



## Validasi Metode *Ultra High Performance Chromatography Double Mass Spectrometry* (UHPLC-MS/MS) untuk Analisis Kurkumin pada Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma longa*) dengan Berbagai Perbandingan

Bachtiar Rifai Pratita Ihsan\*, Ika Putri Nurhayati, Intan Maysaroh

Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

### INFO ARTIKEL

#### Sejarah artikel:

Penerimaan naskah:

2 November 2018

Penerimaan naskah

revisi: 18 Desember

2018

Ditetujui untuk

dipublikasikan: 30

Desember 2018

#### Kata kunci :

Kurkumin, kunyit,  
*Curcuma longa*,  
UHPLC-MS/MS,  
validasi metode

### ABSTRAK

Kunyit (*Curcuma longa*) merupakan salah satu tanaman herbal yang banyak dimanfaatkan untuk mengobati beberapa penyakit di masyarakat. Senyawa yang terkandung dalam kunyit dan berperan dalam aktivitas farmakologi tersebut adalah kurkumin. Pada penelitian ini dilakukan maserasi kunyit dengan menggunakan 3 konsentrasi pelarut etanol yang berbeda, yaitu etanol 70%, etanol 80% dan etanol 96%. Ekstrak yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan instrumen UHPLC-MS/MS yang dioperasikan menggunakan fase diam C18 dan fase gerak 0,1% asam format dalam aquabidest dan 0,1% asam format dalam asetonitril. Parameter validasi metode yang diuji dalam penelitian ini adalah selektivitas, linieritas, akurasi, presisi dan LOD LOQ. Puncak kurkumin yang muncul pada kromatogram larutan baku kurkumin, larutan sampel ekstrak etanol kunyit 96%; 80%; dan 70% secara berturut-turut muncul pada 3,195; 3,202; 3,220 dan 3,214 menit. Kurva konsentrasi larutan standar kurkumin terhadap area didapatkan hasil yang linier, dengan rentang konsentrasi 0,25 hingga 4 ppm ( $r^2 = 0,999$ ). Nilai % akurasi yang didapatkan adalah mulai dari 97,54% hingga 106,38% dan didapatkan nilai RSD mulai dari 1,09% hingga 4,37%. Nilai LOD dan LOQ yang didapatkan berturut-turut adalah 0,03 ppm dan 0,08 ppm. Nilai kadar kurkumin yang terkandung dalam sampel ekstrak etanol 96%; 80% dan 70% berturut-turut adalah  $17,64 \pm 2,10$  %;  $16,99 \pm 2,49$  % dan  $7,73 \pm 4,95$  %. Dari uji *one way* ANOVA didapatkan nilai  $p < 0,01$  dan uji *post hoc* tukey didapatkan nilai  $p < 0,01$ . Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode UHPLC-MS/MS yang dilakukan telah memenuhi parameter validitas yang baik dan berbagai perbandingan konsentrasi etanol yang digunakan berpengaruh terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak.

## Method Validation of *Ultra High Performance Chromatography-Double Mass Spectrometry* (UHPLC-MS/MS) for Analysis of Curcumin in Ethanol Extract of Turmeric (*Curcuma longa*) with Various Comparisons

### Keywords:

Curcumin,  
turmeric, *Curcuma*  
*longa*, UHPLC-  
MS/MS, method  
validation

### ABSTRACT

Turmeric is a plant widely consumed by people to treat some diseases. Curcumin is the major compound in turmeric and perform some pharmacological activities. The aim of this study is to understand the influence of different ethanol concentration towards curcumin content in the extract. Maceration of turmeric was done using three different ethanol concentration which is 96%; 80% and 70%. The extract obtained from maceration was analyzed with UHPLC-MS/MS performing on a C18 column using isocratic elution of 0,1% formic acid in aquabidest and 0,1% formic acid in acetonitrile. The parameter of method validation which analyzed in this research were selectivity, linearity, accuracy, precision and LOD LOQ. The peaks of curcumin in the curcumin standard solution, turmeric ethanol extract 96%; 80% and 70% occurred at 3,195; 3,202; 3,220 and 3,214 min respectively. The curcumin content and peak area was linear at the concentration rate 0,25 - 4 ppm ( $r^2 = 0,999$ ). Accuracy of this analysis was in between 97,54%-106,38% and precision of this analysis was in between 1,09%-4,37%. The value of LOD and LOQ in this analysis was 0,03 and 0,08 ppm respectively. The result of curcumin content measurement in sample ethanol extract 96%; 80%; and 70% are  $17,64 \pm 2,10$  %;  $16,99 \pm 2,49$  % and  $7,73 \pm 4,95$  % respectively. The result of one way ANOVA analysis is  $p < 0,01$  and the result of *post hoc* Tukey is  $p < 0,01$ . Thus, the conclusion is UHPLC-MS/MS method for determination of curcumin in turmeric extract was valid and the ethanol concentration of maceration solvent have an influence to curcumin content in the extract.

## 1. Pendahuluan

Sebagian besar masyarakat memilih penggunaan obat herbal untuk terapi berbagai macam penyakit daripada penggunaan obat konvensional. Data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013, menunjukkan bahwa 30,4% rumah tangga di Indonesia memanfaatkan pelayanan kesehatan tradisional, diantaranya 77,8% rumah tangga memanfaatkan jenis pelayanan kesehatan tradisional keterampilan tanpa alat, dan 49,0% rumah tangga memanfaatkan ramuan.<sup>1</sup>

Sebagian produk obat tradisional mengandung kunyit. Kunyit merupakan tanaman herbal yang banyak dimanfaatkan untuk mengobati beberapa penyakit di masyarakat. Kunyit dimanfaatkan sebagai pengobatan beberapa penyakit, seperti dispepsia, penyakit rematik (*rheumatoid arthritis*), tukak lambung, epilepsi, asma, batuk, sakit kepala, gangguan hepar, dan lain-lain.<sup>2</sup>

Ekstraksi merupakan teknik pemisahan zat atau senyawa yang terkandung di jaringan tanaman atau hewan menggunakan pelarut yang terpilih melalui sebuah prosedur standar. Tujuan dari ekstraksi adalah untuk memisahkan metabolit yang larut dalam pelarut tertentu dengan metabolit yang tidak larut dalam pelarut. Metode maserasi memiliki keunggulan dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya yaitu prosedurnya sederhana dan mudah dilakukan.<sup>3</sup> Berbagai macam pelarut dapat digunakan dalam metode maserasi kunyit seperti air, aseton, metanol, etanol dan petroleum eter.<sup>4</sup> Pelarut maserasi yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol. Pemilihan pelarut didasarkan pada kelarutan kurkumin. Kurkumin bersifat mudah larut pada etanol.<sup>5</sup> Pemilihan pelarut etanol juga didasarkan pada data keamanan pelarut. Etanol memiliki data toksisitas yang lebih kecil dibandingkan dengan aseton dan petroleum eter.<sup>6</sup> Senyawa marker dari kunyit adalah kurkumin.<sup>7</sup> Pengukuran kadar senyawa marker merupakan salah satu parameter spesifik standarisasi ekstrak.<sup>8</sup> Senyawa marker merupakan senyawa penanda dalam analisis untuk menjamin kualitas dan aktivitas biologis. Konsentrasi kurkumin dari hasil ekstrak dapat diketahui dengan beberapa metode analisa, yaitu KLT Densitometer, Kromatografi Gas, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan Spektrofotometer UV.<sup>9-12</sup> Teknik UHPLC-MS/MS dipilih karena memiliki kelebihan dibandingkan dengan teknik kromatografi yang lain. Teknik UHPLC-MS/MS bersifat efisien, sangat selektif memisahkan campuran ion berdasarkan rasio massa dibandingkan muatan yang dapat memberikan informasi ion fragmen dari suatu struktur kimia, sangat sensitif, hanya memerlukan sampel berjumlah sedikit, dan dapat digunakan untuk analisa kuantitatif.<sup>13</sup>

Pada penelitian ini dilakukan maserasi kunyit dengan menggunakan 3 konsentrasi pelarut etanol yang berbeda, yaitu etanol 70%, etanol 80% dan etanol 96%. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui validitas metode UHPLC MS/MS dalam analisa kurkumin pada ekstrak etanol kunyit dan untuk mengetahui pengaruh penggunaan perbedaan konsentrasi pelarut etanol dalam maserasi kunyit terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak.

## 2. Metode

### Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel serbuk kunyit (Materia Medika Batu), etanol teknis konsentrasi 70%, 80% dan 96%, standar kurkumin TCI (*Tokyo Chemical Industry*), metanol *pro HPLC*, asam format *pro HPLC* 0,1 % dalam aquabidest *pro HPLC*, dan asam format *pro HPLC* 2% dalam asetonitril *pro HPLC* (Merck).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitis (Shimadzu AUW 220), pengaduk magnetik (IKA RW 20 digital), *rotary evaporator* (IKA RV 10 Basic), oven (Mettler UN 50), mikrotube, mikropipet 2-20µl (BOECO), sentrifuge (Orcgon LC-04S), membran filter (AGILENT econoflter), sonikator (DAWE), kolom 50mm x 2.1mm x 1.7µm (Kinetex EVO C18 1000A) dan UHPLC (ACCELLA type 1250).

### Maserasi Kunyit

Serbuk kunyit ditimbang sebanyak 50 gram kemudian ditambahkan 300 ml pelarut ekstraksi. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi terdapat 3 macam pelarut yaitu etanol 70%, etanol 80% dan etanol 96% (pelarut teknis). Larutan ekstrak kemudian diaduk dengan pengaduk magnetik dengan kecepatan 226 rpm selama 1 jam. Larutan ekstrak kemudian direndam dalam wadah tertutup selama 24 jam. Larutan ekstrak kemudian disaring, filtrat dipisahkan dan disimpan pada wadah tertutup. Kemudian dilakukan remaserasi pada residu ekstrak sebanyak 2 kali. Kemudian dilakukan penguapan pelarut dari filtrat yang didapatkan menggunakan *rotary evaporator* (suhu = 40° C) dan menggunakan oven (suhu = 40° C).

### Kondisi Operasi UHPLC MS/MS

Fase gerak yang digunakan pada analisis digunakan 2 macam campuran fase gerak dengan metode elusi gradien. Fase gerak A terdiri dari 0,1% asam format *pro HPLC* dalam aquabidest *pro HPLC*, fase B terdiri dari 0,1% asam format *pro HPLC* dalam asetonitril *pro HPLC*. Kecepatan fase gerak adalah 300 µl/menit dengan pengaturan perbandingan pemberian fase gerak seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Kondisi Fase Gerak UHPLC-MS/MS

No.	Waktu (menit ke)	A%	B%	µl/min
0	0.00	75.0	25.0	300.0
1	0.50	75.0	25.0	300.0
2	3.00	25.0	75.0	300.0
3	4.00	25.0	75.0	300.0
4	4.50	75.0	25.0	300.0
5	6.00	75.0	25.0	300.0

Kolom dikontrol pada suhu 30° C, dan kompartemen *autosampler* ditetapkan untuk 16° C. Penggunaan MS/MS Triple Q (*quadrupole*) spektrometer massa (Thermo Finnigan TSQ QUANTUM ACCESS MAX) dengan sumber ionisasi ESI (*Electrospray Ionization*) dikendalikan oleh *software* TSQ Tune yang dioperasikan dengan ionisasi mode positif. Penentuan senyawa yang ditarget dengan metode SRM (*Selecterd Reaction Monitoring*) diatur seperti

pada Tabel 2. Kondisi ionisasi ESI meliputi tegangan spray 3kV, suhu penguapan 275°C, suhu kapiler 300°C, nitrogen sebagai *sheath gas pressure* 40 psi, dan *aux gas pressure* 10 psi dengan gas argon.

**Tabel 2.** Optimasi Parameter Massa untuk Kurkumin

Komponen	Parent mass (m/z)	Product mass (m/z)	
		Qualifier	Quantifier
Kurkumin	369	177	285

### Preparasi Larutan Baku Standar dan Preparasi Larutan Sampel

Standar kurkumin dibuat dalam konsentrasi dalam konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dilakukan sonikasi selama 10 menit dan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipipet sebanyak 10 µl, larutan diencerkan lagi dengan metanol hingga 1000 µl dan didapatkan konsentrasi larutan baku sebesar 10 ppm. Larutan baku 10 ppm kemudian diencerkan melalui pengenceran bertingkat menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 4; 2; 1; 0,5; dan 0,25 ppm. Larutan kemudian disaring menggunakan filter berukuran pori 0,2 µm.

Sampel ekstrak etanol 70%; 80% dan 96% ditimbang dengan 3 kali pengulangan (3 kali replikasi). Sasaran penimbangan ±100 mg. Sampel dilarutkan pada 10 ml metanol. Kemudian dilakukan sonikasi selama 10 menit dan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipipet sebanyak 100 µl, larutan ditambah metanol 1000 µl. Kemudian larutan diencerkan lagi sebanyak dua kali (dipipet sebanyak 100 µl dan ditambah metanol 1000 µl). Larutan kemudian disaring menggunakan filter berukuran pori 0,2 µm.

### Validasi Metode

Validasi metode yang dilakukan pada penelitian ini meliputi selektivitas, linieritas, akurasi, presisi, LOD (*Limit of Detection*) dan LOQ (*Limit of Quantification*) sesuai prosedur menurut ICH (*International Council for Harmonisation*).<sup>15</sup>

### Selektivitas

Larutan standar dan larutan sampel diinjeksikan sebanyak 2 µl pada sistem UHPLC MS/MS. Kemudian diamati waktu retensi antara larutan standar dan larutan sampel. Selektivitas juga ditentukan melalui penargetan senyawa dalam metode SRM.

### Linieritas

Larutan standar kurkumin dengan konsentrasi 0,25; 0,5; 1; 2; dan 4 µg/ml diinjeksikan sebanyak 2 µl pada sistem UHPLC MS/MS. Luas area puncak yang muncul kemudian diplotkan terhadap konsentrasi larutan standar kurkumin. Kemudian ditentukan nilai persamaan garis linier, koefisien korelasi ( $r^2$ ) dan koefisien variasi dari fungsi ( $V_{x_0}$ ).

### Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantification (LOQ)

Larutan baku kurkumin dengan konsentrasi 0,25;

0,5; 1; 2; dan 4 µg/ml diinjeksikan sebanyak 2 µl pada sistem UHPLC MS/MS. Luas area puncak yang muncul kemudian dihitung nilai simpangan baku respon analitis (Sy) dan kemudian dihitung nilai LOD dan nilai LOQ.

### Akurasi dan Presisi

Larutan standar kurkumin dengan konsentrasi 0,25; 0,5; 1; 2; dan 4 µg/ml diinjeksikan sebanyak 2 µl pada sistem UHPLC MS/MS (dilakukan 3 kali penginjeksian pada setiap larutan standar kurkumin). Luas area puncak yang muncul dimasukkan ke persamaan garis regresi linear. Kemudian dihitung persen perolehan kembali dan RSD-nya.

### Pengukuran Kadar Sampel

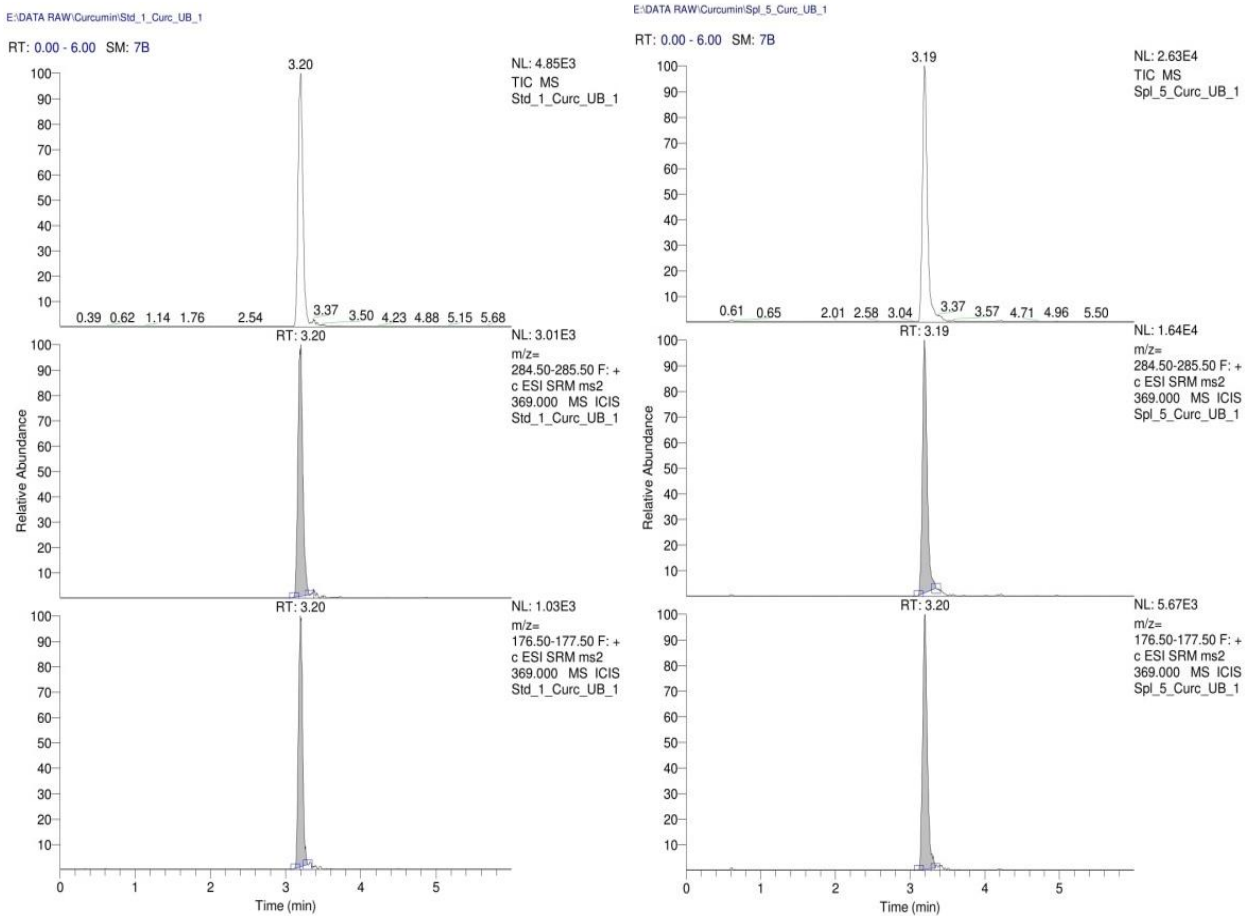
9 larutan sampel (yaitu larutan sampel ekstrak etanol 96%; 80% dan 70%) diinjeksikan sebanyak 2 µl pada sistem UHPLC MS/MS (diinjeksikan 5 kali). Luas area puncak yang muncul dimasukkan ke persamaan garis regresi linear. Kemudian dihitung kadar kurkumin dalam sampel. Nilai kadar kurkumin yang didapatkan dianalisis menggunakan uji *one way* (ANOVA).

## 3. Hasil dan Diskusi

### Validasi Metode

Pada penelitian ini dilakukan maserasi kunyit dengan menggunakan 3 konsentrasi pelarut etanol yang berbeda, yaitu etanol 70%, etanol 80% dan etanol 96%. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui validitas metode UHPLC MS/MS dalam analisa kurkumin pada ekstrak etanol kunyit menggunakan fase diam C18 dan fase gerak 0,1% asam format dalam aquabidest dan 0,1% asam format dalam asetonitril dan untuk mengetahui pengaruh penggunaan perbedaan konsentrasi pelarut etanol dalam maserasi kunyit terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak. Ekstrak yang didapatkan ditetapkan kadarnya menggunakan instrumen UHPLC-MS/MS. Sebelum penetapan kadar, dilakukan validasi metode terlebih dahulu. Tujuan dari validasi metode adalah untuk menjamin metode analisis dapat dipercaya, bermutu, dan konsisten sesuai tujuan penggunaannya.<sup>15</sup>

Parameter validasi meliputi selektivitas, linieritas, LOD, LOQ, Akurasi dan presisi. Selektivitas adalah kemampuan untuk membedakan analit di dalam sampel yang terdapat komponen lain seperti pengotor, produk degradasi, dan komponen matriks.<sup>15</sup> Dapat dilihat pada tabel 3, bahwa waktu retensi antara standar kurkumin dan analit kurkumin dalam sampel sama. Selain itu, selektivitas juga ditentukan dari parameter massa yang ditarget dalam metode SRM UHPLC MS/MS. Penentuan senyawa yang ditarget (senyawa kurkumin) dilakukan dengan metode SRM, di mana senyawa kurkumin standar yang ditargetkan memiliki massa molekul (m/z) 369, dengan target massa *quantifier* 285 dan massa *qualifier* 177 merupakan massa molekul dari fragmen ion utama kurkumin. Target massa *quantifier* dan massa *qualifier* untuk kurkumin juga serupa



**Gambar 1.** (Dari kiri ke kanan) Kromatogram Larutan Standar Kurkumin 2,5 µg/ml dan Kromatogram Larutan Sampel Ekstrak Etanol 96%

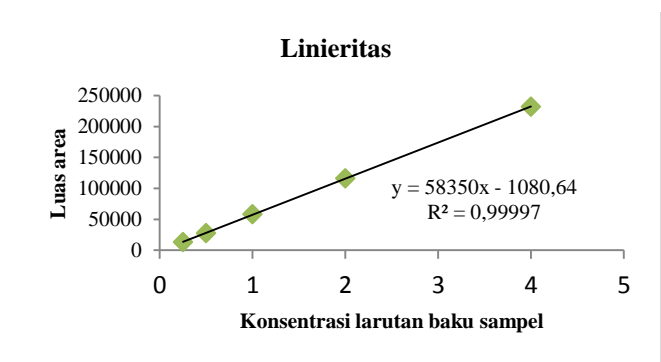
dengan penelitian kurkumin oleh Liu *et al.*<sup>14</sup> Keterangan mengenai nilai *m/z* yang ada pada kromatogram larutan standar dan sampel dapat dilihat pada Gambar 1.

Linieritas merupakan kemampuan memperoleh hasil uji yang proporsional terhadap konsentrasi dari analit pada sampel pada rentang yang diberikan. Derajat linieritas suatu data dilihat dari koefisien korelasi (*r*<sup>2</sup>). Nilai *r*<sup>2</sup> yang lebih dari 0,998 dinilai telah sesuai atau merupakan nilai yang diperbolehkan dari data regresi linear.<sup>16</sup> *International Conference on Harmonisation (ICH)* memberikan ketentuan untuk uji linieritas, bahwa minimum digunakan 5 konsentrasi yang berbeda<sup>15</sup>. Pada penelitian ini telah digunakan 5 konsentrasi yang berbeda yaitu 0,25; 0,5; 1; 2; dan 4 ppm. Luas area yang muncul pada kromatogram kemudian diplotkan terhadap nilai konsentrasi yang diinjeksikan dan didapatkan persamaan garis linear  $y=58350x - 1080,64$ ; dengan nilai koefisien korelasi (*r*<sup>2</sup>) sebesar 0,99997, yang sesuai dengan persyaratan yang diperbolehkan. Gambar grafik linieritas standar kurkumin dapat dilihat pada Gambar 2.

LOD atau batas deteksi adalah konsentrasi terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi oleh instrumen. LOQ atau batas kuantifikasi adalah konsentrasi terendah dalam sampel yang masih dapat diukur oleh instrumen.<sup>15</sup>

**Tabel 3.** Waktu Retensi Rata-Rata dari Larutan Standar dan Sampel

Larutan	Rata-Rata Waktu Retensi (menit)
Baku Standar Kurkumin	3,195
Sampel ekstrak etanol 96%	3,201
Sampel ekstrak etanol 80%	3,220
Sampel ekstrak etanol 70%	3,214



**Gambar 2.** Grafik Linieritas

Pada penelitian ini ditentukan nilai LOD LOQ melalui metode perhitungan. LOD dan LOQ dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (*slope*) kurva baku.<sup>15</sup> Berdasar hasil perhitungan, didapatkan nilai LOD adalah 0,035 ppm dan

nilai LOQ adalah 0,117 ppm. Rumus perhitungan LOD dan LOQ adalah sebagai berikut:

$$LOD = \frac{Sy}{b} \times 3 \quad LOQ = \frac{Sy}{b} \times 10$$

$$Sy = \sqrt{\frac{\sum(y - yi)^2}{n - 2}}$$

- Keterangan:  
 b : slope persamaan regresi  
 Sy : simpangan baku respon analitik  
 y : nilai area yang muncul di detektor  
 yi : nilai area didapat dari persamaan garis regresi  
 n : jumlah variabel konsentrasi yang digunakan

Akurasi menyatakan kedekatan antara nilai yang terukur (baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan) dengan nilai yang diterima. Presisi adalah ukuran dari keterulangan metode analisis antara beberapa pengujian pengukuran yang didapat dari beberapa sampel yang homogeny.<sup>15</sup>

Akurasi dan presisi dilakukan dengan penginjeksian larutan baku standar. Terdapat 3 level konsentrasi dan setiap konsentrasi larutan dilakukan injeksi sebanyak 3 kali. Dari setiap area yang muncul, kemudian dihitung konsentrasi terhitungnya melalui persamaan garis linier. Kemudian ditentukan nilai %akurasi dan %RSD melalui perhitungan. Dari hasil perhitungan, didapatkan rata-rata nilai % perolehan kembali sebesar 100,90% dan rata-rata nilai %RSD adalah 2,82%. Hasil perhitungan dari akurasi dan presisi yang didapatkan dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Nilai Akurasi dan Presisi Larutan Baku Standar

No	Kons. (µg/mL)	(Area)	Kons terhitung (µg/mL)	% Recovery	% RSD
1	0,25	13.148,49	0,244	97,54	4,37
		13.665,98	0,253	101,09	
		14.437,89	0,266	106,38	
2	0,5	27.797,07	0,495	98,98	2,92
		29.496,74	0,524	104,81	
		28.365,93	0,505	100,93	
3	1,00	57.878,01	1,010	101,04	2,49
		60.062,49	1,048	104,79	
		57.235,18	0,999	99,94	
4	2,00	115.899,66	2,005	100,24	3,48
		111.790,43	1,934	96,72	
		119.923,34	2,074	103,69	
5	4,00	232.087,82	3,996	99,90	1,09
		227.428,02	3,916	97,90	
		231.414,46	3,984	99,61	

Pada penelitian ini digunakan konsentrasi larutan baku standar yang berkisar pada 1 µg/ml, sehingga nilai persen *recovery* yang diperbolehkan adalah 75-120% dan nilai RSD maksimum yang diperbolehkan adalah 8%.

Rentang persen *recovery* dan rentang nilai RSD maksimum yang diperbolehkan oleh AOAC *Guideline*.<sup>17</sup> dapat dilihat pada Tabel 5.

Dari hasil perhitungan, didapatkan nilai %akurasi mulai dari 97,54% hingga 106,38% dan didapatkan nilai RSD mulai dari 1,09% hingga 4,37%. Hal ini berarti nilai akurasi dan presisi yang ada telah memenuhi persyaratan.

**Tabel 5.** Rentang Persen Recovery dan Rentang Nilai RSD Maksimum

Konsentrasi (%)	Recovery limits (%)	RSD (%)
100	98-101	1
10	95-102	1,5
1	92-105	2
0,1	90-108	3
0,01	85-110	4
10 µg/g (ppm)	80-115	6
1 µg/g	75-120	8
10 µg/kg (ppb)	70-125	15

**Penetapan Kadar Sampel Ekstrak**

Sebanyak 9 larutan sampel ekstrak (ekstrak etanol 96%; 80%; dan 70%, masing-masing 3 replikasi), diinjeksikan ke dalam sistem UHPLC MS/MS sebanyak 2 µl. Luas area yang muncul dimasukkan ke persamaan garis regresi linear. Kemudian dihitung kadar kurkumin dalam sampel. Didapatkan nilai kadar kurkumin yang terkandung dalam sampel ekstrak 96%; 80% dan 70% berturut-turut adalah 17,64 ± 2,10 %; 16,99 ± 2,49 % dan 7,73 ± 4,95%.

Didapatkan nilai kadar kurkumin yang terkandung dalam sampel ekstrak 96%; 80% dan 70% berturut-turut adalah 17,64 ± 2,100 %; 16,99 ± 2,494 % dan 7,73 ± 4,950%. Berdasarkan data kelarutan, kurkumin sukar larut dalam air. Kelarutan kurkumin dalam air adalah 3,12 mg/L pada suhu 25° C. Kurkumin sukar larut eter, mudah larut alkohol dan asam asetat<sup>5</sup>. Karena kandungan etanol dalam etanol 96% > etanol 80% > etanol 70%, maka kurkumin akan mudah larut dalam etanol 96%, sehingga kandungan kurkumin yang ada dalam ekstrak etanol 96% lebih besar dari kandungan kurkumin dalam ekstrak etanol 80% dan ekstrak etanol 70%.

Data kadar kurkumin yang didapatkan kemudian dilakukan analisis menggunakan software IBM SPSS 20. Uji normalitas dari data kadar kurkumin dilakukan dengan menggunakan uji Shapiro-wilk, karena jumlah data sampel yang ada kurang dari 50. Uji normalitas dari data kadar kurkumin sampel didapatkan hasil dengan nilai p<0,01 yang berarti distribusi data tidak normal. Kemudian dilakukan transformasi data menggunakan fungsi Z score dan SD norm, dan hasil uji normalitas dari transformasi data tersebut didapatkan hasil dengan nilai p=0,924 yang berarti distribusi data normal. Uji homogenitas dari data hasil transformasi dilakukan dengan uji Levene test dan didapatkan hasil dengan nilai p=0,793 yang berarti data homogen.

Kemudian dilakukan uji *one way ANOVA* untuk menentukan adakah pengaruh antara perbedaan konsentrasi etanol terhadap kadar kurkumin. Hasil uji didapatkan nilai p<0,01 yang berarti terdapat pengaruh penggunaan perbedaan konsentrasi pelarut etanol dalam maserasi kunyit terhadap kadar kurkumin dalam ekstrak. Kemudian dilakukan uji *post-hoc* tukey untuk mengetahui kelompok

mana yang berbeda secara bermakna. Hasil uji didapatkan nilai  $p < 0,01$  dari semua perbandingan kelompok (antara kelompok sampel ekstrak 96%-80%; 96%-70%, dan 80%-70%) yang berarti setiap kelompok berbeda secara bermakna dibandingkan dengan kelompok lain.

#### 4. Daftar Pustaka

1. Aditama T.Y. 2014. *Jamu dan Kesehatan*. Jakarta: Lembaga Penerbit Balitbangkes.
2. World Health Organization, 1999. *WHO monographs on selected medicinal plants Vol 1*. Malta : WHO graphic.
3. Azwanida. *A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Strength and Limitation*. Journal of Medicinal & Aromatic Plants. 2015; Vol. 4: 1-6.
4. Jansirani D., Saradha R., Salomideborani N., dan Selvapriyadharsini J. *Comparative evaluation of various extraction methods of curcuminoids from Curcuma longa*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Science. 2014; 286-288.
5. NCBI. *PubChem Compound Database; CID=969516*, (Online). (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/969516> , diakses 29 April 2018).
6. Material Safety Data Sheet. 2013. *Ethyl alcohol 200 Proof MSDS*, (Online). (<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9923955>, diakses 08 Agustus 2018).
7. Priyadarsini K.I. *The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent*. Journal Molecules. 2014: 20112-20112.
8. Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
9. Hafid, A. F., Rifai, B., Tumewu, L., Widiastuti, E., Dachliyati, L. Primaharinastiti, R., and Widayawaruyanti, A. *Andrographolide determination of Andrographispaniculata extracts, ethyl acetate fractions and tablet by thin layer chromatography*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2015: 557-561.
10. Braga M. E. M., Leal P. F., Carvalho J. E., dan Meireles M. A. A. *Comparison of Yeild, Composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (Curcuma longa L.) Extracts Obtained Using Various Techniques*. Journal Agricultural Food Chemistry. 2003; Vol. 51(22): 6604-6611.
11. Paulucci V. P., Couto R. O., Teixeira C. C. C., dan Freitas L. A. P. *Optimization of the extraction of curcumin from Curcuma longa Rhizomes. Brazilian*. Journal of Pharmacognosy. 2013; Vol. 23(1): 94-100.
12. Anindya B., Anusree R., Prosenjit M., dan Tausif A. *Curcumin Extraction : Best Solvent on the Basis of Spectrophotometric Analysis*. Universal Journal of Pharmacy. 2015; Vol. 04(2): 48-52.
13. Kazakevich, Y., and LoBrutto, R., 2007. *HPLC For Pharmaceutical Scientist*, New Jersey: Wiley & Sons, Inc.
14. Liu, F. *Discriminating from species of Curcumae Radix (Yujin) by a UHPLC/Q - TOFMS - based metabolomics approach*. Journal of Chinese Medicine. 2016; Vol 11: 1 – 11.
15. International Council for Harmonisation, 2005. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(r1)*. (Online). ([https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf), diakses tanggal 15 Mei 2018).
16. Christian G.D., Dasgupta P.K.S., dan Schug K.A., 2014. *Analytical Chemistry seventh edition*. John Wiley & Sons Ltd.
17. AOAC Guidelines. 2012. *Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals*. (Online). (<https://www.aoac.org/>, diakses tanggal 14 Agustus 2018).