

Validasi Metode KLT-Densitometri untuk Penetapan Kadar Kurkumin pada Produk Obat Herbal Berbasis *Curcuma* sp.

Dedi Hanwar^{1*}, Siti Aisyah¹, Andi Suhendi¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta

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

Abstrak

Keywords:

Curcuma domestica;
Curcuma xanthorrhiza; KLT-Densitometri;
Kurkumin;
Validasi.

Kunyit (*Curcuma domestica*) dan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) merupakan tanaman yang banyak digunakan untuk produk obat herbal, yang khasiat utamanya tergantung pada kurkuminoid dan minyak atsiri. Dengan adanya perkembangan produk-produk obat bahan alam, maka pengawasan terhadap produk-produk yang beredar di pasaran perlu dilakukan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui validasi metode KLT-Densitometri untuk penetapan kadar kurkumin pada produk obat herbal yang mengandung ekstrak kunyit (D1) dan temulawak (D2). Metode KLT-Densitometri untuk analisis kurkumin dilakukan dengan menggunakan fase gerak kloroform: benzena: metanol (80:15:5) dan fase diam silika gel GF254. Nilai Rf dari kurkumin yaitu 0,5 yang dideteksi pada λ maksimal 416 nm. Hasil persen perolehan kembali untuk parameter akurasi pada sampel berturut-turut yaitu $106,33 \pm 2,33\%$ (D1) dan $103,14 \pm 2,06$ (D2). Sedangkan nilai %RSD pada penetapan parameter presisi antara dari sampel D1 dan D2 berturut-turut yaitu, 1,39% dan 1,57%, dan pada parameter keterulangan adalah 1,35% dan 1,78%. Sehingga metode KLT-Densitometri valid untuk penetapan kadar kurkumin pada produk herbal.

1. PENDAHULUAN

Salah satu tanaman yang digunakan untuk obat tradisional adalah temulawak dan kunyit (Afifah dan Lentera, 2003). Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dan kunyit (*Curcuma domestica* Val.) termasuk famili Zingiberaceae yang tumbuh di daerah tropis (Sudewo, 2004), yang sudah dikenal oleh masyarakat baik sebagai pewarna, bahan pangan dan obat tradisional, khasiat utamanya disebabkan oleh dua kelompok kandungan kimia yaitu kurkuminoid dan minyak atsiri (Liang, et al., 1985). Banyak sediaan herbal yang berasal dari temulawak dan kunyit, dan banyak sekali ditemukan dalam resep-resep obat tradisional dan obat herbal terstandar. Produk-produk jamu, obat herbal terstandar (OHT) dan fitofarmaka berbasis kurkumin yang telah banyak beredar di pasaran diantaranya yaitu, Curliv, Curliv Plus, Curmino, Cursil, Kiranti, Kunyit Asam, Curcuma Plus, Curson, Curvit, Curbion, Diapet, Curbion Kids dan Vitakur.

Dengan adanya perkembangan produk-produk obat bahan alam berbasis kurkumin yang tidak hanya dalam bentuk jamu, tetapi juga dalam bentuk OHT dan fitofarmaka (BPOM, 2005), maka pengawasan terhadap produk-produk yang beredar di pasaran perlu dilakukan, sebagai kontrol kualitas dan untuk menjamin efektivitas dari senyawa aktif (Rohman, 2012). Salah satu metode yang umum digunakan dalam proses kontrol kualitas bahan baku atau ekstrak penyusun obat herbal adalah dengan menunjukkan kadar kandungan kimia yang berkhasiat, atau kandungan kimia penanda (*marker*), atau yang memiliki sidik jari (*fingerprint*) pada kromatogram (Liang et al., 2004). Beberapa teknik kromatografi seperti kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), kromatografi gas (GC), elektroforesis kapiler (CE) dan kromatografi lapis tipis (KLT), dapat diterapkan untuk penetapan kadar (Liang et al., 2004).

Metode KLT merupakan sebuah metode yang sederhana dan dapat diandalkan, dapat digunakan analisis kualitatif dan analisis kuantitatif beberapa spesies rimpang curcuma. Metode KLT dapat dikembangkan dan digunakan sebagai metode alternatif yang ekonomis untuk kontrol kualitas rutin pada rimpang curcuma (Zhang et al., 2008). Menurut Forgacs dan Cserhati (2002), metode KLT secara teratur dapat digunakan untuk identifikasi, pemisahan, kuantifikasi atau semikuantitatif dari pigmen alam termasuk kurkuminoid. KLT-densitometri termasuk metode yang cepat dan sederhana yang telah dikembangkan untuk analisis kuantitatif simultan kurkumin, demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin dalam serbuk curcuma. Akurasi dan presisinya dapat diterima (Pothitirat dan Gritsanapan, 2005) serta preparasi sampelnya yang sederhana (Liang et al., 2004).

2. METODE

Alat yang digunakan adalah Seperangkat alat KLT-Densitometri (CS 9301 PC dual wavelight flying spot scanning densitometer), neraca analitik, seperangkat alat gelas, sonifikator, mikropipet 0,5-10 μ L, dan mikropipet 100-1000 μ L.

Bahan yang digunakan Jika tidak dinyatakan lain reagen yang digunakan pro analysis dari Merck. Produk berbasis kurkumin yaitu sampel D1 (120 mg ekstrak Curcuma domestica) dan sampel D2 (75 mg ekstrak Curcumae Rhizoma), Kurkuminoid (purity 80%) Sigma Aldrich, plat KLT silika GF254, Metanol teknis (Brataco), Metanol, Chloroform, Benzen, kertas saring, dan aluminium foil.

2.1 Jalannya Penelitian

Keseragaman Bobot: Ditimbang masing-masing sampel 20 kapsul produk obat herbal berbasis kurkumin merek D1 dan D2, dicatat dan dievaluasi hasil keseragaman bobotnya menggunakan uji statistik dengan syarat RSD < 5% dan syarat keseragaman bobot pada FI IV.

Optimasi Fase Gerak KLT: Optimasi fase gerak dilakukan dengan menotolkan sampel (produk) dan standar kurkuminoid pada plat KLT sebanyak 2 μ L, kemudian dielus dengan fase gerak A (kloroform: benzen: metanol 80:15:5) diperoleh Rf kurkumin 0,6 (Pothitirat dan Gritsanapan, 2005) dan fase gerak B adalah modifikasi dari fase gerak A yaitu (kloroform: benzene: metanol 75:15:10).

Pembuatan Larutan Stok Kurkumin 0,5% dan 5%: Ditimbang dengan seksama kurang lebih 50 mg dan 500 mg standar kurkuminoid, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga volume tepat 10 mL dan disonikasi dalam ultrasonic bath selama \pm 10 menit.

Pembuatan Kurva Baku: Kurva baku kurkumin dibuat dengan kadar 0,020%; 0,040%; 0,060%; 0,08%; 0,10%; 0,12%; dan 0,140% dari larutan stok kurkumin 0,5%. Masing-masing ditotolkan 2 μ L. Luas area yang diperoleh dicatat. Dan dihitung regresi liniernya untuk memperoleh kurva baku, luas area sebagai sumbu Y dan konsentrasi sebagai sumbu X.

Preparasi Sampel: Ditimbang dengan seksama masing-masing produk D1 dan D2, dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL. Ditambahkan metanol p.a hingga volume tepat 5 mL dan disonikasi pada ultrasonic bath selama \pm 10 menit kemudian disaring.

Perhitungan Kadar: Luas area yang diperoleh dimasukkan pada kurva baku sebagai nilai Y. Nilai X dikalikan faktor pengenceran (fp) bila ada, dan diperoleh kadar kurkumin dalam % bobot per volume. Nilai tersebut dikonversikan menjadi kadar kurkumin dengan membagi bobot penimbangan awal dan dikalikan bobot rata-rata dari keseragaman bobot yang diperoleh sebelumnya.

2.2 Parameter Akurasi dan Presisi

Akurasi: Penetapan akurasi dilakukan dengan menambahkan standar kurkuminoid 5%, yaitu dengan penambahan 3 level konsentrasi pada sampel, yaitu dengan penambahan zat aktif 80%, 100%, 120%. Kemudian ditotolkan pada plat KLT, dielus dengan fase gerak yang sesuai dan dibaca dengan densitometer pada panjang gelombang maksimal. Hasil yang diperoleh dihitung persen perolehan kembali (%)

recovery) menggunakan persamaan (2) beserta nilai RSD, kemudian dibandingkan dengan standar keberterimaan parameter akurasi.

$$\% \text{ recovery} = \frac{(\text{sampel penambahan ZA}) - (\text{tanpa penambahan ZA})}{(\text{jumlah penambahan ZA})} \times 100\% \quad (1)$$

Keterulangan (intraday precision): Penetapan keterulangan dilakukan dengan menimbang sejumlah sampel (sesuai dengan prosedur) dilakukan sebanyak tujuh kali, kemudian ditotolkan pada plat KLT, dielusi dengan fase gerak yang sesuai dan dibaca dengan densitometer pada panjang gelombang (λ) maksimal. Hasil yang diperoleh dihitung kadarnya dengan memasukkan nilai luas area ke dalam persamaan regresi linier dan dihitung nilai RSD nya. Parameter ini dilakukan pada hari yang sama dan kriteria keberterimaannya adalah jika nilai RSD < 2%.

Presisi antara (interday precision): Penetapan presisi antara dilakukan dengan menimbang sejumlah sampel (sesuai dengan prosedur) dilakukan sebanyak tujuh kali, kemudian ditotolkan pada plat KLT, dielusi dengan fase gerak yang sesuai dan dibaca dengan densitometer pada panjang gelombang (λ) maksimal. Hasil yang diperoleh dihitung kadarnya dengan memasukkan nilai luas area ke dalam persamaan regresi linier dan dihitung nilai RSD nya. Parameter ini direplikasi sebanyak 3 kali dan dilakukan pada 3 hari yang berbeda. Kriteria keberterimaannya adalah jika nilai RSD < 2%.

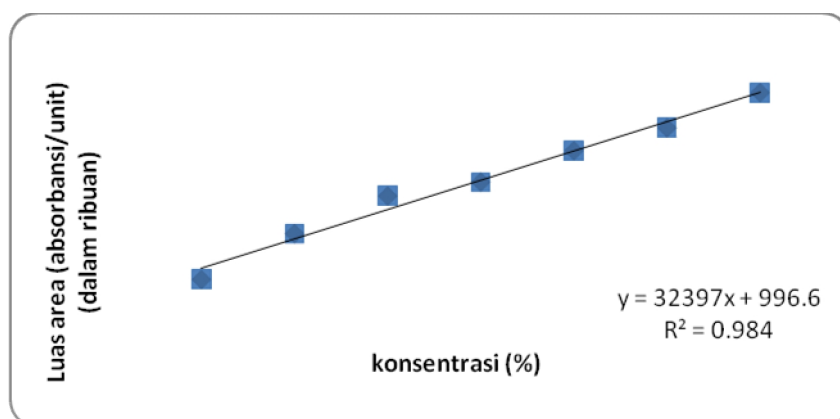
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan fase gerak untuk optimasi dilakukan dengan memilih dua sistem fase gerak yang berbeda yaitu fase gerak A (kloroform: benzen: metanol 80:15: 5) v/v (Pothitirat dan Gritsanapan, 2005) dan fase gerak B adalah modifikasi dari fase gerak A yaitu (kloroform: benzene: metanol 75:15: 10) v/v. Nilai R_f bis-demetoksikurkumin, demetoksikurkumin dan kurkumin pada fase gerak A berturut-turut yaitu 0,2; 0,3; dan 0,5, sedangkan pada fase gerak B berturut-turut yaitu 0,4; 0,48; dan 0,6. Pada fase gerak A mampu memisahkan komponen-komponen senyawa dengan baik dibandingkan pada fase gerak B, sehingga sistem fase gerak yang digunakan adalah fase gerak A (kloroform: benzen: metanol 80:15: 5).

Pengukuran absorbansi (serapan) kurkumin harus pada panjang gelombang maksimalnya, karena pada panjang gelombang tersebut diperoleh intensitas yang maksimal. Hasil yang diperoleh dari penentuan panjang gelombang pada penetapan kadar kurkumin yaitu 416 nm.

Kurva baku dibuat untuk memperoleh persamaan regresi linier, dimana persamaan regresi linier dibutuhkan untuk menghitung kadar kurkumin dalam sampel. Pada penelitian ini digunakan tujuh titik seri kadar kurva baku yaitu dengan rentang kadar 0,020% sampai 0,140%. Kurva baku menunjukkan hubungan antara kenaikan kadar dengan kenaikan respon yaitu luas area. Dengan meningkatnya kadar maka luas area yang terukur akan meningkat, sehingga akan terbentuk hubungan yang proporsional. Dimana hubungan yang proporsional akan memiliki korelasi yang baik. Persamaan kurva baku yang diperoleh $Y = 32397x + 996,67$ dengan koefisien korelasi 0,9842 (Gambar 1).

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen *recovery* (persen perolehan kembali). Persen *recovery* ditentukan dengan cara mengukur 3 seri konsentrasi yang dilakukan masing-masing 3 replikasi (Mulja dan Hanwar, 2003). Penelitian ini menggunakan metode penambahan standar zat aktif (*standard addition method*). Hasil perhitungan data nilai % *recovery* dan RSD rata-rata pada masing-masing sampel yaitu $106,33 \pm 2,33\%$ (D1) dan $103,14 \pm 2,06$ (D2), ini menunjukkan bahwa nilai % *recovery* berada pada rentang nilai % *recovery* yang disepakati untuk analit dalam matrik sampel dengan rentang kadar 10-100ppm yaitu 90-107% dengan RSD 5,3-7,5% (Mulja dan Hanwar, 2003) (Tabel 1). Sehingga penetapan kadar kurkumin dalam sediaan kapsul sampel D1 dan sampel D2 secara KLT-Densitometri memiliki akurasi yang baik.



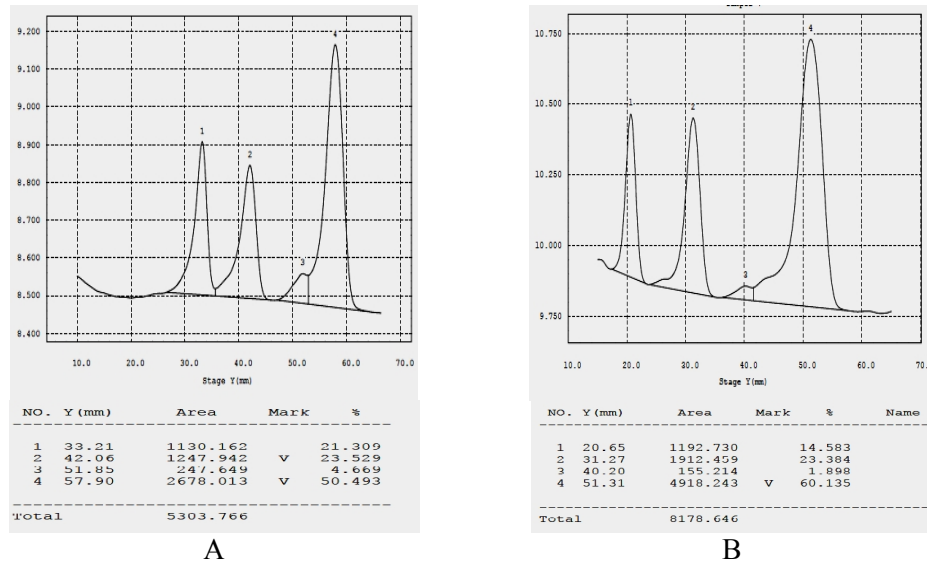
Gambar 1. Kurva baku kurkumin antara konsentrasi dengan luas area.

Presiisi merupakan suatu ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil pengujian individu melalui penyebaran hasil pengujian individu dari rata-rata, dimana prosedur diterapkan secara berulang pada sampel yang diambil dari campuran homogen (Mulja dan Hanwar, 2003). Pedoman ICH validasi analisis farmasi, Presisi antara ditentukan dengan menganalisis sampel yang sama pada hari yang berbeda, oleh analis yang berbeda, jika mungkin menggunakan kualitas bahan kimia yang berbeda, dan peralatan yang berbeda pada laboratorium yang sama. Parameter ini menggambarkan pengaruh kondisi eksperimental dan lingkungan yang berbeda pada variasi hasilnya (Ferenczi-Fodor *et al.*, 2001). Parameter keterulangan (*intraday precision*) sampel yang sama ditentukan pada kondisi yang sama dengan menerapkan setidaknya 6 penimbangan individu. Tes ini memberikan informasi tentang variasi yang disebabkan oleh persiapan sampel, aplikasi sampel, dan evaluasi dalam satu kali analisis dan dalam waktu singkat (Ferenczi-Fodor *et al.*, 2001). Kriteria keberterimaan parameter presisi jika %RSD \leq 2%, presisi antara \leq 3% dan keterulangan \leq 2% (Mulja dan Hanwar, 2003).

Hasil %RSD pada penetapan parameter presisi pada masing-masing sample berturut-turut yaitu 1,39% (D1) dan 1,57% (D2) dapat dilihat pada tabel 1. Sehingga data yang diperoleh pada penetapan parameter presisi memenuhi syarat keberterimaan yaitu %RSD \leq 2%. Jadi dapat disimpulkan, pada kondisi pengujian yang berbeda tidak mempengaruhi hasil percobaan.

Tabel 1. Hasil analisis parameter akurasi, presisi antara dan keterulangan dalam sampel D1 dan D2

S a m p e l	Parameter									
	Presisi (% RSD)				Keterulangan an (RSD)	Akurasi (% Recovery)				
	Hari 1	Hari 2	Hari 3	Rata- rata		Penambahan standart			Rata- rata (Recover y)	RSD
					80	100	120			
D1	1,35	1,40	1,41	1,39	1,35	107,04	105,78	106,18	106,33	2,33
D2	1,78	1,16	1,76	1,57	1,78	104,92	102,66	101,83	103,14	2,06



Gambar 2. Kromatogram A adalah sampel D1 dan kromatogram B adalah sampel D2 dengan fase diam silika GF₂₅₄, λ maksimal 416 nm dan fase gerak (kloroform:benzene:metanol = 80:15:5)

Parameter keterulangan dilakukan dengan 7 ulangan sampel dengan keberterimaan RSD yang dihasilkan kurang dari 2%. Hasil yang diperoleh pada penelitian yaitu 1,35% untuk sampel D1 dan 1,78% untuk sampel D2 (Tabel 1).

Profil kromatogram dari hasil *scanning* pada KLT Densitometri (Gambar 2) menunjukkan hasil pemisahan peak kromatogram yang sangat mirip, karena kedua sampel mengandung kurkumin. Dimana luas area (peak area) dari sampel D2 lebih besar dari D1, ini menunjukkan kadar kurkumin tiap kapsul sampel D2 lebih besar dari D1 yaitu 2,6mg (D1) 6,2mg (D2).

Dilihat dari kandungan masing-masing sampel, jumlah ekstrak yang digunakan pada sampel D1 (120 mg ekstrak rimpang kunyit) lebih besar dari ekstrak yang digunakan pada sampel D2 (75 mg ekstrak rimpang temulawak), tetapi kadar kurkumin yang diperoleh pada sampel D2 lebih besar dari kadar kurkumin pada D1. Sedangkan beberapa penelitian menyebutkan kadar kurkumin dalam ekstrak rimpang kunyit lebih besar (1,07-2,94% dan 21,69-31,97%) (Wardiyati *et al.*, 2010; Gantait *et al.*, 2011) dibandingkan kadar kurkumin dalam ekstrak rimpang temulawak (0,08-1,25% dan 22,3-30,4%) (Wardiyati *et al.*, 2010). Ini menunjukkan adanya perbedaan kadar kurkumin ekstrak rimpang kunyit dalam sampel obat herbal dengan kadar kurkumin dalam ekstrak rimpang temulawak, adanya variasi kadar kurkumin baik dalam rimpang kunyit maupun rimpang temulawak kemungkinan karena pelarut yang digunakan, proses budidaya, pasca panen, metode ekstraksi dan pemurnian yang berpengaruh terhadap kandungan kurkumin. Faktor lingkungan tumbuh juga dapat berpengaruh terhadap kandungan kurkumin (Wardiyati *et al.*, 2010).

Berdasarkan dari komposisi masing-masing sampel, sampel D1 lebih banyak ekstrak-ekstrak yang mengandung tanin yaitu Psidii Folium, Coicis Semen, Chebulae Fructus, dan Granati Pericarpium, dibandingkan pada sampel D2 yang hanya satu ekstrak saja yang mengandung tannin yaitu Polyanthi Folium, ini kemungkinan dapat menjadi alasan mengapa kadar kurkumin dalam sampel D1 lebih kecil dibandingkan sampel D2. Dengan tannin dapat mengikat dan mengendapkan pigmen (dalam hal ini kurkumin) ketika proses pembuatan larutan sampel (Okuda dan Ito, 2011). Dapat dilihat pada saat preparasi sampel, dimana endapan yang terbentuk pada sampel D1 lebih banyak dibandingkan dengan endapan yang terbentuk pada sampel D2.

4. KESIMPULAN

Metode KLT-Densitometri pada penetapan kadar kurkumin produk herbal berbasis kurkumin memenuhi syarat keberterimaan parameter akurasi, keterulangan dan presisi antara.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Dekan Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta yang memberikan dukungan pada penelitian ini.

REFERENSI

- Afifah, E. Lentera, T.(2003).*Khasiat & Manfaat Temulawak : Rimpang Penyembuh Aneka Penyakit*.Jakarta:AgroMedia Pustaka.
- BPOM.(2005).*Lampiran Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan RI, Pedoman Cara Pembuatan Obat Tradisional Yang Baik*.Jakarta:Badan POM RI.
- Ferenczi-Fodor, K. Vigh, Z. Nagy-Turak, A. (2001). Validation and Quality Assurance of Planar Chromatographic Procedures in Pharmaceutical Analysis.*Journal of AOAC International*. 84(4):1270-1271.
- Forgacs, E. Cserhati, T. (2002). Thin-Layer Chromatography of Natural Pigments: New Advances. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 25(10-11):1521–1541.
- Gantait, A. Barman, T. Mukherjee, P.K. (2011). Validated Method for Estimation of Curcumin in Turmeric Powder.*Indian J Traditional Knowledge*. 10: 247-250.
- Liang, O.B.Y. Asparton, T.W. Puspa,S. (1985). Beberapa Aspek Isolasi, Identifikasi dan Penggunaan Komponen-komponen Curcuma xanthorrhiz Roxb dan Curcuma domestica Val. In:*Prosiding Simposium Nasional Temulawak* (p. 85-92). Bandung: Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran.
- Liang, Y.Z. Xie, P. Chan, K.(2004). Quality control of herbal medicines.*Journal of Chromatography B*. 812(1-2):53–70.
- Mulja, M. Hanwar, D.(2003).Prinsip-prinsip Cara Berlaboratorium yang Baik (Good Laboratory Practice).*Majalah Farmasi Airlangga*. 3(2):71-76.
- Okuda, T. Ito, H. (2011).Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants-Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins.*Molecules*.16(3):2191-2217.
- 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*. 32(1-2):23-30.
- Rohman, A. (2012) Analysis of Curcuminoids in Food and Pharmaceutical Products.*International Food Research Journal*.19 (1):19-27.
- Sudewo, B.(2004).*Tanaman Obat Populer Penggempur Aneka Penyakit*, Jakarta:Agromedia Pustaka.
- Wardiyati, T. Rinanto, Y. Sunarni, T. Azizah, N. (2010) Identifikasi Hasil dan Kurkumin pada *Curcuma xanthorrhiza* dan *Curcuma domestica* Hasil Koleksi di Jawa dan Madura.*Agrivita*. 32(1):1-11.

Zhang, J.S. Guan, J. Yang, F.Q. Liu, H.G. Cheng, X.J. Li, S.P.(2008). Qualitative and Quantitative Analysis of Four Species of *Curcuma Rhizomes* Using Twice Development Thin Layer Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.48:1024–1028.