



SEMINAR NASIONAL KIMIA DAN PENDIDIKAN KIMIA VIII
"Peningkatan Profesionalisme Pendidik dan Periset Sains Kimia di
Era Masyarakat Ekonomi Asean (MEA)"
Program Studi Pendidikan FKIP UNS
Surakarta, 14 Mei 2016



MAKALAH
PENDAMPING

PARALEL D

ISBN : 978-602-73159-1-4

VALIDASI SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS UNTUK PENENTUAN KURKUMINOID DALAM PRODUK HERBAL

Selina Shofia Kumila^{1,*}, Widayat², Bambang Cahyono¹

¹Lab Kimia Organik Jurusan Kimia, Universitas Diponegoro

²Jurusan Teknik Kimia, Universitas Diponegoro

*Keperluan korespondensi, tel/fax : 024-76480824, email : bambang_cahyono@undip.ac.id

ABSTRAK

Validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis bersifat akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Dalam penelitian ini telah dilakukan uji validasi Spektrofotometri *UV-Vis* untuk penentuan kurkuminoid dari temulawak pada produk herbal komersial. Panjang gelombang maksimum kurkuminoid 421 nm. Uji linearitas didapatkan nilai koefisien korelasi dari kurva standar kurkumin sebesar 0,9995, menunjukkan bahwa kurva standar tersebut baik. Uji akurasi menghasilkan nilai %R di atas 90%, memenuhi batas keberterimaan metode yang baik. Uji presisi didapatkan nilai ketidakpastian kandungan kurkuminoid sebesar 3,73%. Dari presisi penimbangan sampel diperoleh nilai CV hitung < 2/3CV Horwitz. Hasil presisi antarlaboratorium didapatkan nilai %RSD 1,972. Penentuan LOQ kurkuminoid didapatkan hasil sebesar 0,04 ppm. Uji stabilitas kurkuminoid (dalam standart, sampel jangka pendek, sampel jangka panjang) didapatkan %*difference* berturut-turut sebesar 2,41-12,18%, 0-3,90% dan -1,32-4,98 %, sampel relatif stabil (%*difference* tidak lebih dari 15%). Berdasarkan data-data tersebut, dapat ditarik kesimpulan bahwa metoda analisis kurkuminoid dengan Spektrofotometri *UV-Vis* telah memenuhi persyaratan validasi metoda uji dengan hasil yang memuaskan. Metoda analisis tersebut valid untuk dipergunakan.

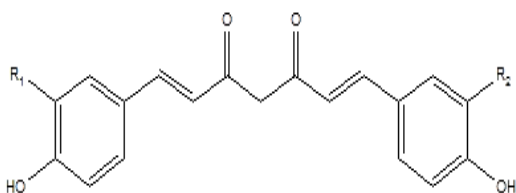
Kata kunci: kurkuminoid, Spektrofotometri *UV-Vis*, validasi

PENDAHULUAN

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) merupakan salah satu bahan alam yang banyak digunakan dalam bahan baku herbal di Indonesia. Tercatat dalam buku Daftar Obat Alam terdapat sekitar 37% produk yang menggunakan temulawak sebagai bahan baku. Dari 248 jenis simplisia

yang digunakan dalam campuran obat bahan alam di sentra produksi herbal Indonesia tersebut (Jawa Tengah), temulawak menduduki peringkat pertama [1]. Kandungan kurkuminoid yang terdapat dalam rimpang khas Indonesia tersebut, diduga sangat erat hubungannya dengan

aktivitas-aktivitas yang ditunjukkan, seperti antikanker [2], antiinflamasi [3] dan antioksidan [4]. Perlu dicatat bahwa zat warna kuning tersebut umumnya berupa campuran, yang terdiri dari kurkumin, monodemetoksi-kurkumin dan bisdesmetoksikurkumin [5], yang ketiganya memiliki gugus yang bervariasi pada posisi R1 dan R2 seperti yang tertera pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur kimia kurkuminoid

Analisis kuantitatif yang akurat terhadap kurkuminoid di dalam formula obat herbal masih merupakan topik penelitian yang dilakukan di beberapa laboratorium penelitian.

Beberapa metode analisis kuantitatif pernah dilaporkan untuk menentukan kurkuminoid diantaranya HPLC [6], HPTLC [7] dan UV [8]. Berdasarkan pedoman ICH tentang analisis obat, dibutuhkan metode yang mudah, sensitif, cepat dan akurat untuk menganalisis herbal dan formulasinya. Dalam penelitian ini telah dilakukan validasi spektrofotometri *UV-Vis* dari produk herbal komersial yang mengandung ekstrak temulawak.

METODE PENELITIAN

Bahan. Sampel produk herbal didapatkan dari toko herbal di daerah Semarang. Kurkumin standar dari Merck dengan kemurnian 90%. Semua bahan memiliki

kualitas *pro analysis*, kecuali bila disebutkan lain.

Alat. Neraca analitik (*Ohaus*), Spektrofotometer *UV-Vis* (Spectroquant Pharo 300) dan peralatan gelas.

Pengambilan sampel dan praanalisis dengan Spektrofotometri *UV-Vis*

Sebanyak sepuluh kapsul produk herbal diambil secara acak dan ditimbang. *Pengambilan sepuluh buah kapsul* bertujuan untuk mendapatkan sampel yang semakin mewakili populasi kapsul produk herbal. Sejumlah sampel seberat 0,0040 gram dilarutkan dengan metanol (*p.a*) dalam labu takar 10 ml sampai tanda batas dan dilakukan penggojogan. Sampel produk herbal kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*. Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimumnya. Setelah itu, konsentrasi kurkuminoid dihitung dengan menggunakan kurva standar.

Validasi Spektrofotometri *UV-Vis*

Optimasi Panjang Gelombang Maksimum Kurkuminoid. Kurkumin standar dilarutkan dalam metanol *pro analysis* kemudian dideteksi panjang gelombang maksimumnya

Uji Linearitas. Kurkumin standar dilarutkan dalam metanol *p.a* sehingga diperoleh konsentrasi 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm, 2,5 ppm, 3 ppm, 3,5 ppm, 4 ppm, 4,5 ppm, dan 5 ppm. Setiap konsentrasi dianalisis dengan spektrofotometer *UV-Vis* Spectroquant Pharo 300 pada panjang gelombang maksimum yaitu 421 nm, sehingga didapatkan absorbansi untuk setiap konsentrasi. Kurva standar dibuat dengan

memplotkan konsentrasi kurkumin (ppm) dengan absorbansinya.

Uji Akurasi. Uji akurasi dilakukan dengan pengukuran absorbansi larutan standar yang sudah diketahui konsentrasinya secara tepat dengan berulang kali sehingga didapatkan %Recovery.

Uji Presisi. Uji presisi ini dilakukan dengan cara: 1) penimbangan berkali-kali berat sampel dan peralatan penelitian serta pengukuran absorbansi sampel maupun larutan standar untuk mendapatkan nilai ketidakpastian konsentrasi kurkuminoid dan CV hitung; 2) Pengukuran absorbansi sampel di tiga alat Spektrofotometer *UV-Vis* yang berbeda yaitu di Lab Terpadu UNDIP, Lab Jurusan Kimia FSM, dan Lab Sucofindo Semarang, tujuannya yaitu mendapatkan nilai %RSD.

Penentuan LOQ. Penentuan LOQ ini dilakukan menggunakan konsentrasi kurkuminoid tertentu yang diukur absorbansinya berulang kali.

Uji Stabilitas. Uji stabilitas larutan standar dilakukan dengan penyimpanan larutan standar dalam jangka waktu pendek (0, 6, dan 24 jam) pada suhu kamar dan jangka waktu panjang (0, 7, dan 14 hari) pada suhu lemari pendingin. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan kurkuminoid sebagai larutan standar. Uji stabilitas sampel produk herbal juga dilakukan dalam jangka waktu pendek (0, 6, dan 24 jam) dan jangka waktu panjang (0, 7, dan 14 hari) pada suhu kamar. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan kurkuminoid sebagai kandungan produk herbal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

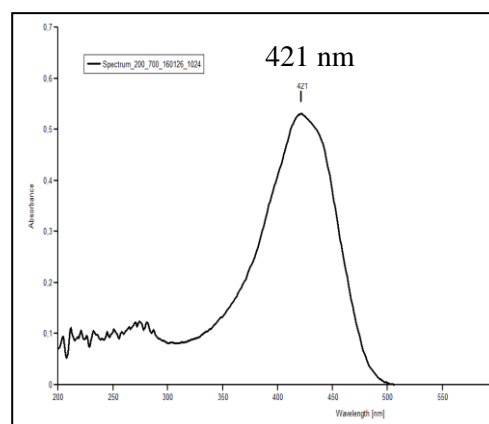
Sampel Uji dan Praanalisis

Penelitian mengenai validasi metode terhadap senyawa aktif dalam rimpang temulawak (*Curcuma xanthorriza* Roxb) sangat diperlukan dalam rangka mengetahui keakuratan spektrofotometri *UV-Vis* untuk menganalisis kandungan kurkuminoid.

Seperti yang tertera dalam kemasan, dalam satu kemasan produk herbal sampel berisi 100 kapsul dengan berat 550 mg per 1 kapsulnya. Dalam penelitian ini sampling yang dilakukan yaitu dengan mengambil 10 kapsul secara acak dari 100 kapsul sehingga mewakili populasi kapsul dalam produk herbal komersial tersebut [9]. Dalam penelitian ini, metanol digunakan sebagai pelarut karena kurkuminoid larut dengan baik dalam metanol [10].

Panjang Gelombang Maksimum Kurkuminoid

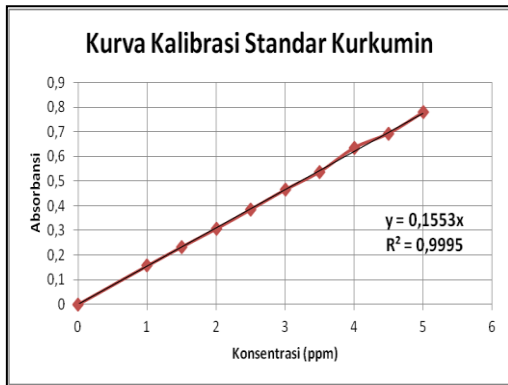
Hasil optimasi panjang gelombang maksimum kurkuminoid didapatkan pada panjang gelombang 421 nm seperti tertera pada gambar 2.



Gambar 2. Panjang gelombang maksimum

Hasil Uji Linearitas

Hasil analisis kurkumin standar didapatkan kurva standar dengan persamaan regresi $y = 0,1553x$ dan harga koefisien korelasi (r) yaitu 0,9995 yang ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Kurva Kalibrasi Standar

Harga koefisien korelasi (r) yang mendekati 1 menyatakan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linier dan konsentrasi mempengaruhi absorbansi sebesar 99,95%.

Hasil Uji Akurasi

Tabel 1. Hasil Uji Recovery

Pengulangan	Hasil, ppm	%R
1	1,97	98,52
2	1,97	98,52
3	1,97	98,52
4	1,98	98,84
5	1,98	98,84
6	2,00	100,13
7	2,00	100,13
8	2,00	100,13
9	2,00	99,81
10	2,00	99,81
11	2,00	99,81
12	1,99	99,48
13	2,00	99,81
14	2,00	99,81
15	2,00	99,81
Rata-rata		99,46
SD		0,0125
%RSD		0,6294

Berdasarkan perhitungan data pada Tabel 1, semua nilai %Recovery atau Perolehan Kembali mencapai nilai di atas 90% (98,52&-100,13%). hal ini memenuhi batas keberterimaan metode yang baik yaitu %Recovery minimal 90% [11].

Hasil Uji Presisi

Presisi dari suatu prosedur analisis menyatakan kedekatan wilayah keberterimaan antara suatu rangkaian pengukuran yang didapat dari pengambilan sampel berkali-kali dari sampel homogen yang sama dibawah kondisi yang ditentukan [12].

Untuk uji presisi yang pertama yaitu dengan melihat faktor-faktor yang mempengaruhi hasil analisis alat, pengenceran dan pengukuran absorbansi. Hasil yang didapat yaitu nilai ketidakpastian penimbangan sampel 0,0003 g, nilai ketidakpastian volume labu ukur sebesar 0,012 ml, dan nilai ketidakpastian pengenceran 0,015 ml sehingga didapatkan nilai ketidakpastian kandungan kurkumin sebesar 3,73%. Dari penimbangan sampel berulang kali juga dapat ditentukan nilai CV hitung untuk menentukan presisi penimbangan bobot sampel.

Dari penimbangan sampel berulang kali juga dapat ditentukan nilai CV hitung untuk menentukan presisi penimbangan bobot sampel. Dari hasil penghitungan (Tabel 2) didapatkan nilai CV Hitung <2/3 CV Horwitz. Hal ini memenuhi presisi yang baik [13].

Tabel 2. Hasil presisi penimbangan sampel dan Botol Vial

NO.	ORG 1	ORG 2	ORG 3
1	17,3227	17,3234	17,324
2	17,3227	17,3233	17,3237
3	17,3228	17,3232	17,3241
4	17,3227	17,3235	17,3241
5	17,3228	17,3231	17,3241
6	17,3227	17,3235	17,324
Jumlah	103,9364	103,94	103,944
Rerata	17,3227	17,3233	17,324
SD	0,0001	0,0002	0,0002
CV Hitung	0,0003	0,0009	0,0009
CV Horwitz	2,6039	2,6039	2,6039
2/3 CV Horwitz	1,7446	1,7446	1,7446
Persyaratan	CV hitung < 2/3 CV Horwitz	CV hitung < 2/3 CV Horwitz	CV hitung < 2/3 CV Horwitz
Hasil	memenuhi	memenuhi	memenuhi

Tabel 3. Hasil pengujian kurkumin di tiga Laboratorium

Sampel	Tempat	Absorbansi	C (ppm)
1	Lab Terpadu	0,297	1,867
2	Lab Jurusan	0,32	2,061
3	Lab Sucofindo	0,290	1,906
Rerata			1,946
SD			0,038
RSD			0,020
%RSD			1,972

Hasil analisis pada Tabel 3 menunjukkan nilai %RSD yaitu 1,972 dimana nilai ini masuk dalam kategori keberterimaan untuk metode yang baik (%RSD<2) [13].

Hasil Penentuan LOQ

Nilai LOQ dari kurkuminoid yang didapatkan yaitu 0,04 ppm seperti yang tertera pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Penentuan LOQ

NO	Absorbansi	C (ppm)	C terukur (ppm)
1	0,311	2	2,003
2	0,311	2	2,003
3	0,311	2	2,003
4	0,31	2	1,996
5	0,31	2	1,996
6	0,31	2	1,996
7	0,309	2	1,990
8	0,31	2	1,996
9	0,31	2	1,996
10	0,31	2	1,996
Jumlah	3,102	20	19,974
Rata-rata	0,3102	2	1,997
SD			0,004
LOQ			0,04

Hasil Uji Stabilitas

Hasil pengujian kestabilan kurkuminoid dapat dilihat pada tabel 5, 6, dan 7.

Tabel 5. Uji Stabilitas Larutan Standar

C (ppm)	Waktu	C terukur (ppm)	$(C_2-C_1)/C_1$	%diff
2,7	0 jam	2,765	0,024	2,41
	6 jam	2,814	0,042	4,22
	24 jam	2,823	0,046	4,55
2,7	0 hari	2,981	0,104	10,42
	7 hari	2,859	0,059	5,89
	14 hari	3,029	0,122	12,18

Hasil pengujian (Tabel 5) menunjukkan kestabilan kurkumin standar dalam suhu kamar maupun pada suhu lemari pendingin (15°C) yang ditunjukkan dari nilai %difference yang tidak lebih dari 15% yaitu 2,41–12,18%.

Tabel 6. Hasil Uji Stabilitas Sampel Jangka Pendek

C (ppm)	Jam ke	C terukur (ppm)	$(C_2-C_1)/C_1$	%diff
1,652	0	1,652	0	0
	6	1,717	0,0390	3,90
	24	1,683	0,0187	1,87

Tabel 7. Uji Stabilitas Sampel Jangka Panjang

C (ppm)	Hari Ke	C terukur (ppm)	$(C_2 - C_1) / C_1$	%diff
	0	1,654	0	0
1,654	7	1,632	-0,0132	-1,32
	14	1,736	0,0498	4,98

Hasil pengujian pada sampel (Tabel 6 dan tabel 7) menunjukkan kestabilan kurkuminoid dalam produk herbal dalam jangka waktu pendek maupun panjang yang ditunjukkan dari nilai *%difference* yang tidak lebih dari 15% yaitu 0 - 3,90% dan -1,32 - 4,98 %.

KESIMPULAN

Metoda analisis kurkuminoid dengan Spektrofotometri *UV-Vis* telah memenuhi persyaratan validasi metoda uji dengan hasil yang memuaskan sehingga metoda analisis tersebut valid untuk dipergunakan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Kepala Laboratorium Kimia Organik UNDIP, Kepala Laboratorium Terpadu UNDIP, dan Kepala Laboratorium Sucofindo Semarang serta semua pihak yang ikut berkontribusi dalam penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] Anonim, *Daftar Obat Alam*, 2008 3rd ed. Jawa Tengah, Gabungan Pengusaha Jamu & Obat Tradisional Indonesia, Dewan Pimpinan Daerah.
- [2] Pröhl, M., Schubert, U.S., Weigand, W., and Gottschaldt, M., 2016,

Coord. Chem. Rev., 307, Part 1:32–41.

- [3] Wang, X., Jiang, Y., Wang, Y-W., Huang, M.-T., Ho, C.-T., and Huang, Q., 2008, *Food Chem.*, 108(2):419–24.
- [4] Jha, N.S., Mishra, S., Jha, S.K., and Surolia, A., 2015, *Electrochimica Acta*, 151:574–83.
- [5] Jayaprakasha, G.K., Jaganmohan, Rao, L., and Sakariah, K.K., 2006, *Food Chem.*, 98(4):720–4
- [6] Li Yang, Qing-Hua, Y., Jin-You, M., Qing, W., Jian-Wei, Z., and Guo-, X. X., 2013, *Trop. J. Pharm. Res.*, 12(5):771–6.
- [7] Sonawane, S.D., Nirmal, S.A., Patil, A.N., and Pattan, S.R., 2011, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 34(20):2664–73.
- [8] Cahyono, B., Huda, M.D.K., and Leenawaty, L., 2011, *Reaktor*, 2011, 13(3):165–71.
- [9] Chandra, B., 1995, *Pengantar Statistik Kesehatan*, Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran, EGC.
- [10] Bos, R., Windono, T., Woerdenbag, H.J., Boersma, Y.L., Koulman, A., Kayser, O., 2007, *Phytochem Anal.*, 18(2):118–22.
- [11][AOAC International, 1998, *AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures*, Gaithersburg, MD.

[12] ICH, 1995, *Validation of Analytical Procedures; Text and Methodology*.

[13] AOAC International, 2012, *Guidelines for Standard Method Performance Requirements* [Internet], Available from: http://www.eoma.aoc.org/app_f.pdf

TANYA JAWAB

Penanya : Budi Hastuti

Pertanyaan:

1. untuk mendapatkan % difference yang baik, apakah diperlukan usaha-usaha untuk menjaga kestabilan kurkuminoid? jelaskan usaha-usahanya
2. dalam analisis spektro uv-vis untuk penelitian anda, larutan blangko yang digunakan apa?

Penjawab: Selina Shofia Kumila

Jawaban:

1. % difference bisa menunjukkan kestabilan suatu senyawa. nilai ini didapatkan dengan melihat hasil analisis konsentrasi zat sebelum disimpan dan sesudah disimpan

Ya, perlu

- a) simpan sampel kurkuminoid dalam ruangan yang gelap dan teduh
 - b) lakukan pengamatan uv atau analisis dengan mematuhi waktu yang sudah ditargetkan, agar hasil analisis sesuai dengan yang diharapkan (mewakili % difference)
2. larutan blangki yang digunakan yaitu larutan metanol p.a.

Penanya : Arum P

Pertanyaan:

Kenapa dalam standar kalibrasi terdapat data (min) pada % difference?

Penjawab: Selina Shofia Kumila

Jawaban:

Persen difference (%difference) digunakan untuk menunjukkan kestabilan suatu zat. range standar dari nilai %difference yaitu -15% hingga +15%. nilai minus pada data % difference menunjukkan perubahan konsentrasi kurkuminoid yang menurun. apabila nilai minus tersebut masih berada dalam range standar, maka senyawa tersebut masih disebut cukup stabil dalam proses penyimpanan yang dilakukan.