohman, 2009). Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$LOD = X_p = 2S_{x_0} \cdot t_{\text{tabel}} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(Y_p - Y)^2}{b^2 \cdot Q_{xx}}}$$

$$Y_p = a + S_y \cdot t_{tabel} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{X^2}{Q_{xx}}}$$

$$Q_{xx} = \sum X_i^2 - \frac{1}{N} \left(\sum X_i \right)^2 \text{ untuk } y = a + bx$$

$$LOQ = \frac{10}{3} \cdot LOD \dots \dots \dots (2.6)$$

Dimana:

- S_y = simpangan baku residual dari garis regresi,
 S_{x_a} = standart deviasi dari fungsi,
 a = intersep garis regresi antara konsentrasi terhadap luas area dari persamaan garis regresi $y = a + bx$,
 b = slope atau kemiringan garis regresi antara konsentrasi terhadap luas area dan persamaan garis regresi $y = a + bx$,
 t_{tabel} = angka korelasi tingkat kepercayaan pengukuran dengan sejumlah uji.
 N = jumlah konsentrasi uji (Indrayanto, 1994).

2.7.4 Presisi

Presisi dari suatu metode analisis adalah derajat kesesuaian diantara masing-masing hasil uji, jika prosedur analisis diterapkan berulang kali pada sejumlah cuplikan yang diambil dari satu sampel homogen. Presisi dinyatakan sebagai standar deviasi atau relatif standar deviasi (koefisien variasi) (Satiadarma et al., 2004). Presisi merupakan kemampuan suatu metode analisis untuk menunjukkan kedekatan dari suatu seri pengukuran yang diperoleh dari sampel yang homogen.

Terdapat 3 kategori pengujian presisi, yaitu:

- a. Keterulangan/repeatabilitas, yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orangnya, peralatannya, tempatnya maupun waktunya. repeatabilitas dapat dinilai dengan pengukuran minimal 9 kali yang mencakup kisaran yang digunakan dalam prosedur analisis (misalnya 3 konsentrasi/3 replikasi). Selain itu, juga dapat dinilai dengan suatu pengukuran sebanyak minimal 6 kali pada 100% dari konsentrasi uji.

- b. Presisi Antara, yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang salah satunya berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.
- c. Kebolehasihan/reprodusibilitas, merupakan ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya. (Rohman, 2009).

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium (Harmita, 2004). Menurut Huber (2007), kriteria presisi dapat ditentukan dengan persen analit atau bahan aktif yang terkandung dalam sediaan yang ditunjukkan pada tabel 2 berikut:

Tabel 2.2 Konsentrasi Analit Berbanding Presisi (Huber, 2007)

Analit	Unit	RSD (%)
100	$\geq 100\%$	≤ 1.3
10	$\geq 10\%$	≤ 2.8
1	$\geq 1\%$	≤ 2.7
0.1	$\geq 0.10\%$	≤ 3.7
0.01	≥ 100 ppm	≤ 5.3
0.001	≥ 10 ppm	≤ 7.3
0.0001	≥ 1 ppm	≤ 11
0.00001	≥ 100 ppb	≤ 15
0.000001	≥ 10 ppb	≤ 21
0.0000001	≥ 1 ppb	≤ 30

2.7.5 Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Akurasi atau kecermatan sering dinyatakan dalam persen perolehan kembali (*% recovery*). Persen perolehan kembali (*% recovery*) diperoleh melalui pengukuran sejumlah analit yang diketahui kadarnya ditambahkan dalam sampel. Akurasi dapat ditentukan dengan dua metode, yaitu:

- a. Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*), yaitu pengukuran sejumlah analit bahan murni yang ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan (plasebo) dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang sebenarnya.

Penentuan persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 80%-120% dari kadar analit yang diperkirakan.

b. Metode penambahan standar atau pembanding (*standard addition metode*), yaitu menambahkan sejumlah tertentu analit dalam sampel yang telah dianalisis untuk selanjutnya dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Penambahan analit ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 30% – 60% kali dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto & Yuwono, 2003).

$$\% \text{ Perolehan Kembali} = \frac{(C_F - C_A)}{C_A^*} \times 100 \dots \dots \dots (2.7)$$

Keterangan :

C_F = Konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A = Konsentrasi sampel sebenarnya

C_A^* = Konsentrasi analit yang ditambahkan (Harmita, 2004).

Persen perolehan kembali seharusnya tidak melebihi nilai presisi RSD (Harmita, 2004). Rentang kesalahan yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada tabel di bawah ini. Jika nilai persen perolehan kembalinya di luar kisaran ini maka prosedur analisis harus dikaji ulang (Rohman, 2009).

Tabel 2.3 Persen Perolehan Kembali (*% recovery*) Analit pada Konsentrasi yang Berbeda (Huber, 2007)

<i>Active ingredient (%)</i>	Unit	<i>Mean Recovery (%)</i>
100	≥100%	98-102
≥10	≥10%	98-102
≥1	≥1%	97-103
≥0.1	≥0.10%	95-105
0.01	≥100 ppm	90-107
0.001	≥10 ppm	80-110
0.0001	≥1 ppm	80-110
0.00001	≥ 100 ppb	80-110
0.000001	≥10 ppb	60-115
0.0000001	≥1 ppb	40-120

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Oktober 2015 sampai selesai bertempat di Laboratorium Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Jember.

3.2 Rancangan Penelitian

3.2.1 Rancangan Percobaan

Penelitian penetapan kadar kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temulawak dengan metode KLT Densitometri. Sebagai variabel analisis adalah linieritas, batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK), spesifisitas, presisi, dan akurasi. Selanjutnya dilakukan penetapan kadar kurkumin dalam ekstrak temulawak.

Sebelum dilakukan penetapan kadar terlebih dahulu dilakukan optimasi untuk mendapatkan kondisi analisis yang optimum. Variabel analisis yang memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan dapat menyatakan bahwa metode yang akan digunakan dalam penetapan kadar valid, untuk itu perlu dilakukan validasi terhadap metode analisis yang akan digunakan dalam sebuah penelitian.

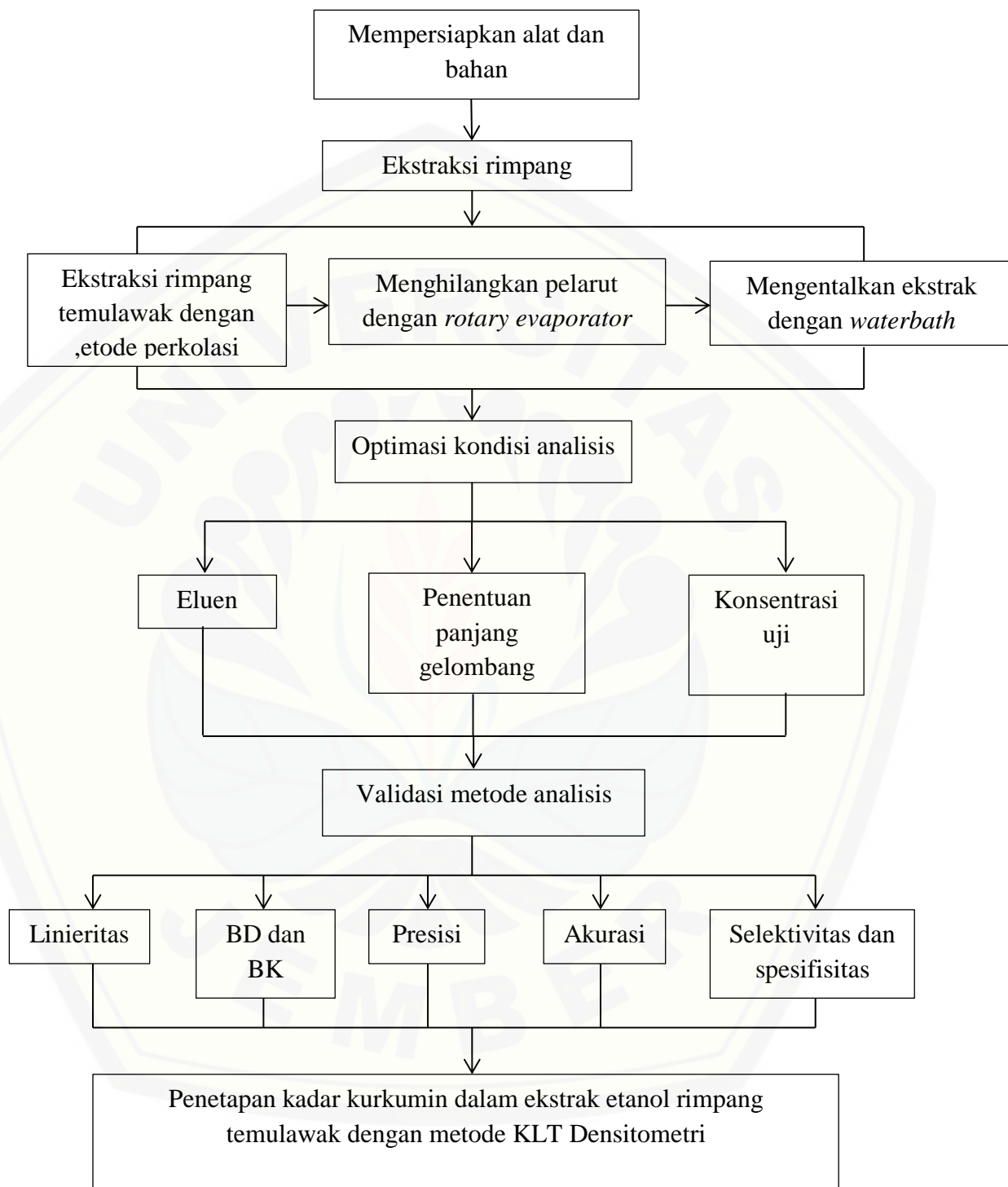
3.2.2 Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat – alat yang digunakan adalah *scanner* Densitometer winCATS Camag, perangkat komputer dengan program winCATS dan program *Validation Method of Analysis*, oven, lampu *Ultra Violet* (UV), timbangan analitik Sartorius, bejana camag (*chamber*), *hot plate*, *waterbath*, thermometer, *freezer*, kulkas, cawan porselen, labu ukur (5 mL, 10 mL, dan 25 mL) pyrex, gelas ukur (10 ml dan 25mL) pyrex, erlenmeyer



Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian Analisis Kuantitatif Kurkumin dalam Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak dengan Metode KLT Densitometri

25 mL, *beaker glass* (50 ml, 100 ml, dan 500 ml), pipet volume (0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 10 mL) pyrex, bola pipet, batang pengaduk, pipet tetes, dan vial.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah lempeng KLT Silika Gel 60 F₂₅₄, kertas saring, standar Kurkumin, rimpang temulawak, aquades, etanol 70% (teknis), etanol 70% p.a., asam asetat glasial, metanol p.a, aquabides, kloroform p.a., toluen p.a.

3.4 Ekstraksi Kurkumin dari Rimpang Temulawak

Ekstraksi kurkumin pada rimpang temulawak dilakukan dengan cara perkolasi. Sebanyak 600 gram serbuk temulawak ditimbang dan dibasahi dengan 300 ml etanol, dan dimasukkan ke dalam bejana tertutup dan didiamkan selama tiga jam. Filtrat diambil sedikit demi sedikit dan dituangkan ke dalam perkolator sambil ditekan perlahan-lahan. Larutan etanol ditambahkan secukupnya sampai cairan menetes dan larutan etanol mencapai di atas permukaan serbuk. Perkolator ditutup dan dibiarkan selama 24 jam. Larutan filtrat yang diperoleh diteteskan melalui keran perkolator dengan kecepatan 1 ml per menit, sambil ditambahkan pelarut etanol berulang-ulang sampai pelarut yang keluar dari keran perkolator berwarna bening.

Ekstrak dipisahkan dari pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu tidak lebih dari 48°C dengan kecepatan 200 rpm. Ekstrak yang dihasilkan kemudian dikeringkan dengan dalam oven bersuhu 50°C sampai menjadi ekstrak yang kental.

3.5 Optimasi Kondisi Analisis

Kondisi analisis yang perlu dioptimasi pada metode ini meliputi: optimasi fase gerak/eluen, waktu pengeringan lempeng setelah eluasi, panjang gelombang pengamatan, dan konsentrasi uji analit.

3.5.1 Optimasi Eluen

Eluen yang digunakan untuk optimasi eluen didasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu dengan komposisi sebagai berikut:

- a. Kloroform : Etanol : Asam Asetat Glisial (94 : 5 : 1 v/v) (Azizah dan Salamah, 2013)
- b. Kloroform : Metanol (95 : 5 v/v) (Handayani dan Pramono, 2008)
- c. Kloroform : Etanol : Air Suling (25 : 0,96 : 0,04) (Martono, 1996)
- d. Kloroform : Toluena : Metanol (80 : 15 : 5) (Pothitirat and Gritsanapan, 2005)

Eluen yang paling optimum didasarkan pada parameter efisiensi kromatogram yang meliputi nilai N (*Theoretical Plate Number*) yang paling besar, nilai H (*Height Equivalent to A Theoretical Plate*) yang terkecil, nilai Rf (*Retardation factor*) antara 0,1- 0,9 (Indrayanto & Yuwono, 2003), dan menghasilkan kromatogram dengan satu puncak.

3.5.2 Optimasi Panjang Gelombang (λ)

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan scanning noda analit pada Camag TLC *Scanner* (Densitometri) dan *software* program winCATS. Penilaian panjang gelombang maksimal dilakukan pada area panjang gelombang antara 200-700 nm, karena *discan* pada panjang gelombang pada daerah sinar UV dan sinar tampak/*visible*. Penilaian panjang gelombang optimum dipilih berdasarkan pada panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum yang paling tinggi.

3.5.3 Optimasi Konsentrasi Uji

Prosedur optimasi diawali dengan membuat larutan standar kurkumin dalam pelarut sesuai dengan konsentrasi yang akan dioptimasi, yaitu 2000 ppm, 1500 ppm, 1000 ppm, dan 800 ppm. Larutan sampel dibuat dengan cara menimbang sejumlah tertentu sampel kemudian dilarutkan dalam pelarut hasil optimasi sehingga larutan mengandung kurkumin dengan konsentrasi sesuai dengan yang akan dioptimasi. Setelah itu larutan standar dan sampel ditotolkan pada lempeng KLT Silika Gel F₂₅₄ masing-masing 2 μ L dengan mikropipet. Eluen dipreparasi dengan komposisi sesuai

dengan hasil optimasi, kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* lalu *chamber* ditutup dan dibiarkan hingga jenuh. Lempeng KLT yang telah ditotol dimasukkan ke dalam bejana yang telah jenuh dan ditunggu hingga eluasi mencapai tanda batas. Selanjutnya lempeng dikeringkan dan noda yang terbentuk *discan* pada panjang gelombang hasil optimasi.

Penilaian konsentrasi analit yang paling optimum berdasarkan parameter efisiensi kromatogram yaitu nilai N yang paling besar, nilai H terkecil, nilai $R_s \geq 1.5$ dan lebar noda menyesuaikan lebar celah sinar (3-12 mm).

3.6 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis determinasi kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temulawak dengan KLT Densitometri meliputi berbagai parameter yaitu: linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi.

3.6.1 Linieritas

Dibuat larutan standar kurkumin dalam pelarut hasil optimasi dengan 10 tingkat konsentrasi dalam rentang 60-240% dari konsentrasi uji hasil optimasi. Larutan standar kurkumin dibuat dengan menimbang sejumlah tertentu standar kurkumin kemudian dilarutkan dengan pelarut hasil optimasi, lalu diencerkan sejumlah tertentu hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi yang diinginkan.

Larutan standar yang telah dibuat dimasukkan ke dalam vial, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT Silika Gel F₂₅₄ masing-masing 2 μ L dengan mikropipet. Eluen dipreparasi dengan cara membuat campuran dengan komposisi eluen sesuai hasil optimasi, kemudian dimasukkan dalam *chamber* lalu *chamber* ditutup dan dibiarkan hingga jenuh (kertas saring terbasahi eluen). Lempeng KLT yang telah ditotol dimasukkan dalam *chamber* yang sudah jenuh dengan eluen hasil optimasi dan ditunggu hingga eluasi mencapai tanda batas. Setelah itu lempeng KLT dikeringkan, lalu noda yang terbentuk *discan* pada panjang gelombang hasil optimasi.

Dihitung nilai parameter linieritas dan rentang dihitung dari data hasil scanning dengan program *Validation Method of Analysis*. Kriteria penerimaan (*Acceptance*

Criteria) dikatakan linier jika koefisien korelasi (r) $\geq 0,99$; Koefisien variasi fungsi (V_{xo}) $< 5\%$ (Indrayanto & Yuwono, 2003).

3.6.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Dibuat larutan standar kurkumin dalam pelarut yang sesuai hasil optimasi dengan 9 tingkat konsentrasi dibawah konsentrasi linieritas. Larutan standar kurkumin dibuat dengan menimbang sejumlah tertentu standar kurkumin kemudian dilarutkan dengan pelarut hasil optimasi, lalu diencerkan hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi yang diinginkan.

Larutan standar yang sudah dibuat dimasukkan dalam vial dan ditotolkan pada lempeng KLT Silika Gel F254 masing-masing $2 \mu\text{L}$ dengan mikropipet. Eluen dipreparasi seperti pada uji linieritas, kemudian lempeng KLT yang telah ditotol dieluasi sampai tanda batas. Lempeng KLT kemudian dikeringkan, dan noda yang terbentuk dipindai pada panjang gelombang hasil optimasi. Nilai batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung dari data hasil *scanning* dengan program *Validation Method of Analysis* (Indrayanto & Yuwono, 2003).

3.6.3 Selektivitas/Spesifisitas

Larutan standar dibuat dengan konsentrasi sesuai hasil optimasi. Kemudian membuat larutan sampel dengan konsentrasi sesuai hasil optimasi.

Larutan standar dan sampel yang sudah dibuat dimasukkan dalam vial dan ditotolkan pada lempeng KLT Silika Gel F₂₅₄ masing-masing $2 \mu\text{L}$ dengan mikropipet. Eluen dipreparasi seperti pada uji linieritas, kemudian lempeng KLT dikeringkan. Selanjutnya noda yang terbentuk dipindai pada panjang gelombang hasil optimasi.

Kromatogram kurkumin yang terbentuk diamati dan dicek spektra *purity* dan *identity* puncak standar dan sampel. Pada kromatogram sampel, dihitung Resolusi puncak kurkumin terhadap puncak yang lain (*unknown*). Syaratnya yaitu nilai resolusi (R_s) $\geq 1,5$ (Harmita, 2004).

3.6.4 Presisi

Pengujian parameter presisi yang dilakukan meliputi *repeatability* dan *intermediate* presisi. Uji presisi dilakukan dalam beberapa tahap yaitu pembuatan kurva baku pada 6 tingkat konsentrasi antara 80%-180% dari konsentrasi uji hasil optimasi. Kemudian dilakukan preparasi sampel untuk *repeatability* dengan menimbang sejumlah sampel ekstrak etanol rimpang temulawak (6x replikasi) dan dilarutkan.

Selanjutnya larutan standar dan sampel yang sudah dibuat dimasukkan dalam vial dan ditotolkan pada lempeng KLT Silika Gel F₂₅₄ masing-masing 2 μ L dengan mikropipet. Eluen dipreparasi seperti pada uji linieritas, kemudian lempeng KLT yang telah ditotol dieluasi sampai tanda batas. Lempeng KLT kemudian dikeringkan, dan noda yang terbentuk dipindai pada panjang gelombang hasil optimasi. Prosedur diatas dilakukan sebanyak tiga kali pada tiga hari yang berbeda untuk menentukan *intermediate precision* (presisi antara). Setelah itu, dihitung nilai parameter presisi dari data hasil *scanning* dan menghitung nilai SD dan RSD dimana nilai RSD tidak boleh lebih dari kriteria penerimaan studi kepresisian pada konsentrasi yang digunakan (Huber, 2007).

3.6.5 Akurasi

Pengujian parameter akurasi pada penelitian ini menggunakan metode standar adisi. Pengujian akurasi dilakukan dengan beberapa tahap yaitu: pembuatan sampel adisi dengan penambahan standar sebanyak 30%, 45%, dan 60% dari konsentrasi analit dalam sampel sesuai dengan hasil uji presisi. Selanjutnya dilakukan pembuatan kurva baku dengan rentang sesuai dengan konsentrasi linieritas.

Larutan standar dan sampel yang sudah dibuat dimasukkan dalam vial dan ditotolkan pada lempeng KLT Silika Gel F₂₅₄ masing-masing 2 μ L dengan mikropipet. Eluen dipreparasi seperti pada uji linieritas, kemudian lempeng KLT yang telah ditotol dieluasi sampai tanda batas. Lempeng KLT kemudian dikeringkan, dan noda yang terbentuk dipindai pada panjang gelombang hasil optimasi. Setelah itu, dihitung nilai

parameter akurasi dari data hasil *scanning* dan menghitung nilai SD dan RSD dimana nilai RSD tidak boleh lebih dari kriteria penerimaan studi akurasi pada konsentrasi yang digunakan (Huber, 2007).

3.7 Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Rimpang Temulawak

Penetapan kadar kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temulawak diawali dengan pembuatan kurva baku dengan rentang sesuai dengan linieritas. Selanjutnya larutan sampel dipreparasi dengan menimbang sejumlah tertentu sampel kemudian dilarutkan dengan pelarut sesuai hasil optimasi. Kemudian larutan standar dan sampel dimasukkan dalam vial dan ditotolkan dalam lempeng KLT Silika Gel F₂₅₄ untuk dianalisis dengan kondisi analisis (komposisi eluen, penampak noda, teknik pewarnaan, pengeringan lempeng, panjang gelombang, dan konsentrasi uji) sesuai dengan hasil optimasi. Noda yang terbentuk dipindai pada panjang gelombang hasil optimasi. Dihitung kadar % b/b.

BAB 5 PENUTUP

5.1 Kesimpulan

5.1.1 Kondisi optimum untuk metode penetapan kadar kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temulawak dengan metode KLT Densitometri yaitu dengan menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄; fase gerak kloroform : etanol p.a : asam asetat glasial (v/v/v) = 94 : 5 : 1 ; panjang gelombang maksimum 424 nm; dan konsentrasi uji 50 ppm.

5.1.2 Metode analisis penetapan kadar kurkumin dalam ekstrak rimpang temulawak dengan metode KLT Densitometri dapat memberikan hasil sebagai berikut:

- Linier dengan koefisien korelasi (r) = 0,99671290; nilai V_{x_0} = 3,49196100%; dan nilai X_p = 31,93178000 ng.
- Peka dengan nilai BD = 58,67834000 ng dan BK = 169,19260000 ng.
- Selektif karena mampu memisahkan kurkumin dengan senyawa lain yang ada dalam sampel dengan nilai $R_s \geq 1,5$ dan spesifik karena memiliki nilai korelasi spektra pada uji kemurnian dan uji identitas lebih dari 0,99.
- Presisi dengan RSD uji presisi keterulangan = 0,02148% dan RSD uji presisi antara = 0,1412 %.
- Kurang akurat dengan $mean\ recovery \pm RSD = 92,71\% \pm 7.84\%$

5.1.3 Kadar kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temu lawak \pm RSD sebesar 8,74% b/b \pm 0,50%.

5.2 Saran

5.2.1 Perlu dilakukan peninjauan ulang terhadap metode akurasi karena masih belum memenuhi persyaratan akurasi

5.2.2 Perlu dilakukan pengembangan validasi metode yang lebih luas seperti, seperti uji ketangguhan (*ruggedness*), kekuatan (*robustness*), dan uji SST

(*System Suitability Test*) agar dapat dengan mudah dilakukan oleh siapaun, di manapun, dan kapanpun.

- 5.2.3 Perlu dilakukan uji terhadap pengaruh waktu panen dan daerah asal tanaman temulawak karena faktor-faktor tersebut dapat mempengaruhi jumlah konsentrasi kurkumin yang dihasilkan.



DAFTAR PUSTAKA

- Ab Halim MR, Zabri TMSM, Ismail S, Mahmud R. *Standardization and phytochemical studies of Curcuma xanthorrhiza Roxb*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2012;4(3):606-610
- Aggarwal, B. B., Surh, Y. J., & Shishodia, S. 2007. *Advances in Experimental Medicine and Biology Volume 595: The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*. ISBN-13:978-0-387-46400-8 e-ISBN-13:978-0-387-46401-5
- Ahuja, S. 1989. *Selectivity and Detectability Optimizations in HPLC*. New York: Wiley-Interscience
- Anand P., Thomas S. G., Kunnumakkara A. B., Sundaram, C., Harikumar K. B., Sung B., Tharakan S. T., Misra K., Priyadarsini I. K., Rajasekharan K. N., & Aggarwal B. B. 2008. *Biological Activities of Curcumin and Its Analogues (Congeners) Made by Man and Mother Nature*. Biochemical Pharmacology 76 (2008) 1590-1611
- Azizah B., & Salamah N. 2013. *Standardisasi Parameter Non Spesifik dan Perbandingan Kadar Kurkumin Ekstrak Etanol dan Ekstrak Terpurifikasi Rimpang Kunyit*. Jurnal Ilmiah Kefarmasian, Vol. 3, No. 1, 2013 : 21-30

- Budavari, S., 1996, *The Merck Index*, Twelfth Edition an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc., Whitehouse Station
- Burkill IH. *A dictionary of the economic products of the Malay peninsula. vol. 1. London*; Published on behalf of the governments of the Straits settlements and Federated Malay states by the Crown agents for the colonies. 1935;p.713-714
- CAMAG. 2012. *Basic Equipment for Modern Thin-Layer Chromatography*. Switzerland: CAMAG. [serial online]. <http://www.camag.com/downloads/free/brochures/CAMAG-basic-equipment-08.pdf>
- Choi MA, Kim SH, Chung WY, Hwang JK, Park KK. Xanthorrhizol, a natural sesquiterpenoid from *Curcuma xanthorrhiza*, has an anti-metastatic potential in experimental mouse lung metastasis model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;326(1):210-217.
- Depkes RI. 1977. *Materia Medika Indonesia jilid 1*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Jakarta
- Depkes RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia jilid 1*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Jakarta
- Depkes RI. 2014. *Farmakope Indonesia V*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Jakarta
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Jakarta

Devaraj S, Esfahani AS, Ismail S, Ramanathan S, Yam MF. *Evaluation of the antinociceptive activity and acute oral toxicity of standardized ethanolic extract of the rhizome of Curcuma xanthorrhiza Roxb.* *Molecules* (Basel, Switzerland). 2010;15(4):2925-2934

Ditjen POM, Depkes RI, 1986, *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 1-26.

Gritter, R.J., Bobbitt, J.M., & Schwarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi Edisi kedua*. Bandung: ITB.

Handayani, N., & Pramono, S. 2008. *Penetapan Kadar dan Standardisasi Zat Aktif Ekstrak Lempuyang Wangi (Zingiber aromaticum Val.) Secara KLT Densitometri*.

Hamilton, R., & Hamilton S., 1987. *Thin Layer Chromatography*. John Wiley & Sons: London

Haqiqi, S. H. 2008. *Kromatografi Lapis Tipis*.

Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB.

Harborne, Jeffrey B.; Baxter, Herbert; Moss, & Gerard, P., 1999, *Phytochemical Dictionary*, London: Taylor and Francis Ltd.

Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol.I, no.3, 117 – 135. Desember 2004. Jakarta: Universitas Indonesia Press.

Huber, L. 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. 2nd edition. New York: Informa Healthcare USA, Inc.

http://globinmed.com/index.php?option=com_content&view=article&id=104895:curcuma-xanthorrhiza-roxburgh&catid=209&Itemid=143#t7 (diakses tanggal 27 Desember 2018 15.23)

<http://www.plants.usda.gov/core/profile?symbol=ZIMO2> (diakses pada tanggal 29 Desember 2015 13.59)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=136222> (diakses tanggal 27 Desember 2018 14.53)

Indrayanto, G. 1994. *Validation of Analysis Methods. Bagian II*. Buletin ISFI Jatim, Vol.23,No.1. Surabaya: Airlangga University.

Indrayanto, G. & Yuwono, M. 2003. *Validation of TLC Analysis in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya: Airlangga University Indonesia. DOI:10.1081/E-ECHR 120016786. Copyright D 2003 by Marcel Dekker, Inc.

Jantan IB, Ahmad AS, Ali NAM, Ahmad AR, Ibrahim H. *Chemical composition of the rhizome oils of four Curcuma species from Malaysia*. Journal of Essential Oil Research. 1999;11(6):719-723

Jantan I, Saputri FC, Qaisar MN, Buang F. *Correlation between chemical composition of Curcuma domestica and Curcuma xanthorrhiza and their antioxidant effect on human low-density lipoprotein oxidation*. Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine: Ecam. 2012;2012:438356

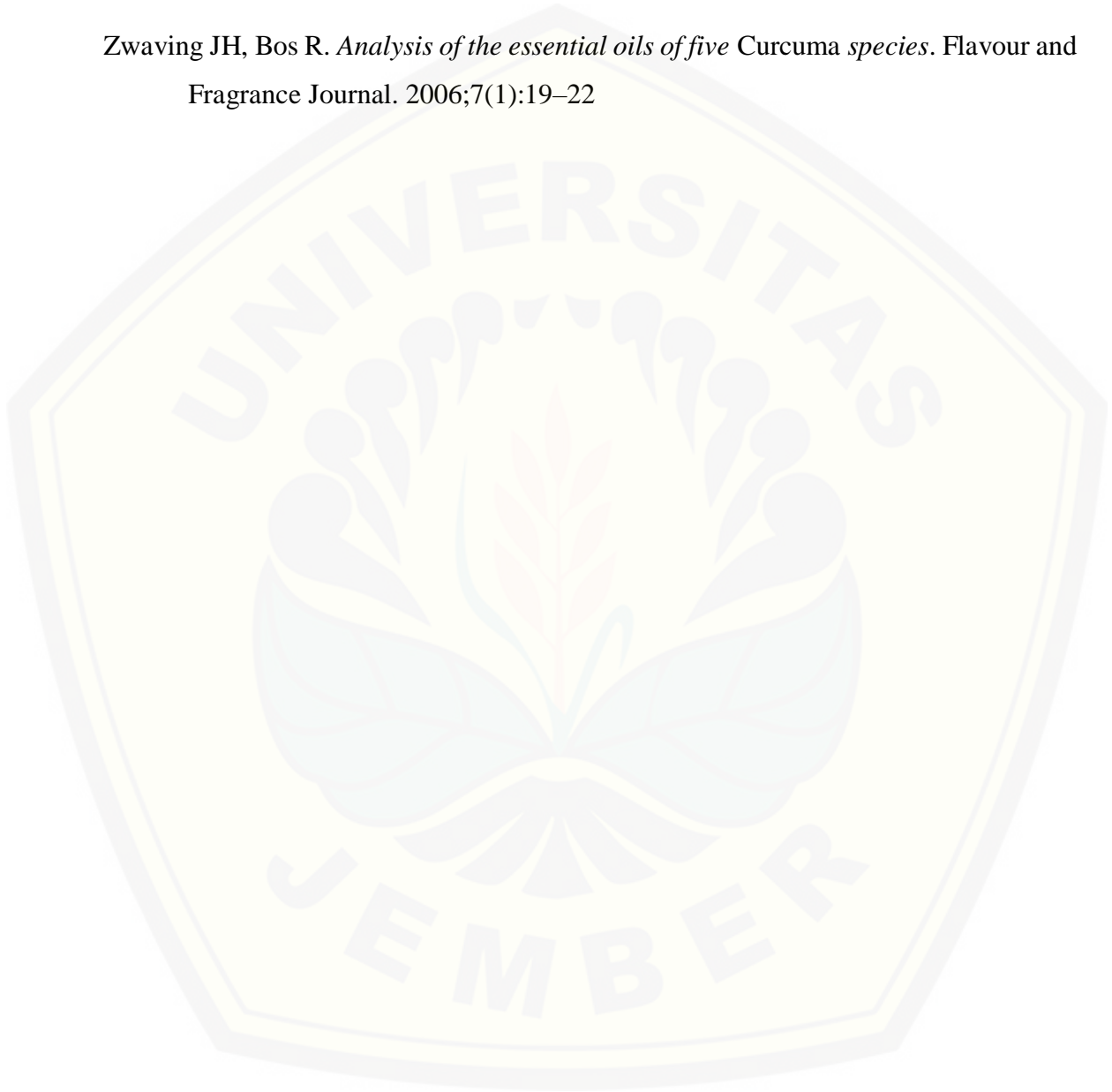
- Jarikasem S, Thubthimthed S, Chawanoraseth K, Suntornanast T. *Essential oils from three Curcuma species collected in Thailand*. Eds. Bayer KHC, Franz G, Canigural S, Demirci F, Craker LE, Gardner ZE in Proceeding WOCMAP III, vol. 3: Perspectives in Natural Product Chemistry. 2005;p.37-41
- Kristanti, A. N., Aminah, N. S., Tanjung, M., & Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press
- Kusriani, R. H., Nawawi, A., Sopandi. Penetapan Kadar Kurkuminoid dalam Sediaan Sirup Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) dengan Spektrofotometri. *Jurnal Farmasi Galenika* Volume 1 No 1, ISSN: 2406-9299. 2017. Bandung: Sekolah Tinggi Farmasi Bandung
- Mangunwardoyo, W., Desasywaty, Usia, Tepy; *Antimicrobial and Identification of Active Compound Curcuma xanthorrhiza Roxb.*, International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS-IJENS Vol: 12 No: 01, 126101-7979 IJBAS-IJENS © February 2012
- Martono, S. 1996. *Penentuan Kadar Kurkumin secara Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri*. Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia (Yogyakarta) : Buletin Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia Yogyakarta Volume 2 No. 4, 615.105 Bul i
- Mary, H.P.A., Susheela, G.K., Jayasree, S., Nizzy, A.M., Rajagopal, B., Jeeva, S. *Phytochemical characterization and antimicrobial activity of Curcuma xanthorrhiza Roxb*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012;2(2 SUPPL.):S637-S640
- Mulja, M. & Surahman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.

- Nurrochmad, A. 2004. *Review: Pandangan Baru Kurkumin dan Aktivitasnya sebagai Antikanker*. *Biofarmasi* 2 (2): 75-80, Agustus 2004, ISSN: 1693-2242
- P.N. Ravindran, K. Nirmal Babu, and K.N. Shiva, 2007, *Botany and Crop Improvement of Turmeric*, Turmeric The Genus *Curcuma*, New York : CRC Press Taylor & Francis Group
- Pothitirat, W., & Gritsanapan, W. 2005. *Quantitative Analysis of Curcumin, Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin in the Crude Curcuminoid Extract from Curcuma longa in Thailand by TLC-Densitometry*. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 32(1-2): 23-30.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat Edisi Pertama*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Rukayadi Y, Hwang JK. *In vitro activity of xanthorrhizol against Streptococcus mutans biofilms*. *Letters in Applied Microbiology*. 2006;42(4):400-404.
- Rukayadi Y, Hwang JK. *In vitro antimycotic activity of xanthorrhizol isolated from Curcuma xanthorrhiza Roxb. against opportunistic filamentous fungi*. *Phytotherapy Research: PTR*. 2007;21(5):434-438
- Ruslay S, Abas F, Shaari K, Zainal Z, Maulidiani, Sirat H, Israf DA, Lajis NH. *Characterization of the components present in the active fractions of health gingers (Curcuma xanthorrhiza and Zingiber zerumbet) by HPLC-DAD-ESIMS*. *Food Chemistry*. 2007;104(3):1183-1191.)

- Sastroamidjojo, S. 2001. *Obat Asli Indonesia Cetakan ke-16*. Jakarta Timur: Dian Rakyat.
- Sari DLN, Cahyono B, Kumoro AC. *Pengaruh jenis pelarut pada ekstraksi kurkuminoid dari rimpang temulawak (Curcuma xanthorrhiza Roxb)*. Chem Info. 2013;1(1):101-107
- Satiadarma, Mulja, M., Tjahjono, & Kartasasmita. 2004. *Asas Pengembangan Prosedur Analisis*. Edisi Pertama. Surabaya: Airlangga University Press
- Sherma, J & Fried, B. 2003. *Handbook of Thin Layer Chromatography. 3rd edition, revised and expanded*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Vimala S, Norhanom AW, Yadav M. *Anti-tumour promoter activity in Malaysian ginger rhizobia used in traditional medicine*. British Journal of Cancer. 1999;80(1-2):110-116.
- Voigh, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi, edisi kelima*. Yogyakarta: UGM Press.
- Widjaja, M. *Validasi Metode Penetapan Kadar Kurkumin dalam Sediaan Cair Obat Herbal Terstandar Merk Kiranti® secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fase Terbalik*. Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta : 2011
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.
- Yasni S, Imaizumi K, Sin K, Sugano M, Nonaka G, Sidik. *Identification of an active principle in essential oils and hexane-soluble fractions of Curcuma*

xanthorrhiza Roxb. showing triglyceride-lowering action in rats. Food and Chemical Toxicology. 1994; 32(3):273–278

Zwaving JH, Bos R. *Analysis of the essential oils of five Curcuma species.* Flavour and Fragrance Journal. 2006;7(1):19–22



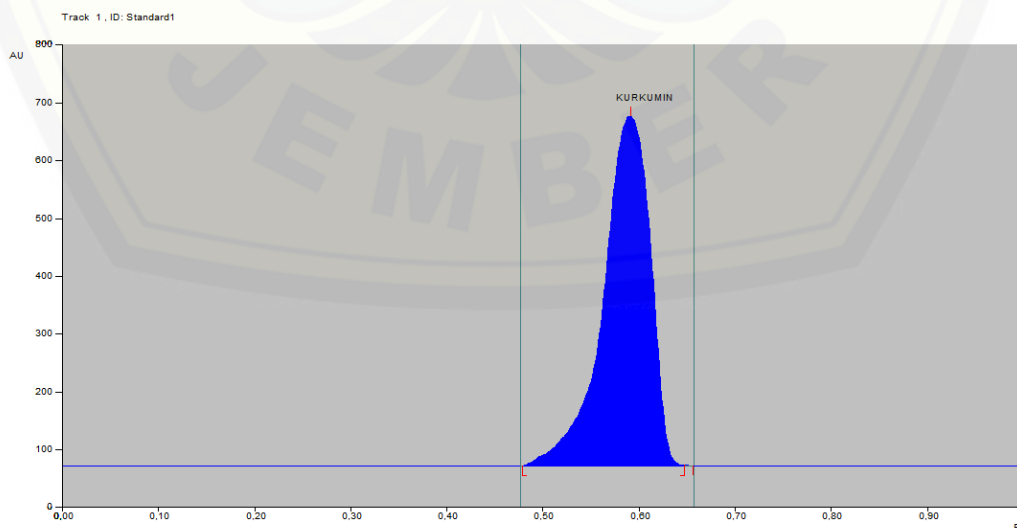
LAMPIRAN

A. Data Optimasi Eluen

Komposisi eluen	Analit	Parameter Penelitian			
		Rf	N	H	Rs
Kl : Et : As (94 : 5 : 1 v/v/v)	Kurkumin	0.59	192.7197	0.2181	3.11
Kl : Met (95 : 5 v/v)	Kurkumin	0.49	87.1111	1.0674	8
Kl : Et (12.5 : 0.5 v/v)	Kurkumin	0.42	70.56	1.6269	4.2
Kl : To : Met (80 : 15 : 5 v/v/v)	Kurkumin	0.43	67.0839	1.7999	6
n-H : EtAs (5 : 5 v/v)	Kurkumin	0.30	29.7521	9.1506	-

- Kl = Kloroform
- As = Asam Asetat Glisial
- Et = Etanol
- Met = Metanol
- To = Toluena
- n-H = n-Heksana
- EtAs = Etil Asetat

a. Kloroform:Etanol:Asam Asetat Glisial (v/v/v) = 94:5:1

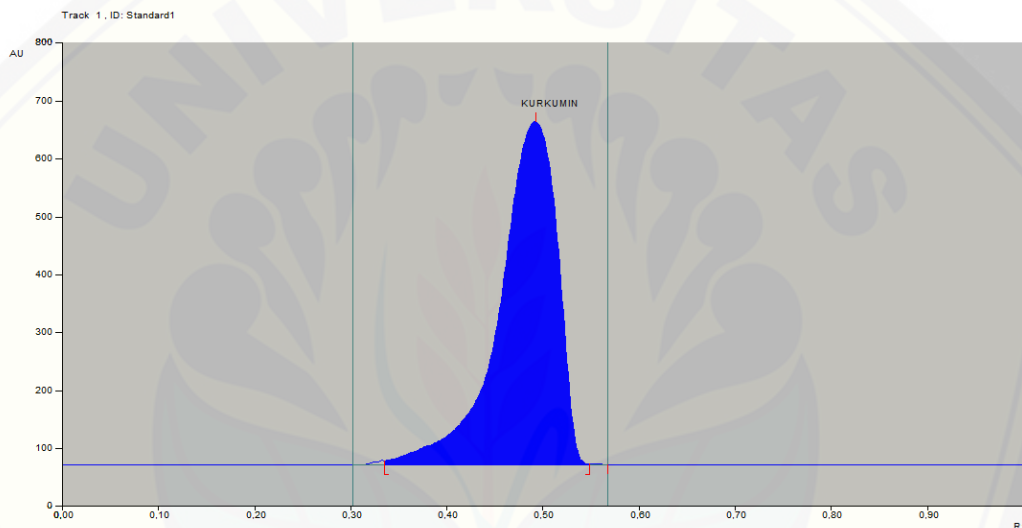


Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Positon	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
1	0.48 Rf	0.2 AU	0.59 Rf	605.5 AU	100.00%	0.65 Rf	1.1 AU	27728.6 AU	100%	Kurkumin

$$N = 16 \left(\frac{R_f}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{0,59}{0,65-0,48} \right)^2 = 192.72$$

$$H = \left[\frac{Z_f}{N} \right]^2 = \left[\frac{90}{192.72} \right]^2 = 0.2181$$

b. Kloroform:Metanol (v/v) = 95:5

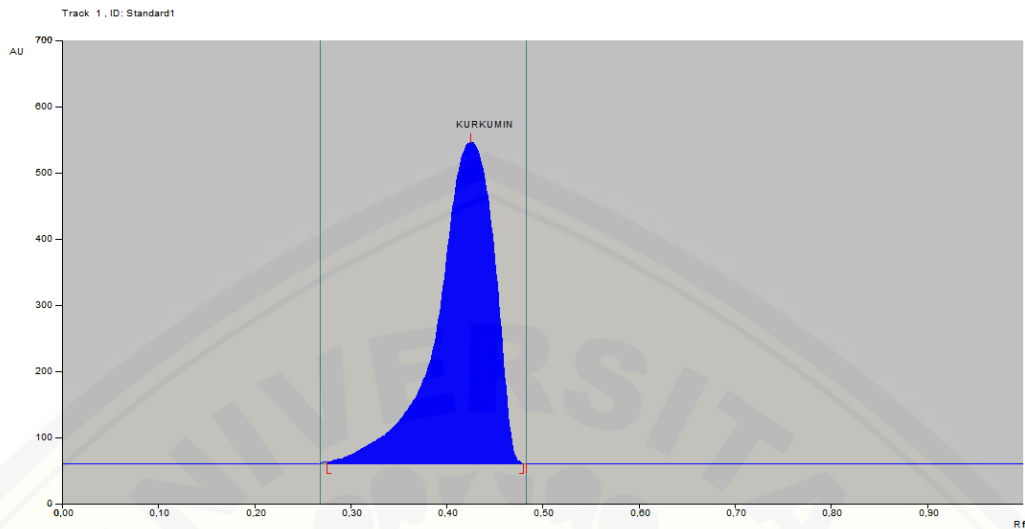


Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Positon	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
1	0.34 Rf	6.9 AU	0.49 Rf	592.8 AU	100.00%	0.55 Rf	1.0 AU	33380.1 AU	100%	Kurkumin

$$N = 16 \left(\frac{R_f}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{0,49}{0,55-0,34} \right)^2 = 87.11$$

$$H = \left[\frac{Z_f}{N} \right]^2 = \left[\frac{90}{87.11} \right]^2 = 1.0675$$

c. Klorofom:Etanol (v/v) = 12.5:0.5

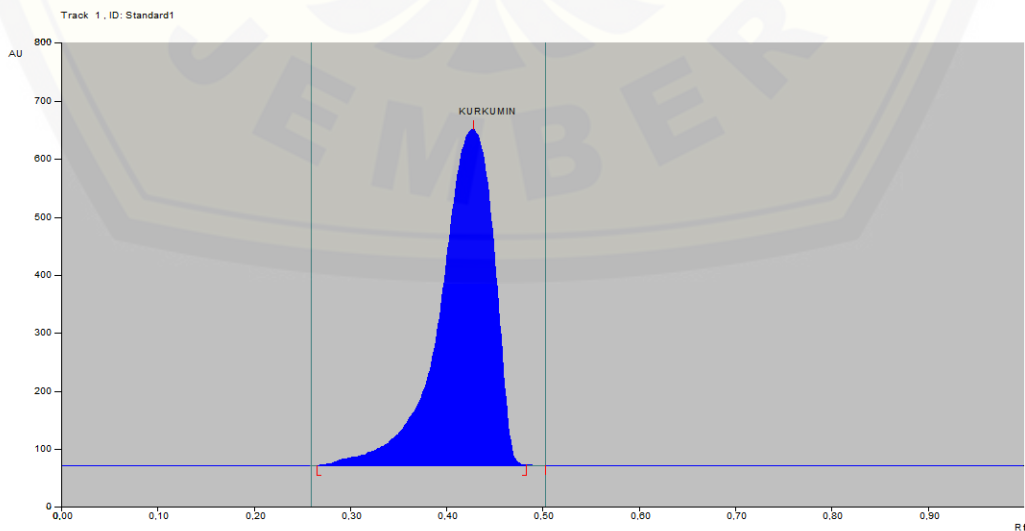


Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
1	0.28 Rf	2.3 AU	0.42 Rf	485.9 AU	100.00%	0.48 Rf	0.1 AU	26806.6 AU	100%	Kurkumin

$$N = 16 \left(\frac{R_f}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{0,42}{0,48-0,28} \right)^2 = 70.56$$

$$H = \left[\frac{Z_f}{N} \right]^2 = \left[\frac{90}{70.56} \right]^2 = 1.6269$$

d. Kloroform:Toluen:Metanol (v/v/v) = 80:15:5

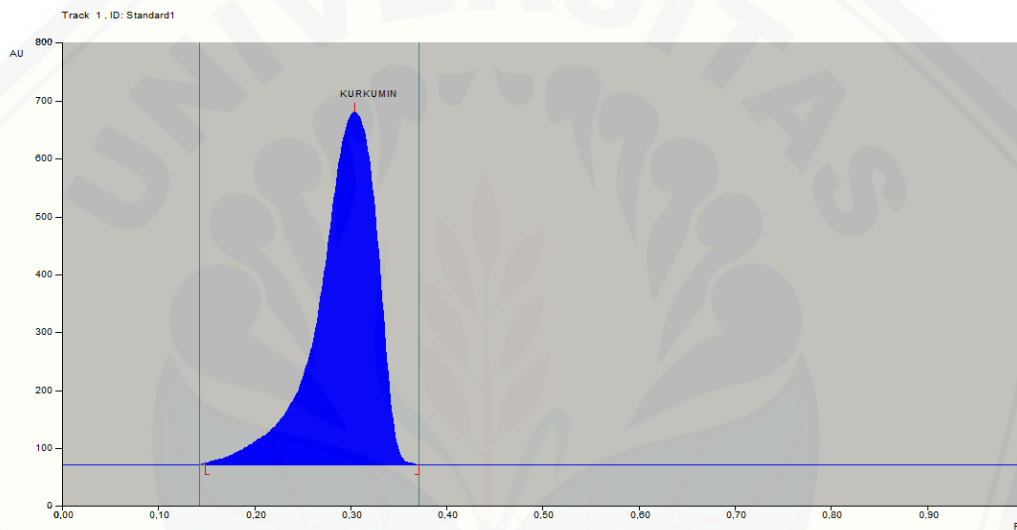


Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Positon	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
1	0.27 Rf	0.0 AU	0.43 Rf	579.9 AU	100.00%	0.48 Rf	1.1 AU	30104.4 AU	100%	Kurkumin

$$N = 16 \left(\frac{R_f}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{0,43}{0,48-0,27} \right)^2 = 67.08$$

$$H = \left[\frac{Z_f}{N} \right]^2 = \left[\frac{90}{67.08} \right]^2 = 1.8001$$

e. n-Heksan:Etil Asetat (v/v) = 5:5

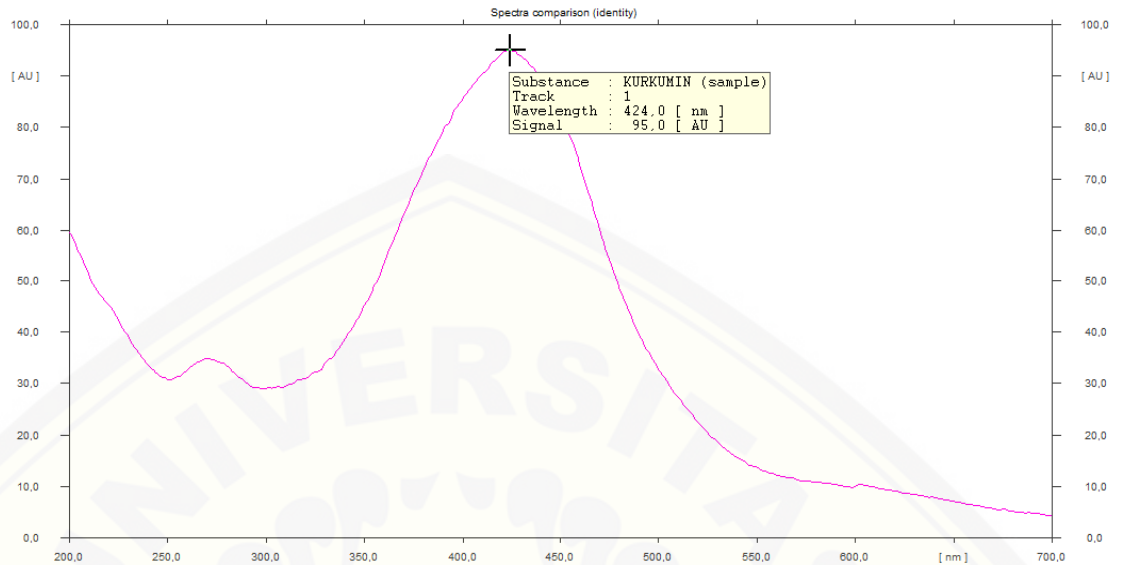


Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Positon	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
1	0.15 Rf	3.2 AU	0.30 Rf	608.7 AU	100.00%	0.37 Rf	0.0 AU	34149.7 AU	100%	Kurkumin

$$N = 16 \left(\frac{R_f}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{0,30}{0,37-0,15} \right)^2 = 29.75$$

$$H = \left[\frac{Z_f}{N} \right]^2 = \left[\frac{90}{29.75} \right]^2 = 9.1518$$

B. Data Optimasi Panjang Gelombang



Panjang gelombang terpilih dari optimasi adalah 424 nm.

C. Data Optimasi Konsentrasi Uji

Konsentrasi Standar Kurkuminoid (ppm)	Kadar Standar Kurkuminoid (ng)	Rasio Kurkumin	Area Kurkumin (AU)	Kadar Kurkumin Standar (ng)	N	H
50	200	0,59878	8097,2	117,23	306.25	0.0863
250	1000	0,61472	28744,9	586,16	158.04	0.3243
500	2000	0,58638	41021,4	1172,33	153.29	0.3447
1000	4000	0,54477	51846,8	2344,65	179.56	0.2512
		$\bar{x} = 0,58612$				
		SD = 0,02993				

Konsentrasi uji terpilih adalah 50 ppm

kadar kurkumin = kadar kurkuminoid x rasio kurkumin

$$\text{rasio kurkumin standar} = \frac{\text{area kurkumin standar}}{\text{area total kurkuminoid standar}}$$

D. Data Linieritas

Konsentrasi kurkuminoid (ppm)	Kadar Kurkuminoid (ng)	Rasio Kurkumin	Area Kurkumin (AU)	Kadar Kurkumin (ng)
30	120	0,68564	3763,32	76,465
40	160	0,72826	5621,84	101,954
50	200	0,61694	7927,44	127,442
60	240	0,63373	9677,64	152,931
70	280	0,62801	12415,03	178,419
80	320	0,62679	14235,78	203,908
90	360	0,60509	15697,62	229,396
100	400	0,62490	18020,56	254,885
110	440	0,60722	19316,27	280,373
120	480	0,61554	20491,97	305,862

$$\bar{x} = 0,63721$$

$$SD = 0,06146$$

Persamaan regresi linier	$Y = -1629,97300000 + 75,31377000X$
r	0,99671290
V_{x0}	3,49196100%
X_p	31,93178000

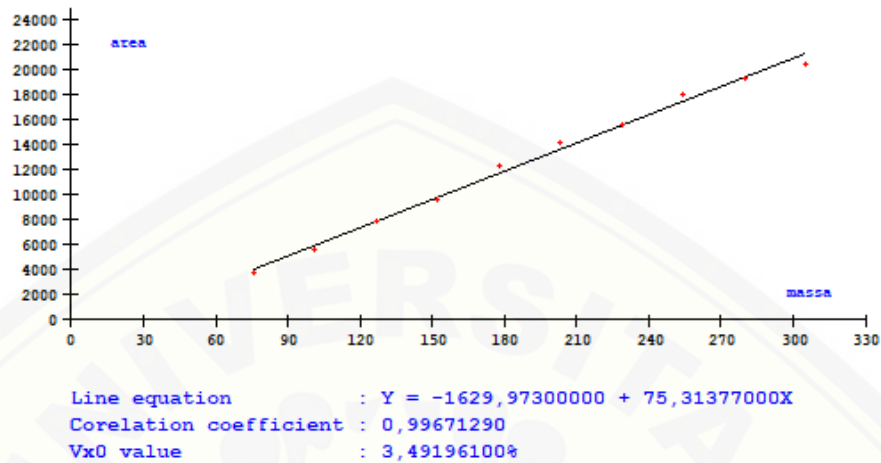
Method	: Linearity
Probability	: 95%
Number of data	: 10
Line equation	: $Y = -1629,97300000 + 75,31377000X$
Corelation coefficient	: 0,99671290
Sy value	: 501,00110000
V_{x0} value	: 3,49196100%
X_p value	: 31,93178000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)

The V_{x0} value is fullfilled the requirement (0% to 5%)

The X_p value is OK (< 76,00000000)

UJI LINIERITAS



E. Data Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Rasio kurkuminoid	Area	Massa kurkuminoid (ng)
25,276	101,104	0,80372	6699,72	71,43
50,552	202,208	0,73694	8178,48	142,86
75,828	303,312	0,70199	9688,96	214,28
101,104	404,416	0,66080	10167,46	285,71
126,38	505,52	0,62895	10550,19	357,14
		$\bar{x} = 0,70648$		
		RSD = 0,0627		
Persamaan regresi linier	$Y = 6694,38300000 + 14,13075000X$			
r	0,99747650			
Vx0	4,18702400%			
Xp	58,67834000			

Method : Linearity

Probability : 95%

Number of data : 5

Line equation : $Y = 6694,38300000 + 14,13075000X$

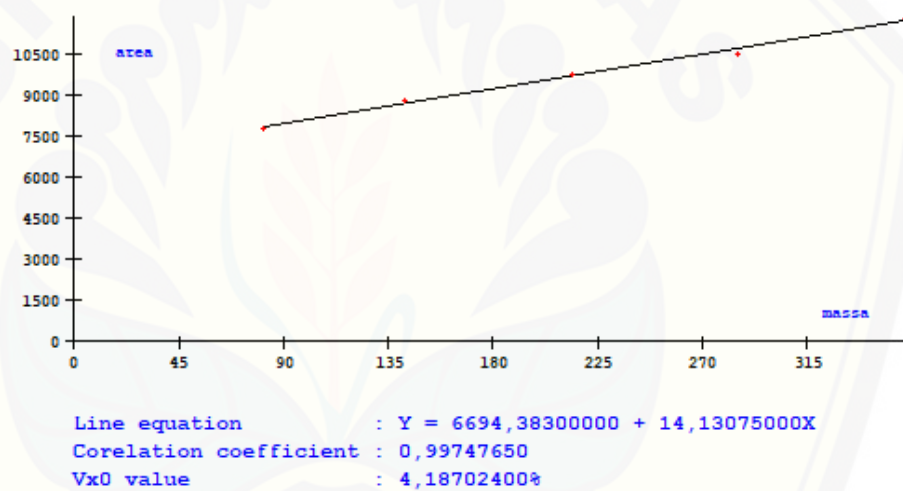
Corelation coefficient : 0,99747650
 Sy value : 127,67980000
 Vx0 value : 4,18702400%
 Xp value : 58,67834000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)

The Vx0 value is fullfilled the requirement (0% to 5%)

The Xp value is OK (< 81,00000000)

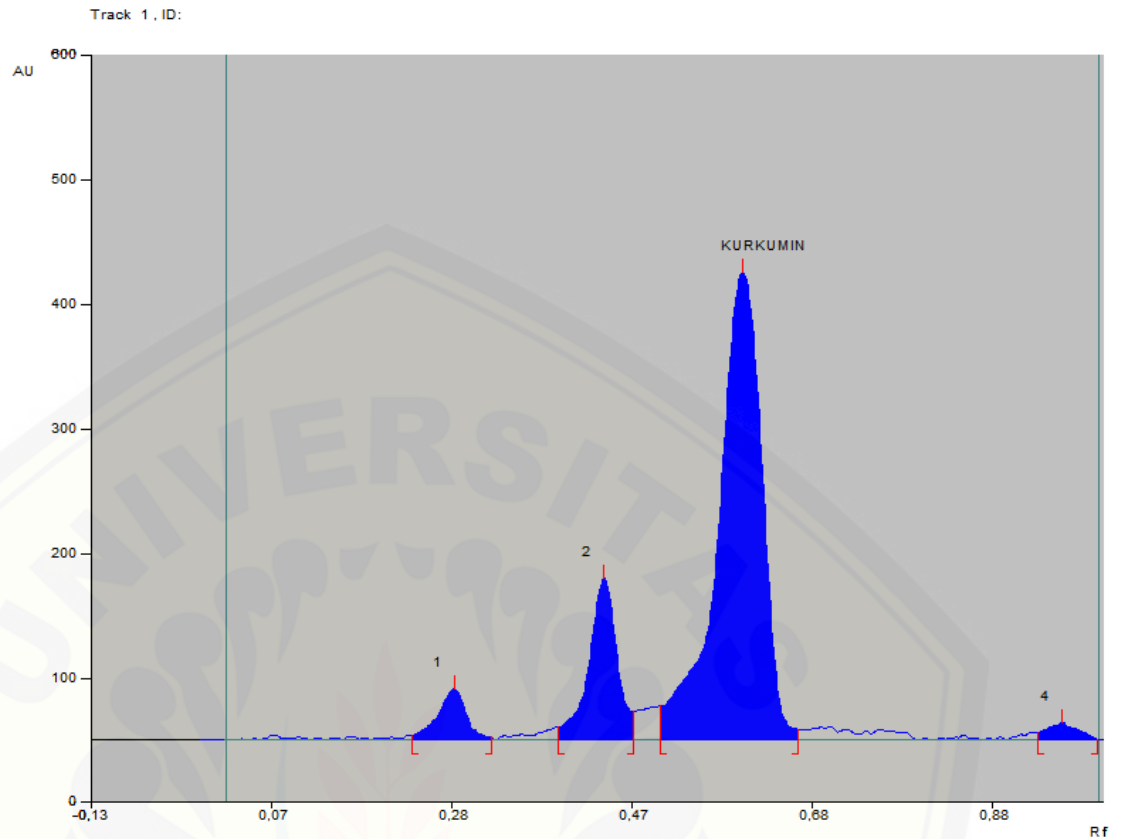
kurva linieritas BD & BK



Method : DL - QL
 Number of data : 5
 DL value : 56,39752000
 QL value : 169,19260000

F. Data Selektivitas/Spesifisitas

- a. Kromatogram pemisahan kurkumin pada ekstrak etanol rimpang temu lawak



Peak	Start position	Start Height	Max Position	Max Height	End Position	End Height	Area	Assigned Peak
1	0,23 Rf	3,4 AU	0,28 Rf	41,2 AU	0,32 Rf	1,7 AU	1203,9	<i>unknown</i> *
2	0,40 Rf	10,2 AU	0,45 Rf	129,5 AU	0,48 Rf	22,5 AU	3756,9 AU	<i>unknown</i> *
3	0,51 Rf	26,9 AU	0,60 Rf	375,4 AU	0,66 Rf	8,4 AU	17071,6 AU	Kurkumin
4	0,93 Rf	5,6 AU	0,95 Rf	13,5 AU	0,99 Rf	0,5 AU	434,6 AU	<i>unknown</i> *

Perhitungan R_s puncak kurkumin terhadap *peak* 2

$$\begin{aligned}
 R_s &= \frac{2[(Z)_A - (Z)_B]}{W_A + W_B} \\
 &= \frac{2(0,60 - 0,45)}{(0,66 - 0,51) + (0,48 - 0,40)} \\
 &= 1,30
 \end{aligned}$$

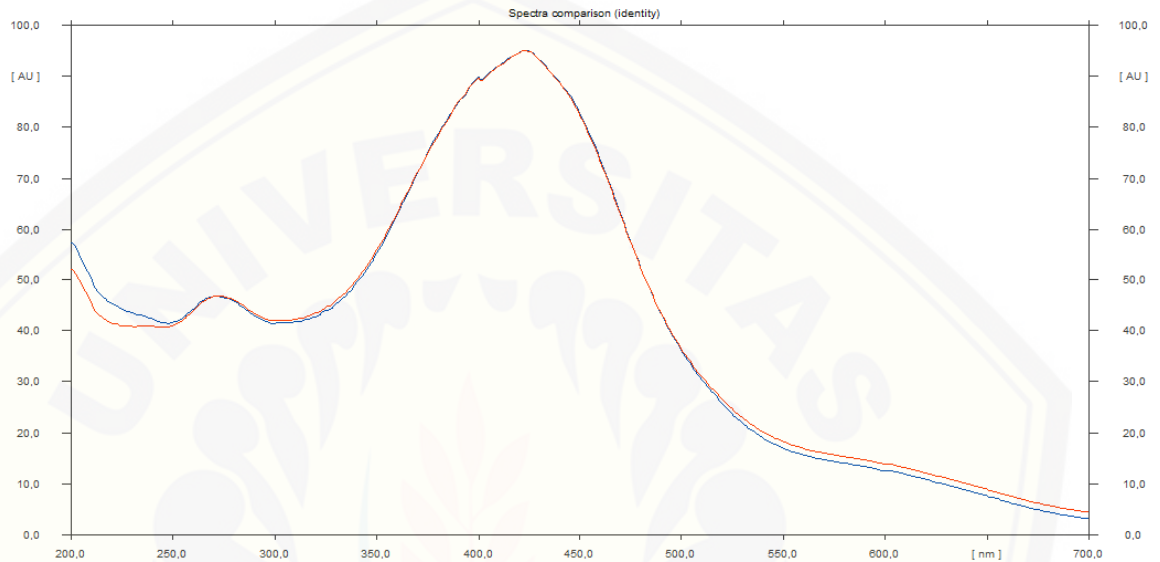
Perhitungan R_s puncak kurkumin terhadap *peak* 4

$$R_s = \frac{2[(Z)_A - (Z)_B]}{W_A + W_B}$$

$$= \frac{2(0,95-0,60)}{(0,99-0,93) + (0,66-0,51)}$$

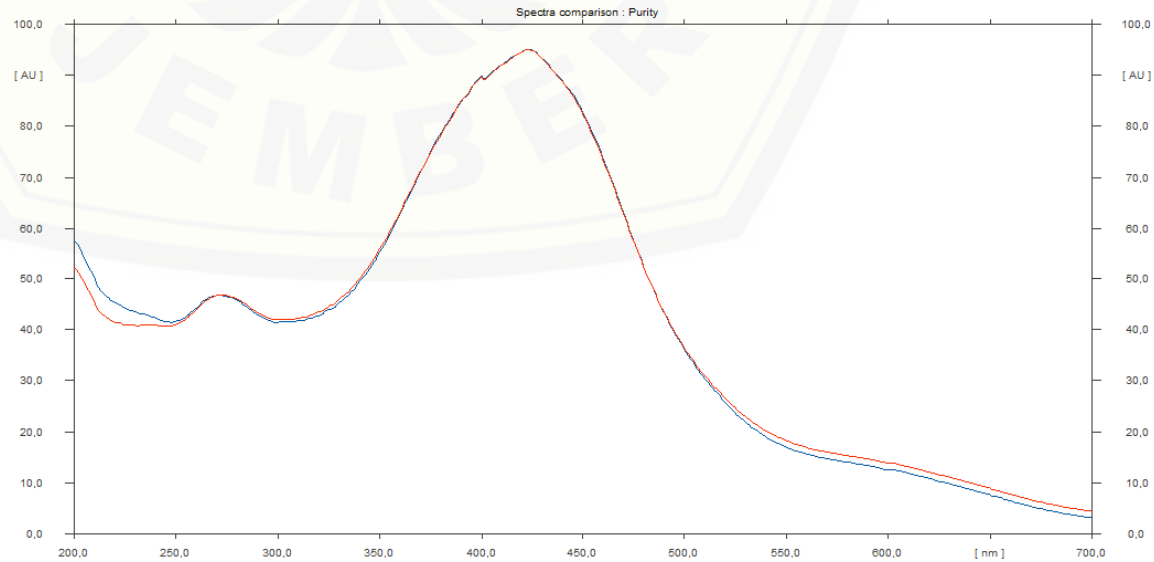
$$= 3,33$$

b. Kemurnian dan identitas kurkumin



Spektra kurkumin dalam standar dan sampel pada uji identitas

- : spektra kurkumin dalam standar
- : spektra kurkumin dalam sampel



Spektra kurkumin dalam standar dan sampel pada uji kemurnian



: spektra kurkumin dalam standar



: spektra kurkumin dalam sampel

c. Tabel Hasil Uji Kemurnian Kurkumin

Uji	Track	Rf	r(s,m)	r(m,e)	Purity
Kemurnian	Standar	0,79	0,999837	0,992909	Ok
	Sampel	0,77	0,999840	0,993881	Ok

Uji	Track	Rf	r(s,s)	r(s,a)	Identity
Identitas	Standar	0,79	0,986144	0,999116	Ok
	Sampel	0,77	0,985144	0,986674	Ok

G. Data Presisi

a. Uji Presisi Hari ke-1 (*repeatability*)

Konsentrasi Kurkuminoid Standar (ppm)	Kadar Kurkuminoid Standar (ng)	Rasio Kurkumin	Area Kurkumin	Kadar Kurkumin (ng)
40,2	160,80	0,71609	10926,1	112,1049
50,25	201,00	0,70628	12262,1	140,1312
60,3	241,20	0,70450	13937,6	168,1574
70,35	281,40	0,69566	15590,3	196,1836
80,4	321,60	0,68534	17245,8	224,2099
90,45	361,80	0,67515	16205,03	253,2361

$$\bar{x} = 0,69717$$

$$RSD = 0,02148$$

Method : Linearity

Probability : 95%

Number of data : 6

Line equation : $Y = 5989,39000000 + 45,99694000X$

Corelation coefficient : 0,99006680

Sy value : 382,55020000

Vx0 value : 4,56970500%

Xp value : 59,05221000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)

The Vx0 value is fullfilled the requirement (0% to 5%)

The Xp value is OK (< 112,00000000)

Penimbangan sampel (mg)	Area Kurkumin Sampel	Kadar Kurkumin Sampel (ng/2 μ l)	Kadar Kurkumin Sampel (mg)	Kadar b/b (%)
25,1	16720,3	233,296	1,16648	4,65
25,2	16915,0	237,529	1,18765	4,71
25,1	16593,3	230,535	1,15268	4,59
25,3	19195,9	287,117	1,43559	5,67
25,4	18772,1	277,903	1,38952	5,47
25,3	18650,6	275,262	1,37631	5,44
				$\bar{x} = 5,088 \%$
				RSD = 0,107649 %

Method : Precision

Number of data : 6

SD value : 0,54772260

b. Uji Presisi Hari ke-2

Konsentrasi Kurkuminoid Standar (ppm)	Kadar Kurkuminoid Standar (ng)	Rasio Kurkumin	Area Kurkumin	Kadar Kurkumin (ng)
40,2	160,80	0,72493	10253,5	111,933

50,25	201,00	0,71262	12059,4	139,916
60,3	241,20	0,70459	13414,0	167,899
70,35	281,40	0,69235	14655,0	195,883
80,4	321,60	0,67915	15267,6	223,866
90,45	361,80	0,66296	16937,2	251,849

$$\bar{x} = 0,6961$$

$$RSD = 0,03261$$

Method	: Linearity
Probability	: 95%
Number of data	: 6
Line equation	: $Y = 5584,99900000 + 45,18877000X$
Corelation coefficient	: 0,99187510
Sy value	: 339,43940000
Vx0 value	: 4,15004800%
Xp value	: 53,82750000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)

The Vx0 value is fullfilled the requirement (0% to 5%)

The Xp value is OK (< 111,00000000)

Penimbangan sampel (mg)	Area Kurkumin Sampel	Kadar Kurkumin Sampel (ng/2 μ l)	Kadar Kurkumin Sampel (mg)	Kadar b/b (%)
25,2	16207,6	235,072	1,17536	4,66
25,4	16703,9	246,055	1,23026	4,84
25,3	16841,4	249,097	1,24549	4,92
25,1	13496,1	175,068	0,87534	3,49
25,2	13041,3	165,003	0,82502	3,27
25,1	12187,5	146,109	0,73055	2,91

$$\bar{x} = 4,015 \%$$

$$RSD = 0,2033615 \%$$

Method : Precision

Number of data : 6

SD value : 0,81649660

c. Uji Presisi Hari ke-3

Konsentrasi Kurkuminoid Standar (ppm)	Kadar Kurkuminoid Standar (ng)	Rasio Kurkumin	Area Kurkumin	Kadar Kurkumin (ng)
40,2	160,80	0,74170	8455,2	116,294
50,25	201,00	0,73328	10633,4	145,368
60,3	241,20	0,72623	11830,8	174,441
70,35	281,40	0,71416	13579,6	203,515
80,4	321,60	0,71701	15112,9	232,588
90,45	361,80	0,70695	16490,5	261,662

$$\bar{x} = 0,72322$$

$$RSD = 0,016521$$

Method	: Linearity
Probability	: 95%
Number of data	: 6
Line equation	: $Y = 2401,83800000 + 54,54286000X$
Corelation coefficient	: 0,99751110
Sy value	: 233,86180000
Vx0 value	: 2,27462600%
Xp value	: 32,49051000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)

The Vx0 value is fullfilled the requirement (0% to 5%)

The Xp value is OK (< 116,00000000)

Penimbangan sampel (mg)	Area Kurkumin Sampel	Kadar Kurkumin Sampel (ng/2 μ l)	Kadar	
			Kurkumin Sampel (mg)	Kadar b/b (%)
25,1	13510,1	203,661	1,01831	4,06
25,2	15154,3	233,866	1,16903	4,64
25,1	14679,1	225,094	1,12547	4,48
25,2	13577,4	204,895	1,02448	4,07
25,3	16700,2	262,149	1,31076	5,18
25,3	16431,2	257,217	1,28609	5,08
				$\bar{x} = 4,585 \%$
				RSD = 0,112627 %

Method : Precision
 Number of data : 6
 SD value : 0,51639780

d. Hasil Uji Presisi *Intermediate Precision* (Data uji presisi selama 3 hari percobaan dengan n=6)

Hari ke-	Kadar b/b (%)	RSD
1	5,088	0,1076 %
2	4,015	0,2034 %
3	4,585	0,1126 %
Rata-rata RSD		0,1412 %

H. Data Akurasi

Kadar kurkumin hasil uji presisi (rata-rata hasil uji presisi pada hari pertama) adalah 6,8016%.

a. Adisi 30%

- Jumlah sampel adisi yang diperlukan

Jika sampel yang ditimbang 25 mg, maka jumlah standar kurkumin yang ditambahkan ke dalam sampel adalah :

$$\frac{25 \text{ mg} \times 6,8 \text{ mg} \times 0,3}{100} = 0,51 \text{ mg kurkumin}$$

- Pembuatan standar adisi

Menimbang standar kurkumin sebanyak 5,1 mg, lalu dilarutkan dalam dalam labu ukur 10 ml dengan etanol sampai tanda batas.

$$\frac{5,1 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 510 \text{ ppm}$$

Cara kerja :

- ✓ Menimbang 25 mg sampel, melarutkan dengan etanol kemudian di masukkan ke dalam labu ukur 10 ml.
- ✓ Memipet 1 ml larutan standar 510 ppm, memasukkan ke dalam labu ukur 10 ml berisi larutan sampel, sehingga telah dilakukan adisi sebanyak 0,51 mg standar kurkumin kedalam 25 mg sampel.

$$1 \text{ ml dari } 510 \text{ ppm} = \frac{510 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times 1 \text{ ml} = 0,51 \text{ mg kurkumin}$$

- ✓ Menambahkan etanol sampai tanda batas.

- Perhitungan %*recovery*

Misal pada replikasi 1 dengan penimbangan sampel sebesar 25,1 mg.

Konsentrasi teoritis :

$$\frac{6,8 \text{ mg}}{100 \text{ mg}} \times 25,1 \text{ mg} = 1,7068 \text{ mg} + 0,51 \text{ mg}$$

$$= 2,2168 \text{ mg (jumlah kurkumin dalam sampel adisi 30%)}$$

$$\frac{2,2168 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 221,68 \text{ ppm}$$

$$\frac{221,68 \text{ ng}}{\mu\text{l}} \times 2 \mu\text{l} = 443,36 \text{ mg}$$

Hasil percobaan : 447.88 mg

$$\% \text{ recovery} = \frac{447,88 \text{ mg}}{443,36 \text{ mg}} \times 100\% = 101,02\%$$

b. Adisi 45%

- Jumlah sampel adisi yang diperlukan

Jika sampel yang ditimbang 25 mg, maka jumlah standar kurkumin yang ditambahkan ke dalam sampel adalah :

$$\frac{25 \text{ mg} \times 6,8 \text{ mg} \times 0,45}{100} = 0,765 \text{ mg kurkumin}$$

- Pembuatan standar adisi

Menimbang standar kurkumin sebanyak 3,8 mg, lalu dilarutkan dalam dalam labu ukur 5 ml dengan etanol sampai tanda batas.

$$\frac{3,8 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 765 \text{ ppm}$$

Cara kerja :

- ✓ Menimbang 25 mg sampel, melarutkan dengan etanol kemudian di masukkan ke dalam labu ukur 10 ml.
- ✓ Memipet 1 ml larutan standar 765 ppm, memasukkan ke dalam labu ukur 10 ml berisi larutan sampel, sehingga telah dilakukan adisi sebanyak 0,765 mg standar kurkumin kedalam 25 mg sampel.

$$1 \text{ ml dari } 765 \text{ ppm} = \frac{765 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times 1 \text{ ml} = 0,765 \text{ mg kurkumin}$$

- ✓ Menambahkan etanol sampai tanda batas.

- Perhitungan %recovery

Misal pada replikasi 1 dengan penimbangan sampel sebesar 25,1 mg.

Konsentrasi teoritis :

$$\frac{6,8 \text{ mg}}{100 \text{ mg}} \times 25,1 \text{ mg} = 1,7068 \text{ mg} + 0,765 \text{ mg}$$

$$= 2,4718 \text{ mg (jumlah kurkumin dalam sampel adisi 45%)}$$

$$\frac{2,4718 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 247,18 \text{ ppm}$$

$$\frac{247,18 \text{ ng}}{\mu\text{l}} \times 2 \mu\text{l} = 494,36 \text{ mg}$$

Hasil percobaan : 509.36 mg

$$\% \text{ recovery} = \frac{509,36 \text{ mg}}{494,36 \text{ mg}} \times 100\% = 103,03\%$$

c. Adisi 60%

- Jumlah sampel adisi yang diperlukan

Jika sampel yang ditimbang 25 mg, maka jumlah standar kurkumin yang ditambahkan ke dalam sampel adalah :

$$\frac{25 \text{ mg} \times 6,8 \text{ mg} \times 0,60}{100} = 1,02 \text{ mg kurkumin}$$

- Pembuatan standar adisi

Menimbang standar kurkumin sebanyak 5,1 mg, lalu dilarutkan dalam dalam labu ukur 5 ml dengan etanol sampai tanda batas.

$$\frac{5,1 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 1020 \text{ ppm}$$

Cara kerja :

- ✓ Menimbang 25 mg sampel, melarutkan dengan etanol kemudian di masukkan ke dalam labu ukur 10 ml.
- ✓ Memipet 1 ml larutan standar 1020 ppm, memasukkan ke dalam labu ukur 10 ml berisi larutan sampel, sehingga telah dilakukan adisi sebanyak 1,02 mg standar kurkumin kedalam 25 mg sampel.

$$1 \text{ ml dari } 1020 \text{ ppm} = \frac{1020 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times 1 \text{ ml} = 1,020 \text{ mg kurkumin}$$

- ✓ Menambahkan etanol sampai tanda batas.

- Perhitungan %*recovery*

Misal pada replikasi 1 dengan penimbangan sampel sebesar 25,1 mg.

Konsentrasi teoritis :

$$\frac{6,8 \text{ mg}}{100 \text{ mg}} \times 25,1 \text{ mg} = 1,7068 \text{ mg} + 1,020 \text{ mg}$$

$$= 2,7268 \text{ mg (jumlah kurkumin dalam sampel adisi$$

45%)

$$\frac{2,4718 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 272,68 \text{ ppm}$$

$$\frac{272,68 \text{ ng}}{\mu\text{l}} \times 2 \mu\text{l} = 545,36 \text{ mg}$$

Hasil percobaan : 529.59 mg

$$\% \text{ recovery} = \frac{529.59 \text{ mg}}{545,36 \text{ mg}} \times 100\% = 97,11\%$$

d. Tabel hasil uji akurasi

Adisi	Penimbangan Sampel (mg)	Penambahan Standar Adisi (mg)	Massa Teoritis (ng)	Massa Hasil Percobaan (ng)	Recovery (%)	Rata-rata (%)	RSD (%)
30%	25,0	0,51	443,36	447,88	101,02		
	25,1	0,51	442	343,03	77,61	87,88	11,96
	25,1	0,51	442	375,74	85,01		
45%	25,1	0,765	494,36	509,36	103,03		
	24,9	0,765	491,64	485,52	98,76	100,51	2,23
	24,9	0,765	491,64	490,43	99,75		
60%	25,1	1,02	545,36	529,59	97,11		
	25,1	1,02	545,36	506,46	92,87	89,74	9,33
	25,1	1,02	545,36	432,14	79,24		
					Rata-rata	92,71	7,84

I. Data Penetapan Kadar Kurkumin pada Ekstrak Etanol Rimpang Temu Lawak

Replikasi	Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b (%)	RSD (%)
1	25,1	2,413	9,31	
2	25,2	2,145	8,51	0,50
3	25,1	2,105	8,39	
Rata-rata			8,74	