

Validasi Metode Penetapan Kadar Kurkumin pada Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dengan KLT-Densitometri

Dedi Hanwar^{1*}, Vera Widyastuti¹, Andi Suhendi¹

¹ Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta

*Email: dedi.hanwar@ums.ac.id

Abstrak

Keywords:

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*);
Kurkumin; KLT-Densitometri

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) merupakan salah satu tanaman yang banyak digunakan dalam pengobatan herbal. Tanaman tersebut mempunyai banyak manfaat bagi tubuh, dimana manfaatnya sangat tergantung pada kadar kurkuminnya, maka diperlukan metode penetapan kadar kurkumin yang valid terhadap ekstrak temulawak untuk menjamin kualitasnya. Telah dikembangkan metode untuk penetapan kadar kurkumin dalam ekstrak yaitu KLT-Densitometri. Validasi metode KLT-Densitometri untuk analisis kurkumin dilakukan dengan fase diam silika gel GF254, fase gerak benzen: kloroform: metanol (15:80:5). Nilai R_f dari kurkumin yaitu 0,57 dengan nilai R_s 2,16 dan dideteksi pada λ maksimal 415 nm. Hasil analisis parameter validasi yang diperoleh yaitu akurasi 100,36% dengan nilai RSD 0,70; linieritas dengan $r = 0,9951$; RSD untuk presisi antara yaitu 1,75%; keberulangan nilai RSDnya 1,43%; nilai LOD dan LOQ berturut-turut adalah 19,9 ppm dan 66,4 ppm. Metode KLT densitometri untuk analisis kurkumin dalam ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) memenuhi nilai validitas yang diperbolehkan.

1. PENDAHULUAN

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) merupakan salah satu tanaman herbal yang banyak digunakan masyarakat Indonesia sebagai obat tradisional. Kandungan utama temulawak adalah kurkuminoid yang terdiri dari tiga komponen yaitu kurkumin, demetoksikurkumin dan bis-demetoksikurkumin. Kurkumin merupakan komponen terbesar pada kurkuminoid yang memiliki aktivitas biologi sebagai anti inflamasi [1], anti oksidan, antiplatelet [2], anti angiogenik, artritis, antidiabetes [3] anti kanker [4], antivirus, antikarsinogenik,

anti mutagenik [5] dan mencegah penyakit Alzheimer's [6].

Sediaan herbal yang diproduksi mempunyai variasi kandungan dari satu betas dengan betas lainnya, sehingga diperlukan suatu metode standardisasi bahan baku maupun sediaan yang cepat, mudah, biaya murah dan bisa dilakukan dilaboratorium manapun yaitu skrining cepat [7]. Standardisasi tidak saja diperlukan pada simplisia, tetapi juga pada ekstrak, metode pembuatan sediaan termasuk pelarut yang digunakan dan standardisasi sediaan jadinya [8]. Parameter standardisasi ekstrak yaitu

parameter spesifik dan non spesifik ekstrak yang terstandar dan menunjukkan kualitas ekstrak dalam hal kandungan aktif, kadar air maupun batas cemaran yang diperbolehkan [9].

Efektivitas sediaan obat herbal terstandar berbasis kurkuminoid sangat tergantung pada kadar kurkumin dalam sediaan, karena kurkumin merupakan komponen terbesar, senyawa marker dan komponen yang berperan penting pada aktivitas biologi sediaan berbasis kurkuminoid. Oleh karena itu perlu dilakukan kontrol kualitas kurkumin untuk menjamin keseragaman kandungan kurkumin dalam sediaan. Untuk menjaga dan mengarahkan kualitas produk sediaan yang dibuat sesuai dengan standar mutu yang diinginkan maka diperlukan suatu metode yang valid untuk melakukan control kualitas terhadap sediaan Obat Herbal.

Metode yang diaplikasikan untuk menetapkan kadar kurkumin, diantaranya spektrofotometrik [10], KLT-Densitometri [11], Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Kolom (KK) [12], Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) [13], Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi (KLTKT) [14], Capillary electrophoresis (CE), Analisis Injeksi Alir [15], Kromatografi Cair Gas dan potensiometri [1]. Pothitirat dan Gritsanapan (2005) melakukan penelitian jumlah kurkumin, demetoksikurkumin dan bis-demetoksikurkumin dalam ekstrak *Curcuma longa* yang dikumpulkan dari berbagai tempat berbeda di Thailand dianalisis dengan metode KLT-Densitometri menghasilkan linieritas yang baik untuk bisdemotoksikurumin dengan fase gerak benzen: kloroform: metanol (15:80:5) [16].

Metode yang biasa diaplikasikan untuk skrining maupun kontrol kualitas di Badan POM dan industri obat herbal yaitu HPLC. Metode ini mempunyai beberapa kekurangan yaitu mahal, analisis sampel lebih lama karena satu per satu, fase gerak yang digunakan lebih banyak, rumit. Oleh karena itu perlu dikembangkan suatu metode skrining maupun kontrol kualitas bahan baku dan sediaan herbal yang lebih

sederhana, cepat, biaya rendah, analisis sampel bisa sekaligus/banyak, fase gerak lebih sedikit reliable dan memiliki sensitivitas yang baik yaitu KLT-Densitometri. Metode ini merupakan metode pilihan dibandingkan HPLC. Validasi metode KLT-densitometri analisis kurkumin pada rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) perlu dilakukan karena metode ini belum pernah divalidasi. Hal ini dimaksudkan untuk menjamin kualitas ekstrak temulawak yang dihasilkan sebagai bahan baku sediaan obat herbal sesuai dengan standar mutu yang telah ditetapkan, sehingga jaminan kualitas sediaan herbal berbasis kurkuminoid dapat ditingkatkan.

2. METODE

Bahan yang digunakan adalah Rimpang temulawak yang diambil dari Pasar Gede Surakarta, standard kurkuminoid (E Merck purity 80%), plat KLT GF 254, metanol teknis (Brataco), benzen pa (Merck), kloroform pa (Merck), dan metanol pa (Merck).

Alat yang digunakan adalah Seperangkat alat ekstraksi, seperangkat alat gelas, neraca analitik, seperangkat alat kromatografi densitometri CS 9301 pc dual waveligth flying spot scanning.

Analisis dengan KLT-Densitometri: sampel dianalisis dengan KLT-Densitometri CS 9301 pc dual wavelight flying spot scanning, fase gerak kloroform:benzen:metanol (80:15:5 v/v), fase diam KLT silika GF254, λ scan 415 nm. Sebanyak 4 μ l sampel ditotolkan pada plat KLT silika GF254. Komponen diidentifikasi dengan membandingkan luas area standard dengan sampel pada kromatogram.

Prosedur preparasi sampel: Preparasi sampel dilakukan dengan menimbang 100 mg ekstrak rimpang temulawak dengan seksama, kemudian dilarutkan dengan metanol sedikit. Larutan kemudian disonifikasi selama 5 menit, dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 mL, kemudian ditambah metanol sampai tanda sehingga konsentrasi sampel yang diperoleh yaitu 10 mg/mL (konsentrasi 100%).

Analisis parameter validasi

Akurasi:

Ekstrak temulawak dipreparasi seperti prosedur preparasi sampel, kemudian ditambah standar kurkuminoid (500 µL, 750 µL dan 1000µL) dan metanol sampai tanda. Larutan kemudian dielusi dengan fase gerak yang cocok dan dibaca pada densitometer. Hasil yang didapat berupa luas area dan Rf. Kadar dihitung dengan memasukkan nilai luas area ke dalam persamaan linier regression (LR). Data kadar kurkumin tiap sampel kemudian dihitung sehingga diperoleh nilai perolehan kembali dan RSD. Kriteria keberterimaan untuk parameter akurasi adalah perolehan kembali 95-105% dan RSD 3,7% untuk kadar analit sampai 0,1% [17].

Linieritas:

Linieritas ditentukan dengan membuat seri kadar larutan sampel dengan rentang kadar 70%-140% serta direplikasi sebanyak 3 kali. Ditimbang sampel ekstrak dipreparasi dengan range kadar 70-140 mg, larutan kemudian ditotolkan pada plat KLT, dielusi dengan fase gerak yang sesuai dan dibaca dengan densitometer pada λ maksimal. Data yang diperoleh kemudian diolah dengan menggunakan linier regression (LR) antara berat penimbangan vs luas area. Kemudian dihitung nilai r nya dengan syarat keberterimaan $> 0,98$.

Presisi antara (interday precision):

Ekstrak temulawak dipreparasi sesuai dengan prosedur preparasi sampel sebanyak tujuh kali, ditotolkan pada plat KLT, dielusi dengan fase gerak yang sesuai dan dibaca pada densitometer dengan λ maksimal senyawa yang dianalisis. Parameter ini direplikasi sebanyak 3 kali pada 3 hari yang berbeda. Kadar dihitung dengan memasukkan nilai luas area ke dalam persamaan linier regression (LR) dan dihitung nilai RSD nya. Tingkat keberterimaan untuk parameter presisi antara adalah 3,7% untuk kadar analit sampai 0,1% [17].

Keberulangan (Intraday precision)

Ekstrak temulawak dipreparasi sesuai dengan prosedur preparasi sampel sebanyak tujuh kali, ditotolkan pada plat KLT, dielusi dengan fase gerak yang

sesuai dan dibaca dengan densitometer pada λ maksimal senyawa yang dianalisis. Parameter ini direplikasi sebanyak 3 kali pada hari yang sama dan kadar dihitung dengan memasukkan nilai luas area ke dalam persamaan linier regression (LR) dan dihitung nilai RSD nya. Tingkat keberterimaan untuk parameter presisi antara adalah 3,7% untuk kadar analit sampai 0,1% [17].

LOD dan LOQ

Parameter LOD dan LOQ ditetapkan dengan cara menghitung secara statistik melalui garis linier regression (LR) dengan menggunakan persamaan pada Harmita (2004) [18].

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis parameter validasi yang ditetapkan pada penelitian ini adalah akurasi, linieritas, presisi antara, rpitabilitas, LOD dan LOQ. Kurva baku pada percobaan ini ditetapkan dengan range kurva baku kurkumin 0,02%-0,140% dari larutan stok kurkuminoid 0,5%. Persamaan kurva baku yang diperoleh yaitu $y = 38115,16x + 1051,67$ dengan $R^2 = 0,995$. Pada penelitian ini akurasi ditetapkan dengan metode penambahan standar zat aktif (standar addition method). Akurasi dilaporkan sebagai persentase perolehan kembali (%recovery) dengan syarat keberterimaan 95%-105% dan RSD 3,7% untuk kadar analit sampai 0,1% [17]. Nilai %recovery dan RSD yang diperoleh pada penetapan parameter akurasi yaitu $100,36 \pm 0,70$ (Tabel 1) dan parameter ini memenuhi persyaratan yang ditetapkan yaitu %recovery 95%-105% dan RSD 3,7%. Maka metode KLT-Densitometri untuk penentuan kadar kurkumin pada ekstrak temulawak akurat.

Parameter akurasi senyawa kurkumin juga telah dilakukan oleh para peneliti dengan menggunakan metode HPTLC. Hasil yang diperoleh memberikan hasil yang hampir sama dengan penelitian ini. Nilai %recovery dan RSD yang diperoleh yaitu $106,67\% \pm 3,51$ [19]; $99,67\% \pm 0,05$ [14] dan $99,49\% \pm 0,95$ [20]. Semakin kecil RSD yang diperoleh maka semakin presisi pengukurannya. Bila akurasi tidak

diterima maka diperlukan pengkajian ulang mengenai sampel, cara kerja, atau percobaan ulang dengan metode yang berbeda yang lebih selektif untuk memastikan hasil percobaan yang telah dilakukan.

Pada penetapan parameter linieritas untuk ekstrak rimpang temulawak dilakukan dengan rentang linieritas 70mg – 140mg sampel. Hasil percobaan yang diperoleh pada penetapan parameter ini yaitu 0,9951 (Tabel 1). Pada penelitian ini hasil yang diperoleh memenuhi syarat yaitu $r > 0,98$, dimana hasil tersebut hampir sama dengan penelitian lain pada penetapan linieritas senyawa kurkumin, antara lain Kekre and Walode (2012) melakukan penelitian linieritas kurkumin pada suplement diet dengan rentang linieritas 100–180 ng/spot, nilai koefisien korelasi (r) yang diperoleh yaitu 0,998 [19]. Gantait et al (2011) menetapkan linieritas pada serbuk *Curcuma longa* dengan rentang linieritas 0,8-1,3 μ g/spot, nilai r yang diperoleh yaitu 0,99395 [14]. Ashraf et al (2012) menetapkan linieritas pada *Curcuma longa* di daerah India dengan rentang linieritas 200-1000 ng/spot, nilai $r = 0,9968$.

Penetapan parameter presisi antara dan keberulangan dilakukan dengan cara menimbang sampel minimal 6 kali penimbangan dengan berat yang sama. Pada penetapan parameter presisi antara dilakukan pada hari yang berbeda dan hasil penentuan presisi antara untuk ekstrak rimpang temulawak yaitu 1,75% (Tabel 1). Presisi antara digambarkan sebagai nilai RSD dengan syarat keberterimaan yaitu 3,7% untuk kadar analit sampai 0,1% (Mulja dan Hanwar, 2003). Hasil yang diperoleh pada penetapan parameter presisi antara mendekati hasil penelitian Ashraf et al (2012) yang menetapkan parameter presisi antara kurkumin pada *Curcuma longa* yang terdapat di daerah India menggunakan metode HPTLC dengan nilai RSD 1,7% [20].

Hasil penetapan parameter keberulangan untuk ekstrak rimpang temulawak yaitu 1,43% (Tabel 1). Parameter keberulangan mempunyai nilai RSD yang lebih kecil dibandingkan presisi

antara, karena pada presisi antara dilakukan pada kondisi yang berbeda sedangkan pada keberulangan dilakukan pada kondisi analisis yang sama, sehingga perbedaan kondisi penelitian tersebut menyebabkan variasi nilai RSD yang diperoleh. Kriteria keberterimaan keberulangan sama dengan presisi antara yaitu digambarkan dengan nilai RSD yang memiliki syarat keberterimaan 3,7% untuk kadar analit sampai 0,1% [17]. Hasil analisis parameter ini menggunakan memberikan hasil yang hampir sama dengan penelitian lain menggunakan metode HPTLC yaitu nilai RSD 1,417% [19] dan 1,32% [20].

Penentuan Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantification (LOQ) pada penelitian ini dilakukan dengan metode perhitungan berdasarkan pada standar deviasi respon dan kemiringan kurva kalibrasi. Nilai LOD dan LOQ yang didapatkan kebenaran hasilnya dapat diuji dengan membandingkan nilai/kadar analit yang terkecil dengan nilai LOD dan LOQnya. Caranya adalah $10 \times \text{LOQ} > \text{Cmin}$ dan $\text{LOD} < \text{Cmin}$, jika hasilnya memenuhi kriteria tersebut maka nilai LOD dapat diterima [21]. Hasil perhitungan LOD dan LOQ dari ekstrak rimpang temulawak berturut-turut yaitu 19,9 ppm dan 66,4 ppm (Tabel 1).

Hasil percobaan nilai LOD dan LOQ yang diperoleh pada pengukuran ekstrak rimpang temulawak dengan metode KLT-Densitometri dapat diterima. Hal ini dibuktikan dengan nilai LOD (19,9 ppm) $< \text{Cmin}$ (200 ppm) dan $10 \times \text{LOQ}$ (644 ppm) $> \text{Cmin}$ (200 ppm). Parameter ini merupakan parameter penting yang perlu ditetapkan untuk metode pengukuran atau kuantifikasi senyawa, sehingga penelitian dengan metode dan sampel yang sama hanya bisa dilakukan jika nilai LOD dan LOQ yang diperoleh sama dengan penelitian ini. Hasil analisis yang diperoleh pada penelitian ini mempunyai nilai yang lebih besar dibandingkan penelitian lain dengan menggunakan metode HPTLC. Nilai LOD dan LOQ yang diperoleh yaitu 49 ng dan 148 ng [14]; 27,3 ng dan 82,7 ng [19] dan 50 ng dan 200 ng [20].

Tabel 1. Hasil Parameter Validasi Metode KLT-Densitometer Analisis Kurkumin Dalam Ekstrak Rimpang Temulawak

Parameter	Hasil
Akurasi	100,36%±0,70
Linieritas	0,9951
Presisi antara	1,75%
Keberulangan	1,43%
LOD	19,9 ppm
LOQ	64,4 ppm

Dari data parameter validasi (Tabel 1) menunjukkan bahwa metode KLT Densitometri merupakan metode yang valid untuk analisis kurkumin dalam ekstrak rimpang temulawak. Hal ini dibuktikan dengan hasil analisis parameter validasi semua memenuhi syarat keberterimaan.

Tabel 2. Rasio perbandingan konsentrasi kurkuminoid pada kurva baku dan sampel ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

Senyawa	Rasio baku	Rasio ekstrak
Bis-demetoksi kurkumin	7	0,8
Demetoksi kurkumin	24	27
Kurkumin	69	65,2
Anonim	0	7

Sampel maupun standar kurkumin tidak mengalami perubahan kadar yang signifikan selama penyimpanan dan pengukuran, hal ini disebabkan karena penyimpanan sampel maupun standar yang baik yaitu di almari es, dimana kerusakan sampel maupun standar dapat diminimalkan (Tabel 2). Namun, apabila dibandingkan dengan standard kurkumin maka sampel ekstrak mempunyai kadar kurkumin yang lebih rendah, hal ini mungkin disebabkan karena standard kurkumin sudah melalui proses isolasi dimana senyawa pengganggu sudah dihilangkan sehingga kadar kurkumin lebih tinggi. Sedangkan pada penelitian ini sampel yang digunakan masih berupa

ekstrak kasar dimana masih terdapat senyawa pengganggu

4. KESIMPULAN

Metode KLT densitometri untuk penetapan kadar kurkumin dalam ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) memenuhi nilai validitas syarat keberterimaan yang ditetapkan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Fakultas Farmasi UMS yang telah memberikan dukungan finansial dan fasilitas untuk penelitian ini.

REFERENSI

- [1] Modi G. And Pitre K. S., 2010, Electrochemical Analysis of Natural Chemopreventive Agent (Curcumin) in Extracted Sample and Pharmaceutical Formulation, *J Def. Sci.*, Vol. 60, pp. 255-258.
- [2] Naz S., Safia Jabeen, Saiqa Ilyas, Farkhanda Manzoor, Farah Aslam and Aamir Ali, 2010, Antibacterial Activity of *Curcuma longa* Varieties Against Different Strains of Bacteria, *Pak. J. Bot.*, 42(1): 455-462.
- [3] Himesh S., Patel Sita Sharan, Mishra K, Nayak Govind, Singhai AK, 2011, Qualitative and Quantitative Profile of Curcumin from Ethanolic Extract of *Curcuma long*, *IRJP 2*, India, hal : 180-184.
- [4] Aggarwal, B.B., Kumar, A. and Bharti, A.C., 2003, Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies, *Anticancer Research* 23, 363-98.
- [5] Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Banerjee, R.K., 2004, Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications, *Curr. Sci.* 87, 44-53.
- [6] Lim, G. P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautsch, S. A. and Cole, G.M., 2001, The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse, *J Neurosci* 21: 8370 - 8377.

- [7] Sotanaphun U., Thawatchai Phaechamud and Pranom Dechwisissakul, 2007, Rapid Screening Method for Curcuminoid Content in Turmeric (*Curcuma longa* Linn.), *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, Vol. 2 No. 2: 125-130.
- [8] Dewoto H. R., 2007, Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka, *Majalah Kedokteran Indonesia*, Volum: 57, Nomor: 7.
- [9] Badan POM RI, 2005, Standardisasi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia Salah Satu Tahapan Penting dalam Pengembangan Obat Asli Indonesia, *Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia*, Vol. 6 No. 4.
- [10] Gupta N., Alok Nahata, Vinod Kumar Dixit, 2010, Development of a spectrofluorimetric method for the determination of curcumin, *Asian Journal of Traditional Medicines*
- [11] Hanwar D., Aisyah S., Suhendi A., 2018, Validasi Metode KLT Densitometri untuk Penetapan Kadar Kurkumin pada Produk Obat Herbal Berbasis Curcuma sp, *Proceeding of The Urecol 7*: 379-385
- [12] Revathy S., Elumalai S., Merina Benny and Benny Antony, 2011, Isolation, Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.) by Column Chromatography, *J Exp Sci 2*: 21-25.
- [13] Nagappan, Meyyanathan S N, Rajinikanth B Raja and Elango Kannan, 2009, A Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Curcumin and Piperine in Food Products Using Diode Array Detection, *Asian J. Research Chem.*
- [14] Gantait A., Barman T., and Mukherjee P. K., 2011, Validated method for estimation of curcumin in turmeric powder, *Indian J Traditional Knowledge*, Vol. 10, hal : 247-250.
- [15] Rohman, 2012, Analysis of curcuminoids in food and pharmaceutical products, *International Food Research Journal* 19(1): 19-27.
- [16] Pothitirat, W and Gritsanapan, W., 2005, Quantitative Analysis of Curcumin, Demethoxycurcumin and Bisdemethoxy curcumin in the Crude Curcuminoid Extract from *Curcuma longa* in Thailand by TLC Densitometry, *Mahidol Univ J Pharm Sci*, Bangkok
- [17] Mulja M and Hanwar D, 2003, Prinsip-prinsip Cara Berlaboratorium yang Baik (Good Laboratory Practice), *Majalah Farmasi Airlangga 3 (2)*: 71-76
- [18] Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. 1, No.3.
- [19] Kekre V. A. and Walode S. G., 2012, Validated HPTLC method for estimation curcumin content in Dietary Supplement Formulation, *IJPSR*, Vol. 3, hal : 3796-3800.
- [20] Kamran A, Mujeeb M, Ahmad A, Ahmad S, Amir M, Mallick MN, and Sharma D, 2012, Validated HPTLC analysis method for quantification of variability in content of curcumin in *Curcuma longa* L (tumeric) collected from different geographical region of India, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* : 584-588.
- [21] Konieczka, P., and Namiesnik, J., 2009, *Quality Assurance and Quality Control in The Analytical Chemical Laboratory*, CRC Press, 148-150.