

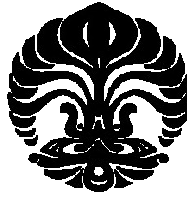
UNIVERSITAS INDONESIA

**VALIDASI METODE ANALISIS KURKUMIN DALAM
PLASMA *IN VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI**

SKRIPSI

**LOEDFIASFIATI ADAWIYAH
0706264803**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**VALIDASI METODE ANALISIS KURKUMIN DALAM
PLASMA *IN VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Farmasi**

**LOEDFIASFIATI ADAWIYAH
0706264803**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
DEPOK
JULI 2011**

ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Loedfiasfiati Adawiyah

NPM : 0706264803

Tanda Tangan : 

Tanggal : 11 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Loedfiasfiati Adawiyah
NPM : 0706264803
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Validasi Metode Analisis Kurkumin dalam Plasma
In Vitro secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS. Apt. (.....)

Pembimbing II: Dra. Maryati Kurniadi, M.Si., Apt. (.....)

Penguji I : Dr. Arry Yanuar, M.Si., Apt. (.....)

Penguji II : Dr. Berna Elya, M.Si, Apt. (.....)

Penguji III : Santi Purna Sari, M.Si, Apt. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 11 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Skripsi dengan judul Validasi Metode Analisis Kurkumin dalam Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi Program Studi Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Pada penyelesaian skripsi ini, penulis mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan mengarahkan, yaitu kepada:

1. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI dan pembimbing I yang telah menyediakan waktu untuk memberikan bimbingan, saran, bantuan, serta dukungan moril kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Dra Maryati Kurniadi, M.Si., selaku pembimbing II yang telah menyediakan waktu untuk memberikan bimbingan, saran, bantuan, serta dukungan moril kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Dr. Iskandarsyah, MS. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di program S1 Reguler Farmasi UI.
4. Rina Rahmawati, S.Farm, Apt. selaku Manajer Teknis, Krisnasari Dianpratami, S.Farm, Apt. selaku Manajer Administrasi, dan Utami Pravitasari, S.Si selaku Supervisor Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI; Ibu Sri Teguh Rahayu, Apt., Mba Wulan, dan Pak Rustam atas saran, bantuan, arahan, bimbingan, semangat dan perhatian yang diberikan kepada penulis selama penelitian.
6. PT. Sydna Farma, PT. Ikapharmindo Putramas Pharmaceutical Laboratories dan Clinisindo yang telah memberikan bantuan bahan baku zat baku dalam kepada penulis.

7. Keluarga tercinta yaitu Mama, Abi, Mega, Ica dan Bibi atas segala kasih sayang, do'a, semangat, dukungan moril dan materil, dan pengorbanan yang tiada terkira kepada penulis.
8. Rangga Nimamulla atas kesediaannya mendengar keluhan penulis, memberikan semangat, saran, bantuan, dan dukungan moril kepada penulis.
9. Rekan-rekan penelitian di Laboratorium Analisis Instrumen Departemen Farmasi FMIPA UI, dan Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI. Terima kasih untuk segala dukungan, bantuan, kerjasama, dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.
10. Wulan, Anis, Yoyo, Maya, Kun, Noor, Tari, Dias, Ami, Keluarga Farmasiku, dan teman-teman Farmasi S1 reguler angkatan 2007, yang telah memberikan warna selama penulis menempuh pendidikan di program S1 Reguler Farmasi UI.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan dukungannya selama penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penelitian dan penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Loedfiasfiati Adawiyah
NPM : 0706264803
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Validasi Metode Analisis Kurkumin dalam Plasma *In Vitro*
secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 11 Juli 2011

Yang menyatakan



(Loedfiasfiati Adawiyah)

ABSTRAK

Nama : Loedfiasfiati Adawiyah
Program studi : Farmasi
Judul : Validasi Metode Analisis Kurkumin dalam Plasma *In Vitro*
secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kurkumin merupakan senyawa fenol yang umumnya terdapat pada rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.) dari famili Zingiberaceae. Senyawa ini mempunyai aktivitas biologis sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Penelitian menunjukkan bahwa kurkumin dapat mencegah kanker dan penyakit kronis lainnya. Kadar kurkumin dalam plasma perlu diukur dan dipantau, sehingga keamanan, dosis dan efikasi dari penggunaan kurkumin sebagai pencegah kanker dapat dipastikan. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh kondisi optimum dan metode yang tervalidasi untuk analisis kurkumin dalam plasma *in vitro*. Metode analisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor UV telah dikembangkan dan dioptimasi untuk analisis kurkumin dalam plasma manusia *in vitro*. Kurkumin diekstraksi dari plasma dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat-metanol (95:5). Analisis dilakukan dengan teknik isokratik pada kolom C₁₈ fase terbalik Kromasil[®] 100-5 (250 x 4,6 mm, 5µm) dan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) pada laju alir 1,0 mL/menit. Baku dalam yang digunakan adalah irbesartan. Deteksi dilakukan pada panjang gelombang 420 nm untuk kurkumin dan 250 nm untuk irbesartan. Pada rentang konsentrasi 20,60 – 4120,00 ng/mL dihasilkan kurva kalibrasi yang linier dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9999. Akurasi (% *diff*) dari metode ini berada diantara -11,97% sampai 14,59% dengan nilai presisi (KV) antara 1,17% sampai 8,51%, dan uji perolehan kembali relatif antara 88,03% sampai 114,59%.

Kata kunci: Kurkumin, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Plasma *In Vitro*, Irbesartan.

xiv+112 halaman: 20 gambar; 22 tabel; 11 lampiran

Daftar acuan: 33 (1985-2010)

ABSTRACT

Name : Loedfiasfiati Adawiyah
Program study : Pharmacy
Title : Analytical Method Validation of Curcumin in Plasma *In Vitro*
using High Performance Liquid Chromatography

Curcumin is a phenol compound commonly found in turmeric (*Curcuma longa* L.) family Zingiberaceae. These compounds have biological activity as anti-inflammatory and antioxidant. Research showed that curcumin can prevent cancer and other chronic diseases. The levels of curcumin in the plasma needs to be quantified and monitored, so that the safety, dosage and efficacy of the use of curcumin as a cancer preventer can be ascertained. The aim of this study was to obtain the optimum conditions and validated methods for analysis of curcumin in plasma *in vitro*. The method of analysis using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV detector has been developed and optimized for analysis of curcumin in human plasma *in vitro*. Curcumin was extracted from plasma by liquid-liquid extraction method using ethyl acetate-methanol (95:5). The analysis was done by using isocratic technique on reverse phase C₁₈ column Kromasil[®] 100-5 (250 x 4,6 mm, 5µm) and mobile phase consisted acetonitrile-methanol-aquabidest-acetic acid (33:20:46:1) at a flow rate of 1,0 mL/min. Irbesartan used as internal standard. Detection at a wavelength of 420 nm and 250 nm for curcumin to irbesartan. Linearity was established for range concentration of 20,60 - 4120,00 ng/mL with correlation coefficient (r) of 0,9999. Accuracy (% *diff*) of this method is between -11,97% to 14,59% with precision (CV) between 1,17% to 8,51%, and test the relative recovery between 88,03% to 114,59% .

Keywords: Curcumin, High Performance Liquid Chromatography, Plasma *In Vitro*, Irbesartan.

xiv+112 pages: 20 figure; 22 table; 11 appendices

Bibliography: 33 (1985-2010)

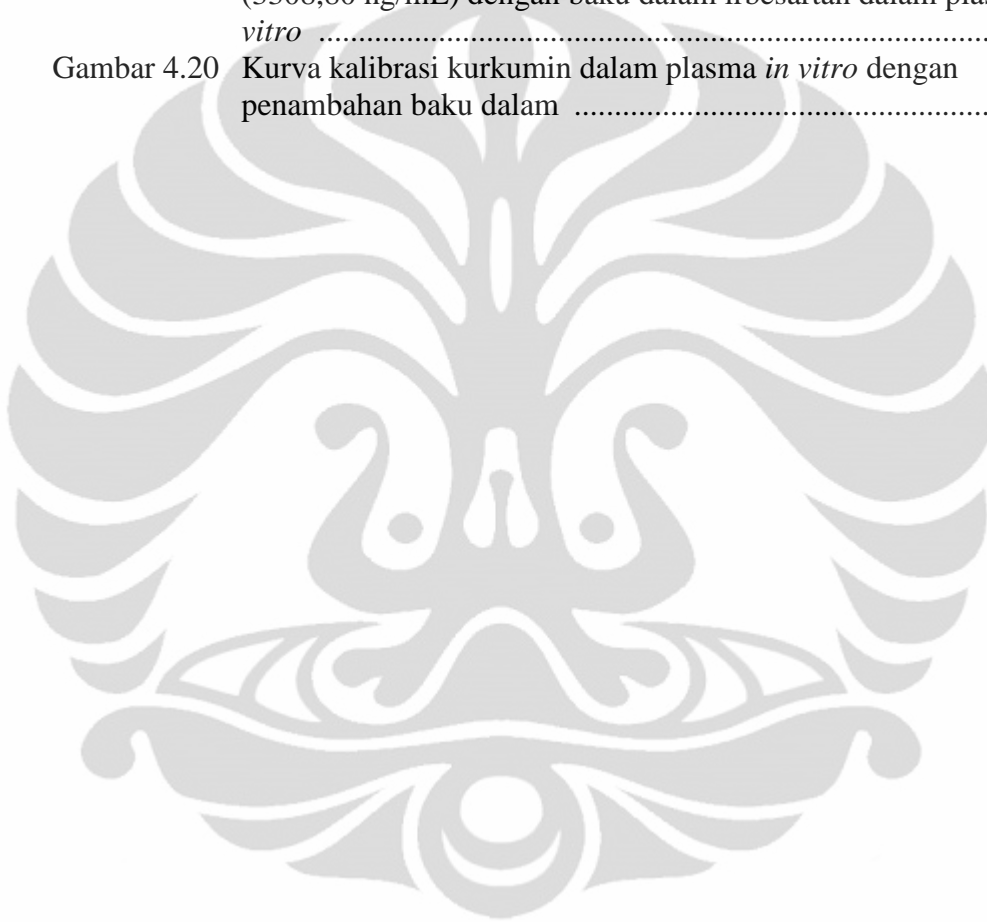
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Kurkuminoid dan Kurkumin	4
2.2 Etilin Estradiol.....	8
2.3 Irbesartan dan Kalium Losartan	10
2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	13
2.5 Analisis Obat dalam Plasma.....	17
2.6 Validasi Metode Analisis.....	19
2.7 Metode Analisis Kurkumin	25
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	28
3.1 Lokasi dan Waktu.....	28
3.2 Alat	28
3.3 Bahan	28
3.4 Cara Kerja.....	29
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	38
4.1 Penetapan Panjang Gelombang Analisis	38
4.2 Optimasi Kondisi Analisis	39
4.3 Optimasi dan Cara Penyiapan Sampel.....	43
4.4 Validasi Metode Analisis Kurkumin dalam Plasma <i>In Vitro</i>	44
4.5 Uji Stabilitas	48
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN.....	49
5.1 Kesimpulan.....	49
5.2 Saran	49
DAFTAR ACUAN.....	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumus struktur kurkuminoid	4
Gambar 2.2	Rumus struktur kurkumin	5
Gambar 2.3	Rumus struktur etinil estradiol	8
Gambar 2.4	Rumus struktur irbesartan	10
Gambar 2.5	Rumus struktur kalium losartan	11
Gambar 3.1	Peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	53
Gambar 4.1	Spektrum Serapan Kurkumin dan Irbesartan pada spektrofotometer UV-Vis	54
Gambar 4.2	Spektrum Serapan Kurkumin dan Kalium Losartan pada spektrofotometer UV-Vis	55
Gambar 4.3	Spektrum Serapan Kurkumin dan Etinil Estradiol pada spektrofotometer UV-Vis	56
Gambar 4.4	Kromatogram larutan standar kurkuminoid dengan konsentrasi 10 µg/mL dengan fase gerak asetoneitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (49:20:30:1)	57
Gambar 4.5	<i>Overlay</i> kromatogram larutan standar dengan fase gerak asetoneitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (49:20:30:1)	58
Gambar 4.6	Kromatogram larutan standar kurkuminoid dengan konsentrasi 10 µg/mL dengan fase gerak asetoneitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (40:20:39:1)	59
Gambar 4.7	<i>Overlay</i> kromatogram larutan standar dengan fase gerak asetoneitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (40:20:39:1)	50
Gambar 4.8	Kromatogram larutan standar kurkuminoid dengan konsentrasi 10 µg/mL dengan fase gerak asetoneitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1)	61
Gambar 4.9	<i>Overlay</i> kromatogram larutan standar dengan fase gerak asetoneitril-metanol- aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1)	62
Gambar 4.10	Kromatogram ekstrak kurkumin (1 µg/mL) dengan penambahan kalium losartan (100 µg/mL) dalam plasma <i>in vitro</i>	63
Gambar 4.11	Kromatogram ekstrak kurkumin (1 µg/mL) dengan penambahan etinil estradiol (100 µg/mL) dalam plasma <i>in vitro</i>	64
Gambar 4.12	Kromatogram ekstrak kurkumin (1 µg/mL) dengan penambahan irbesartan (100 µg/mL) dalam plasma <i>in vitro</i>	65
Gambar 4.13	Kromatogram campuran larutan standar kurkumin dan irbesartan dengan konsentrasi masing-masing 10 µg/mL dengan laju alir 0,8 mL/menit	66
Gambar 4.14	Kromatogram campuran larutan standar kurkumin dan irbesartan dengan konsentrasi masing-masing 10 µg/mL dengan laju alir 1,0 mL/menit	67
Gambar 4.15	Kromatogram campuran larutan standar kurkumin dan irbesartan dengan konsentrasi masing-masing 10 µg/mL dengan laju alir 1,2 mL/menit	68

Gambar 4.16	Kromatogram ekstrak plasma tanpa penambahan kurkumin dan baku dalam dan irbesartan (plasma blanko)	69
Gambar 4.17	Kromatogram ekstrak plasma kurkumin konsentrasi rendah (62,04 ng/mL) dengan baku dalam irbesartan dalam plasma <i>in vitro</i>	70
Gambar 4.18	Kromatogram ekstrak plasma kurkumin konsentrasi sedang (1654,40 ng/mL) dengan baku dalam irbesartan dalam plasma <i>in vitro</i>	71
Gambar 4.19	Kromatogram ekstrak plasma kurkumin konsentrasi tinggi (3308,80 ng/mL) dengan baku dalam irbesartan dalam plasma <i>in vitro</i>	72
Gambar 4.20	Kurva kalibrasi kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam	73

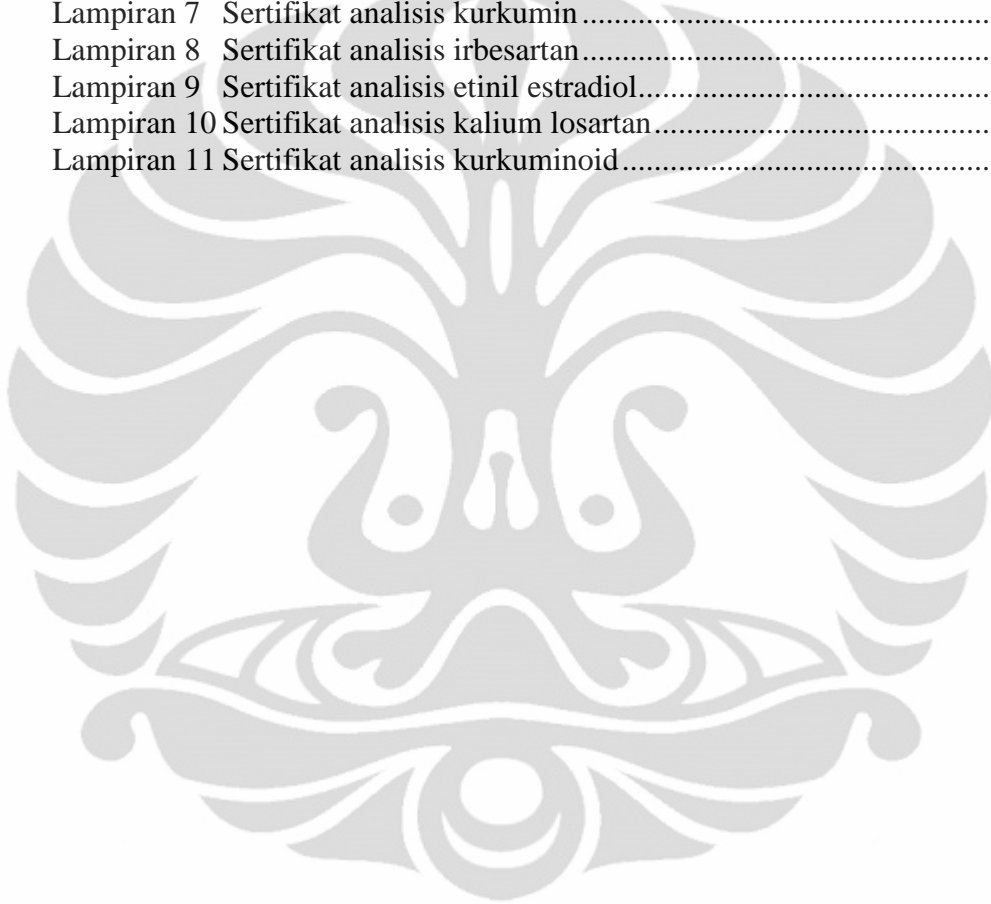


DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Hubungan antara panjang gelombang dengan luas puncak	74
Tabel 4.2	Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram kurkuminoid terhadap perubahan komposisi fase gerak	74
Tabel 4.3	Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram kurkumin terhadap perubahan komposisi fase gerak	75
Tabel 4.4	Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram kurkumin terhadap perubahan laju alir fase gerak	76
Tabel 4.5	Data uji kesesuaian sistem	76
Tabel 4.6	Data optimasi volume penambahan larutan pengestrak etil asetat 95%-metanol 5%	77
Tabel 4.7	Data optimasi waktu pengocokan dengan vortex	77
Tabel 4.8	Data pengukuran batas kuantitasi terendah (LLOQ) kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam	78
Tabel 4.9	Data uji selektivitas kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam	79
Tabel 4.10	Data kurva kalibrasi kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam	80
Tabel 4.11	Data uji akurasi dan presisi kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam, Hari ke-1 (<i>intra-day</i>)	81
Tabel 4.12	Data uji akurasi dan presisi kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam, Hari ke-2 (<i>intra-day</i>)	82
Tabel 4.13	Data uji akurasi dan presisi kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam, Hari ke-3 (<i>intra-day</i>)	83
Tabel 4.14	Data uji akurasi dan presisi kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam, Hari ke-4 (<i>intra-day</i>)	84
Tabel 4.15	Data uji akurasi dan presisi kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam, Hari ke-5 (<i>intra-day</i>)	85
Tabel 4.16	Data uji akurasi dan presisi antar hari dari kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam	86
Tabel 4.17	Data uji perolehan kembali (% <i>recovery</i>) kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam	92
Tabel 4.18	Data uji stabilitas larutan stok kurkumin (dengan baku dalam)	95
Tabel 4.19	Data uji stabilitas beku cair kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam	96
Tabel 4.20	Data uji stabilitas jangka pendek kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam	97
Tabel 4.21	Data uji stabilitas jangka panjang kurkumin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam	98
Tabel 4.22	Data hasil validasi metode analisis	99

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara perhitungan Nilai N, HETP, dan Tf	101
Lampiran 2	Cara memperoleh regresi linear	102
Lampiran 3	Cara perhitungan koefisien variasi dari fungsi	103
Lampiran 4	Cara perhitungan presisi	104
Lampiran 5	Cara perhitungan akurasi	105
Lampiran 6	Cara perhitungan uji perolehan kembali	106
Lampiran 7	Sertifikat analisis kurkumin	107
Lampiran 8	Sertifikat analisis irbesartan	109
Lampiran 9	Sertifikat analisis etinil estradiol	110
Lampiran 10	Sertifikat analisis kalium losartan	111
Lampiran 11	Sertifikat analisis kurkuminoid	112



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan obat tradisional secara umum dinilai lebih aman dari pada penggunaan obat modern. Hal ini disebabkan karena obat tradisional memiliki efek samping yang relatif lebih sedikit dari pada obat modern (Oktora, L., 2006). Oleh karena itu, penggunaan obat tradisional diterima secara luas hampir di seluruh negara di dunia. Faktor pendorong terjadinya peningkatan penggunaan obat tradisional di negara maju adalah usia harapan hidup yang lebih panjang pada saat prevalensi penyakit kronik meningkat, adanya kegagalan penggunaan obat modern untuk penyakit tertentu diantaranya kanker serta semakin luas akses informasi mengenai obat tradisional di seluruh dunia (Sukandar, E. Y., 2006).

Salah satu tanaman obat berkhasiat adalah rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.) dari famili Zingiberaceae. Rimpang kunyit merupakan tanaman obat yang tumbuh di daerah tropis dan banyak digunakan di Asia umumnya serta di India dan Indonesia khususnya. Manfaat rimpang kunyit antara lain sebagai bumbu, pewarna makanan dan tekstil, serta pengobatan tradisional untuk beberapa penyakit seperti kerusakan hati, anorexia, batuk, diabetes, rematik, dan sinusitis.

Rimpang kunyit mengandung senyawa fenol berupa kurkuminoid yang terdiri dari kurkumin ($\pm 77\%$), demetoksikurkumin ($\pm 17\%$) dan bisdemetoksikurkumin ($\pm 3\%$). Namun, kurkumin adalah senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas terapeutik yang dihasilkan oleh rimpang kunyit (Aggarwal, B, 2007). Kurkumin pula yang memberikan warna kuning pada rimpang kunyit. Kurkumin pertama kali diisolasi tahun 1815 dan saat ini kurkumin tersedia dalam bentuk murni sehingga mempermudah penelitian dan pengembangan obat tradisional (Chattopadhyay, Biswas, Bandyopadhyay & Banerjee, 2004).

Pengalaman empiris dan ditunjang dengan penelitian semakin memberikan keyakinan akan khasiat dan keamanan obat tradisional (Oktora, L., 2006). Untuk mencapai tujuan tersebut, berbagai penelitian lebih lanjut mengenai efek farmakologi kurkumin dilakukan. Pada tiga dekade terakhir, telah dipublikasikan

raturan artikel ilmiah yang mempelajari tentang efek antioksidan, antiinflamasi, pencegahan kanker dan potensi kemoterapi kanker dari kurkumin. Efek farmakologi antikanker dari kurkumin menjadi topik pada ulasan artikel yang dipublikasikan sejak tahun 1991 (Sharma, Gescher, & Steward, 2005). Beberapa efek farmakologi yang dimiliki kurkumin inilah yang menjadi alasan mengapa pada penelitian ini lebih difokuskan pada kurkumin itu sendiri.

Berbagai aktivitas kurkumin menunjukkan potensi pengembangan obat baru. Dalam pengembangan obat tradisional, calon obat tersebut akan melalui serangkaian uji yang membutuhkan waktu lebih panjang dan biaya yang tidak sedikit sebelum diresmikan sebagai obat oleh badan pemberi izin. Uji yang harus ditempuh oleh calon obat adalah uji praklinik dan uji klinik (Sukandar, E. Y., 2006).

Uji praklinik merupakan persyaratan uji untuk calon obat, dari uji ini diperoleh informasi tentang efikasi (efek farmakologi), profil farmakokinetik dan toksisitas calon obat. Setelah dinyatakan memenuhi persyaratan uji praklinik, suatu senyawa calon obat selanjutnya dapat diuji pada manusia (uji klinik) (Sukandar, E. Y., 2006).

Salah satu tahap penting dalam pengembangan obat baru adalah analisis obat dalam cairan biologis atau biasa disebut bioanalisis. Hal ini perlu dilakukan untuk memperoleh data yang akan dijadikan pedoman dalam studi klinis dan studi keamanan obat (Harahap, Y., 2010). Kemampuan untuk memonitor dan mengukur kadar obat di dalam tubuh sangat penting untuk mengetahui keamanan, dosis, dan efektifitas suatu obat (Evans, 2004).

Analisis dapat dilakukan apabila metode yang digunakan telah divalidasi. Validasi perlu dilakukan agar hasil analisis yang diperoleh terpercaya, cermat, handal dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi masalah analisis (Ganjar & Rohman, 2007).

Metode analisis yang terpilih saat ini adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dimana telah digunakan secara luas untuk penemuan dan pengembangan metode analisis baru (Evans, 2004). KCKT merupakan suatu

teknis analisis obat yang paling cepat berkembang. Cara ini ideal untuk analisis beragam obat dalam sediaan dan cairan biologis karena selektif, sederhana, dan kepekaannya tinggi (Parwa, B., 1991).

Pada penelitian ini, akan dilakukan optimasi dan validasi metode analisis kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan memodifikasi metode KCKT yang telah dipublikasikan oleh Vareed et al. pada tahun 2008. Penyiapan sampel plasma dilakukan dengan ekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat 95% dan metanol 5%. Detektor yang digunakan adalah detektor UV-Vis karena terdapat gugus kromofor pada struktur kimia kurkumin sehingga dapat dideteksi oleh detektor tersebut. Modifikasi metode analisis yang digunakan disesuaikan dengan kondisi dan peralatan yang ada di laboratorium.

1.2 Tujuan Penelitian

- 1.2.1 Memperoleh kondisi optimum untuk analisis kurkumin dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi.
- 1.2.2 Memperoleh metode yang tervalidasi untuk analisis kurkumin dalam plasma *in vitro* menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi.

BAB 2

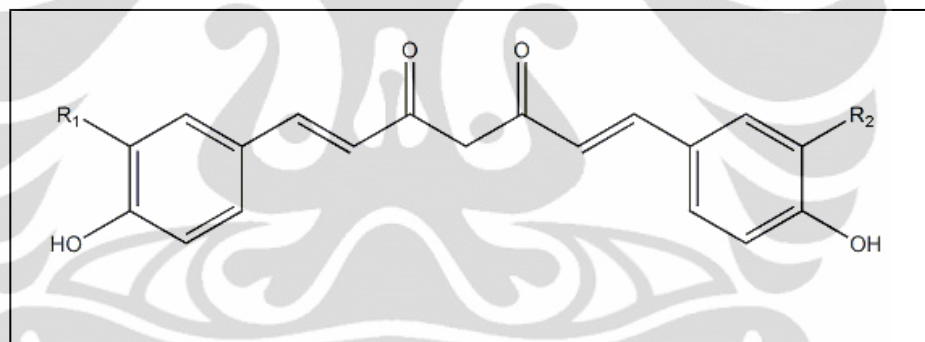
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kurkuminoid dan Kurkumin

2.1.1 Kurkuminoid (Hasibuan, C., 2009)

Kurkuminoid merupakan senyawa fenol yang berasal dari rimpang kunyit (*Curcuma longa*) atau *Curcuma sp.* lainnya. Senyawa-senyawa yang termasuk dalam golongan kurkuminoid meliputi kurkumin, demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin. Senyawa-senyawa tersebut banyak terdapat dalam rimpang *Curcuma sp.*

Kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin berbeda dalam hal polaritasnya. Hal ini disebabkan karena perbedaan struktur yaitu pada jumlah gugus hidroksi.



[Sumber: *WHO Monograph on Selected Medicinal Plants 1st volume*, 1999]

Gambar 2.1 Struktur Kimia Kurkuminoid

Keterangan:

$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$: Kurkumin

$R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}$: Demetoksikurkumin

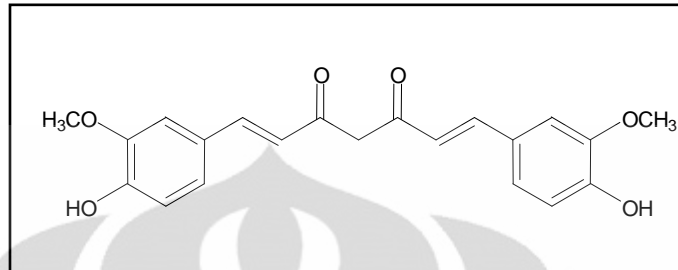
$R_1 = R_2 = \text{H}$: Bisdemetoksikurkumin

Kurkumin mempunyai rumus molekul $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ dan berat molekul 368,38. Demetoksikurkumin mempunyai rumus molekul $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$ dan berat molekul 338,35. Bisdemetoksikurkumin memiliki rumus molekul $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$ dan berat molekul 308,33 (Aggarwal, B. B, et al., 2007).

2.1.2 Kurkumin

2.1.2.1 Monografi (*Merck Index 14th edition*, 2006; *Matindale 34th edition*, 2005)

Struktur kimia



[Sumber: *Merck Index 14th edition*, 2006]

Gambar 2.2 Struktur kimia kurkumin

Rumus molekul	: $C_{21}H_{20}O_6$
Nama kimia	: Diferuloilmetana atau [1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksi-fenil)hepta 1,6 dien-3,5dion]
Berat molekul	: 368,38
Pemerian	: serbuk kristal berwarna kuning
Kelarutan	: tidak larut dalam air dan eter, larut dalam alkohol dan asam asetat glasial
Penyimpanan	: Simpan dalam tempat yang terlindung dari cahaya

2.1.2.2 Farmakologi

Penelitian mengenai efek farmakologi kurkumin banyak dilakukan pada beberapa dekade terakhir. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa kurkumin memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antikanker, antidiabetes, dan antivirus (Chattopadhyay, Biswas, Bandyopadhyay & Banerjee, 2004). Namun, efek farmakologi yang menjadi fokus saat ini adalah efek antiinflamasi dan antioksidan yang terkait dengan mekanisme antikanker dari kurkumin.

Kurkumin sebagai antiinflamasi melalui mekanisme berikut (Aggarwal, 2007; Sharma, Gescher, & Steward, 2005; Chattopadhyay, Biswas, Bandyopadhyay & Banerjee 2004):

1. Menurunkan aktivasi faktor transkripsi yaitu *nuclear factor kappa-B* (NF- κ B).

Kurkumin dapat bekerja menurunkan NF- κ B, yaitu faktor transkripsi yang dibutuhkan untuk proliferasi, invasi, metastasis sel, dan angiogenesis. NF- κ B diaktivasi oleh adanya respon dari substansi yang menyebabkan inflamasi, karsinogen, dan promotor tumor. Aktivasi NF- κ B menyebabkan penurunan apoptosis sel tumor. Kurkumin menahan NF- κ B dengan cara menahan penguraian dari penghambat NF- κ B.

2. Menurunkan ekspresi enzim siklooksigenase 2 (COX2)

Kurkumin menghambat ekspresi dari enzim siklooksigenase 2. Enzim siklooksigenase bertanggung jawab dalam mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin dan tromboksan. Enzim ini dibagi menjadi dua yaitu siklooksigenase 1 (COX1) yang berkaitan dengan *peptic ulcer* dan aliran darah pada ginjal, siklooksigenase 2 (COX2) yang berkaitan dengan jaringan otak. COX 2 dapat diinduksi oleh sitokin, faktor pertumbuhan, dan promotor tumor. Ekspresi yang berlebihan dari COX2 mengindikasikan karsinogenesis dari sel-sel tumor.

3. Sebagai antioksidan

Kurkumin menghambat ekspresi *reactive oksigen species* (ROS). Kurkumin bertindak sebagai reseptor dari radikal bebas oksigen sehingga dapat melindungi hemoglobin dari oksidasi. Secara *in vitro*, kurkumin dapat menghambat spesies oksigen reaktif (ROS) seperti anion superoksida, H₂O₂ dan radikal nitrit dengan mengaktifasi makrofag yang berperan penting dalam inflamasi. Kurkumin menurunkan produksi ROS secara *in vivo*. Hal ini terjadi akibat pengaturan enzim antioksidan seperti superoksida dismutase, katalase, dan glutathion peroksidase. Karena ROS mengindikasikan adanya perkembangan kondisi patologis inflamasi, kurkumin berpotensi mengontrol penyakit melalui potensi aktivitas antioksidannya.

Kurkumin bertindak sebagai antikanker melalui mekanisme berikut (Aggarwal, 2007; Badmaev & Majeed, 2009)

1. Menekan proliferasi sel tumor melalui pengaturan apoptosis sel

Walaupun kurkumin memiliki efek antikanker dengan berbagai mekanisme, induksi apoptosis sel tumor berperan penting sebagai mekanisme antikanker dari kurkumin. Kurkumin menginduksi apoptosis dan menghambat perkembangan siklus sel dimana keduanya penting untuk pencegahan perkembangan sel tumor.

2. Menekan angiogenesis

Angiogenesis merupakan pembentukan pembuluh darah baru yang penting untuk pertumbuhan tumor dan metastasis. Secara *in vitro*, kurkumin menghambat pembuluh darah endotelial dan pertumbuhan sel otot polos dan proliferasi dimana hal tersebut adalah dasar penghambatan angiogenesis (pembentukan pembuluh darah baru). Kurkumin juga menghambat angiogenesis yang diinduksi faktor pertumbuhan seperti *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF).

3. Menekan inflamasi yang dapat meningkatkan aktivitas antitumor

4. Sebagai antioksidan yang berperan dalam efek antiinflamasi

2.1.2.3 Farmakokinetika

Absorpsi dari kurkumin yang diberikan secara peroral mengalami eliminasi presistemik. Setelah diabsorpsi, kurkumin dikongjugasi oleh sulfat dan glukuronida. Adanya aktivitas enzim kongjugasi yaitu glukuronida dan sulfat pada kurkumin di dalam hati, ginjal, dan mukosa usus, menunjukkan bahwa pemberian peroral kurkumin yang diabsorpsi di saluran cerna menyebabkan sebagian besar kurkumin mengalami metabolisme menjadi bentuk konjugat sulfat dan glukuronida kemudian masuk ke sirkulasi darah. Organ yang bertanggung jawab pada metabolisme kurkumin adalah hati (Anand, Kunnumakkara, Newman, & Aggarwal, 2009).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Vareed et al. pada tahun 2008, kurkumin yang diberikan secara peroral pada manusia dengan dosis 10 g memberikan nilai C_{max} sebesar $2,30 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$. Melalui cara pemberian yang

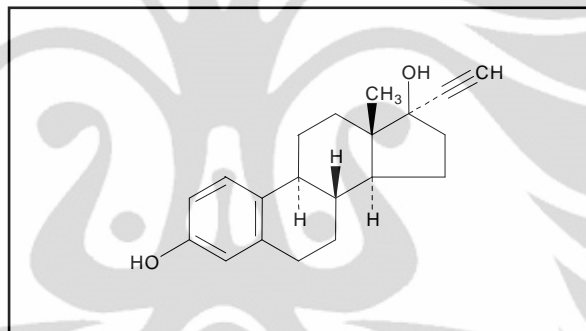
sama, dosis 12 g memberikan nilai C_{max} sebesar $1,73 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$. Waktu paruh kurkumin yaitu $6,77 \pm 0,83$ jam.

Ketika diberikan secara intravena dan intraperitoneal ke tikus, kurkumin secara aktif ditranspor ke dalam empedu kemudian diekskresikan. Metabolit utama dalam empedu adalah glukuronida dari tetrahidrokurkumin (THC) dan heksahidrokurkumin (HHC). Metabolit lainnya adalah asam dihidroferulat dengan asam ferulat dalam jumlah kecil (Goel, Kunnumakkara & Aggarwal, 2007).

2.2 Etinil Estradiol

2.2.1 Monografi (*Merck Index 14th edition*, 2006; *Matindale 34th edition*, 2005)

Struktur kimia



[Sumber: *Merck Index 14th edition*, 2006]

Gambar 2.3 Struktur Kimia Etinil Estradiol

Rumus molekul	: $C_{20}H_{24}O_2$
Nama kimia	: 17 α -etinil-1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol
Berat molekul	: 296,4
Pemerian	: Serbuk atau hablur putih sampai putih kekuningan dan tidak berbau
Kelarutan	: Larut dalam alkohol, eter, kloroform, minyak sayur dan larutan alkali hidroksida. Praktis tidak larut dalam air
Penyimpanan	: Simpan dalam tempat non-logam kedap udara. Hindari dari cahaya

2.2.2 Farmakologi

Etinil estradiol merupakan estrogen sintetik dengan aktivitas estrogenik dan telah digunakan di klinik. Estradiol, etinil estradiol terdapat dalam plasma dan secara luas terikat pada protein plasma (Goodman & Gilman, 2006). Estradiol plasma dianggap memasuki sel target dengan jalan difusi dan ditranspor ke inti sel, di mana ia terikat dengan reseptor estrogen.

Sel target etinil estradiol adalah saluran reproduksi pada wanita, kelenjar *mammary*, hipotalamus dan pituitari. Estrogen sintetik ini meningkatkan sintesis *sex hormone binding globulin* (SHBG) dan *thyroid-binding globulin* (TBG), menekan *follicle-stimulating hormone* (FSH) dari kelenjar pituitari. Kombinasi estrogen ini dengan progestin menekan sekresi *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH). Etinil estradiol digunakan sebagai kontrasepsi oral dan pengobatan *gejala menopause* (Goodman & Gilman, 2006).

2.2.3 Farmakokinetika

Etinil estradiol sering digunakan secara oral. Penambahan gugus etinil pada atom karbon posisi 17 senyawa estradiol menghambat metabolisme tahap pertama di hati. Absorpsi estrogen sintetik ini dari gastrointestinal sangat cepat dan secara umum terabsorpsi sempurna.

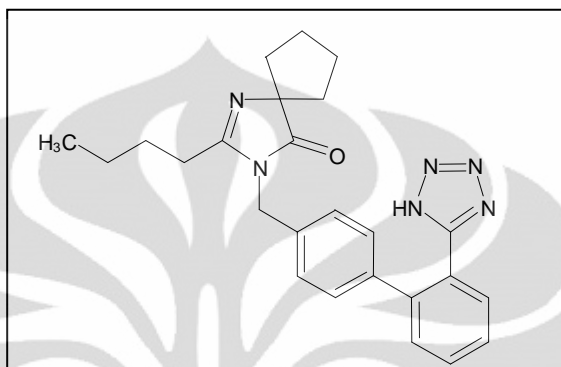
Etinil estradiol diekskresikan lebih lambat dibandingkan estradiol. Hal ini terjadi karena etinil estradiol tidak mengalami eliminasi presistemik di hati. Fase eliminasi dan waktu paruh etinil estradiol dilaporkan pada berbagai studi yaitu 13-27 jam.

2.3 Irbesartan dan Kalium Losartan

2.3.1 Irbesartan

2.3.1.1 Monografi (*Merck Index 14th edition, 2006; Matindale 34th edition, 2005*)

Struktur kimia



[Sumber: *Merck Index 14th edition, 2006*]

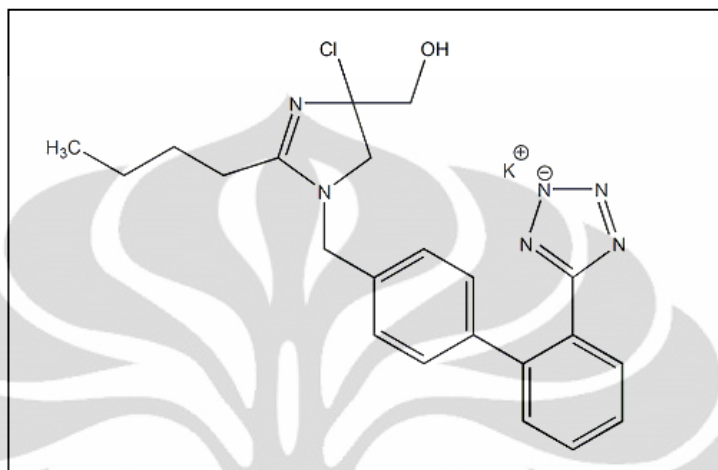
Gambar 2.4 Struktur Kimia Irbesartan

Rumus molekul	: C ₂₅ H ₂₈ N ₆ O
Nama kimia	: 2- Butil-3-[[29-(tetrazol-5-il)[1,19-bifenil]-4-il] metil]-1,3-diazaspiro [4.4] non-1-en-4-on
Berat molekul	: 428,53
Pemerian	: Serbuk atau hablur putih sampai putih kekuningan.
Kelarutan	: Sedikit larut dalam alkohol dan diklormetana. Praktis tidak larut dalam air
Penyimpanan	: Simpan di bawah suhu 30° C

2.3.2 Kalium Losartan

2.3.2.1 Monografi (*Merck Index 14th edition*, 2006; *Matindale 34th edition*, 2005; *United States of Pharmacopeia 30th edition*, 2006)

Struktur kimia



[Sumber: *United States of Pharmacopeia 30th edition*, 2006]

Gambar 2.5 Struktur Kimia Kalium Losartan

Rumus molekul	: C ₂₂ H ₂₂ KClN ₆ O
Nama kimia	: 2-Butil-4-kloro-1-[[2'-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1 <i>H</i> -imidazol-5-metanol
Berat molekul	: 461
Pemerian	: Serbuk putih sampai hampir putih
Kelarutan	: Larut dalam air, sedikit larut dalam asetonitril, dan larut dalam isopropil alkohol
Penyimpanan	: Simpan di bawah suhu 30° C

2.3.3 Farmakologi (Goodman & Gilman, 2006)

Irbesartan merupakan turunan tetrazol nonpeptida dan antagonis Angiotensin II yang secara selektif memblokir ikatan Angiotensin II dengan reseptor AT₁. Pada sistem renin-angiotensin, Angiotensin I diubah menjadi Angiotensin II oleh suatu enzim yaitu *angiotensin-converting enzyme* (ACE). Angiotensin II menstimulasi korteks adrenal untuk mensintesis dan mensekresikan aldosteron, yang akan menurunkan ekskresi ion Na⁺ dan meningkatkan ekskresi ion K⁺. Irbesartan memblokir ikatan angiotensin II dengan

reseptor AT_1 , sehingga menyebabkan vasodilatasi dan menurunkan efek aldosteron.

Dibandingkan dengan obat hipertensi lainnya yang bekerja pada sistem renin angiotensin, irbesartan menurunkan aktivasi reseptor AT_1 lebih efektif dibandingkan dengan ACE inhibitors. Mekanisme aksi dari golongan *angiotensin reseptor blocker* (ARB) ini berbeda dengan penghambat ACE, dimana menghambat perubahan Angiotensin I menjadi Angiotensin II sehingga menurunkan jumlah Angiotensin II namun tidak menurunkan jumlah Angiotensin II yang dihasilkan melalui jalur alternatif non-ACE Angiotensin II-*generating pathway*. Hal tersebut menjelaskan bahwa produksi Angiotensin II tidak seluruhnya dihambat, Angiotensin II masih dapat dibentuk oleh enzim-enzim lain. Irbesartan berikatan pada reseptor AT_1 sehingga berapapun jumlah Angiotensin II yang terbentuk tidak menimbulkan masalah.

2.3.4 Farmakokinetika (Lacy, Armstrong, Goldman, & Lance, 2005)

Irbesartan yang diberikan secara oral tidak memerlukan biotransformasi ke dalam bentuk aktifnya. Absorpsi oral dari irbesartan cepat dengan bioavailabilitas rata-rata 60-80%. Makanan tidak mempengaruhi bioavailabilitas dari irbesartan. Peak irbesartan dalam plasma dicapai setelah 1,5 – 2 jam dari pemberian obat.

Irbesartan dimetabolisme melalui oksidasi dan konjugasi glukuronida. Pemberian peroral dan intravena irbesartan dengan radiolabel, lebih dari 80% tidak mengalami perubahan dalam sirkulasi tubuh.

Irbesartan 90% terikat pada protein serum, terutama albumin dan asam α -1 glikoprotein. Rata-rata volume distribusi irbesartan adalah 53-93 liter. Klirens ginjal berkisar 3,0-3,5 mL/menit

Waktu paruh eliminasi irbesartan berkisar 11-15 jam. Irbesartan dan metabolitnya diekskresikan melalui ginjal dan empedu. Pemberian peroral dan intravena irbesartan dengan radiolabel, sebanyak 20% ditemukan di urin dan sisanya terdapat di feses dalam bentuk irbesartan atau irbesartan glukuronida.

2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

2.4.1 Teori Dasar

Kromatografi adalah istilah umum untuk berbagai cara pemisahan berdasarkan partisi cuplikan antara fase yang bergerak, dapat berupa gas atau zat cair, dan fase diam dapat berupa zat cair dan zat padat (Johnson & Stevenson, 1991). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan teknik yang mana solut atau zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut ini melewati suatu kolom kromatografi (Ganjar & Rohman, 2007).

Keuntungan metode KCKT, yaitu (Harmita, 2006):

1. Waktu analisis cepat
2. Daya pisahnya baik
3. Peka
4. Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi
5. Kolom dapat dipakai kembali
6. Dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil
7. Mudah untuk memperoleh kembali cuplikan
8. Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah

2.4.2 Instrumen

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri dari beberapa komponen pokok yaitu pompa, injektor, kolom, detektor, dan integrator.

2.4.2.1 Pompa

Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluen ke dalam kolom. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/ menit. Untuk tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/ menit.

Ada dua jenis pompa dalam KCKT yaitu: pompa dengan tekanan konstan, dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan (Ganjar & Rohman, 2007).

2.4.2.2 Injektor

Injektor berfungsi memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Alat ini terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal dan eksternal. (Ganjar & Rohman, 2007). Jenis-jenis injektor yaitu : aliran henti, septum, katup jalan kitar, dan auto injektor (Harmita, 2006).

2.4.2.3 Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen (Harmita, 2006). Kolom merupakan jantung kromatografi. Keberhasilan atau kegagalan analisis bergantung pada pilihan kolom dan kondisi yang tepat. Kolom dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kolom analitik dan kolom preparatif (Johnson & Stevenson, 1991).

2.4.2.4 Detektor (Ganjar & Rohman, 2007)

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada dalam eluat dan mengukur jumlahnya. Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi dua golongan, pertama detektor universal (yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa dan kedua detektor yang spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia.

Beberapa detektor yang sering digunakan pada KCKT:

a. Detektor Spektrofotometri UV-Vis

Detektor ini didasarkan pada adanya penyerapan radiasi ultraviolet (UV) dan sinar tampak (Vis) pada kisaran panjang gelombang 190-800 nm oleh spesies solut yang mempunyai struktur-struktur atau gugus-gugus kromoforik. Detektor spektrofotometri UV-Vis dapat berupa detektor dengan panjang gelombang tetap (merupakan detektor yang paling sederhana) serta detektor dengan panjang gelombang bervariasi.

b. Detektor *photodiode-array* (PDA)

Detektor PDA merupakan detektor UV-Vis dengan berbagai keistimewaan. Detektor ini mampu memberikan kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda pada sekali proses (*single run*). Selama proses berjalan, suatu kromatogram pada panjang gelombang yang diinginkan (biasanya antara 190-400) dapat ditampilkan.

c. Detektor Fluoresensi

Fluoresensi merupakan fenomena luminisensi yang terjadi ketika suatu senyawa menyerap sinar UV atau visibel lalu mengemisikannya pada panjang gelombang yang lebih besar. Tidak semua senyawa obat mempunyai sifat fluoresen sehingga detektor fluoresensi ini sangat spesifik. Disamping itu, detektor ini juga sangat sensitif dibandingkan dengan detektor UV.

d. Detektor Indeks Bias

Detektor ini akan merespon setiap perbedaan indeks bias antara analit (zat terlarut) dengan pelarutnya (fase geraknya). Penggunaan detektor ini terutama untuk senyawa-senyawa yang tidak mempunyai gugus kromofor.

e. Detektor Elektrokimia

Detektor ini bekerja berdasarkan oksidasi dan reduksi senyawa organik (termasuk obat) secara elektrokimia pada elektroda yang cocok.

2.4.2.5 Integrator (Ganjar & Rohman, 2007).

Alat ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu mem-plotkannya sebagai suatu kromatogram yang selanjutnya dievaluasi oleh analis (pengguna).

2.4.3 Fase Gerak

Pada kromatografi cair, susunan pelarut atau fase gerak merupakan salah satu peubah yang mempengaruhi pemisahan (Johnson & Stevenson, 1991). Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur

secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar daripada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk fase terbalik (fase diam kurang polar daripada fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut (Ganjar & Rohman, 2007).

2.4.4 Analisis Kuantitatif

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu (Harmita, 2006):

2.4.4.1 Baku luar

Larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Buat kurva kalibrasi antara luas puncak terhadap konsentrasi. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi baku atau dengan perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan.

2.4.4.2 Baku dalam

Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam konsentrasi tertentu disuntikkan dan hitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Buat kurva baku antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan mem-plot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan menggunakan cara ini adalah kesalahan volume injeksi dieliminir. Kesulitan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat.

Ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi oleh senyawa baku dalam, yaitu (Johnson & Stevenson, 1991) :

- a. Harus terpisah sama sekali dari puncak cuplikan
- b. Harus terelusi dekat dengan puncak yang diukur
- c. Konsentrasi dan tanggapan detektornya harus sama dengan konsentrasi dan tanggapan detektor puncak yang diukur
- d. Tidak boleh bereaksi dengan komponen cuplikan
- e. Tidak terdapat dalam cuplikan asal
- f. Harus sangat murni dan mudah diperoleh

2.5 Analisis Obat dalam Plasma

Cairan biologis yang umum digunakan untuk analisis adalah darah, plasma (serum), dan urin. Plasma harus ditambahkan antikoagulan terlebih dahulu agar dapat dipisahkan dari darah dengan cara sentrifugasi, tetapi harus dilakukan dengan hati-hati karena sel darah merah mudah pecah yang dapat mengakibatkan pemisahan plasma menjadi lebih sulit (Chamberlain, 1985).

Plasma mengandung banyak protein, dimana memiliki sifat fisika dan kimia yang berbeda dengan molekul obat yang dianalisa. Namun, terjadinya ikatan antara obat dan protein dengan afinitas yang tinggi menyebabkan penghilangan protein dengan cara ultrafiltrasi dan dialisis dapat pula menghilangkan obat. Akibatnya obat yang diukur hanya kadar obat bebasnya bukan kadar total obat. Oleh karena itu, ikatan protein obat dengan protein perlu dilepaskan kemudian total obat diekstraksi yang selanjutnya dianalisis.

Beberapa cara preparasi sampel yang digunakan untuk mengisolasi obat dari matriks biologi antara lain:

1. Pengendapan protein

Pengendapan protein dapat dilakukan menggunakan asam-asam dan pelarut organik untuk mendenaturasi dan mengendapkan protein. Asam-asam yang dapat digunakan adalah asam trikloroasetat (TCA) dan asam perklorat. Sedangkan pelarut organik yang dapat digunakan adalah metanol, asetonitril, aseton, dan etanol, meskipun memiliki efisiensi yang relatif rendah dalam memisahkan protein, tetapi pelarut ini telah digunakan secara luas dalam

bioanalisis karena kompatibilitasnya dengan fase gerak KCKT. Pelarut organik menurunkan solubilitas protein sehingga protein akan mengendap berdasarkan prinsip polaritas (Evans, 2004).

2. Ekstraksi cair-cair (*Liquid-Liquid Extraction*)

Ekstraksi cair-cair digunakan untuk memisahkan analit dari pengganggu dengan memisahkan sampel antara dua larutan (fase) yang tidak bercampur satu sama lain. Satu fase dalam ekstraksi cair-cair seringkali fase air dan fase lainnya merupakan pelarut organik. Senyawa yang lebih hidrofilik akan bergabung dengan fase air yang polar. Sedangkan fase yang lebih hidrofobik akan bergabung bersama fase pelarut organik.

Perubahan pH, pasangan ion, kompleksasi dapat digunakan dalam meningkatkan perolehan analit atau dalam menghilangkan pengganggu (Snyder, 1997). Agar obat dapat terekstraksi dalam pelarut organik, maka obat itu harus dalam bentuk tidak terionisasi. Oleh karena itu, pH fase air harus dioptimasi agar diperoleh bentuk tidak terionisasi dengan sempurna. Optimasi dapat dilakukan dengan menghitung atau menentukan pK_a obat.

Setelah dipisahkan dari fase air, fase organik harus benar-benar bebas air. Untuk mempercepat penguapan, dapat ditambahkan beberapa tetes etanol, dan air dapat dihilangkan dari fase organik dengan penambahan sedikit natrium sulfat anhidrat pada saat penyaringan. Penguapan dapat dilakukan dengan alat evaporator vakum, diuapkan dengan gas nitrogen, atau diuapkan pada temperatur kamar (Chamberlain, 1985).

3. Ekstraksi fase padat (*Solid-Liquid Extraction*)

Mekanisme dari ekstraksi fase padat adalah fase terbalik, fase normal dan *ion exchange* sama seperti yang digunakan dalam KCKT. Prinsip umum ekstraksi fase padat yaitu adsorpsi obat dari larutan ke dalam adsorben atau fase diam. Adsorben yang digunakan yaitu partikel silika berukuran 40-60 μm yang berikatan membentuk fase hidrokarbon. Adsorben yang paling baik kapasitasnya dalam mengadsorpsi analit adalah C₁₈.

Secara umum, ekstraksi fase padat menggunakan lima tahap yaitu pengkondisian (*conditioning*), penyeimbangan fase diam (*equilibration*), memasukkan sampel (*loading*), pencucian untuk menghilangkan senyawa pengganggu (*washing*), dan elusi sampel (*elution*) (Evans,2004; Snyder,1997).

2.6 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Tujuan utama validasi metode adalah untuk menjamin bahwa metode yang digunakan mampu memberikan hasil yang cermat, handal, dan terpercaya (Harmita, 2006).

Validasi metode analisis yang dilakukan dalam matriks biologi biasanya disebut sebagai validasi metode bioanalisis. Validasi metode bioanalisis ini digunakan pada studi farmakologi klinis, pengujian bioavailabilitas (BA) dan bioekuivalensi (BE), serta uji farmakokinetika (PK). Metode analisis yang selektif dan sensitif untuk evaluasi obat dan metabolitnya (analit) secara kuantitatif sangat berpengaruh terhadap kesuksesan studi farmakologi pre-klinik dan klinik.

2.6.1 Tipe dan Tingkatan Validasi

Dalam bioanalisis, tipe dan tingkatan validasi dapat dikategorikan sebagai berikut (*Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, 2001) :

2.6.1.1 Validasi Lengkap (*Full Validation*)

Validasi lengkap penting dalam proses pengembangan dan implementasi metode bioanalisis untuk pertama kalinya. Validasi lengkap penting pula dilakukan untuk obat-obat yang baru ditemukan (*new drug entity*) dan dilakukan jika ada metabolit yang ditambahkan pada suatu penetapan kadar.

2.6.1.2 Validasi Parsial (*Partial Validation*)

Validasi parsial merupakan modifikasi dari metode bioanalisis yang telah divalidasi. Validasi parsial sekurang-kurangnya dilakukan akurasi dan presisi

pada proses *intra assay* sampai mendekati validasi penuh. Perubahan-perubahan dalam bioanalisis yang dapat dikategorikan dalam validasi parsial yaitu:

- a. Metode bioanalisis yang ditransfer antar laboratorium atau analisis
- b. Perubahan dalam metode analisis
- c. Perubahan antikoagulan dalam cairan biologis
- d. Perubahan matriks
- e. Perubahan dalam prosedur proses sampel
- f. Perubahan spesies pada matriks yang sama
- g. Perubahan dalam rentang konsentrasi
- h. Perubahan instrumen dan/atau *software*
- i. Volume sampel yang terbatas
- j. Matriks yang jarang

2.6.1.3 Validasi Silang (*Cross Validation*)

Validasi silang adalah perbandingan parameter apabila dua atau lebih metode bioanalisis digunakan untuk mendapatkan data pada studi yang sama atau studi yang berbeda. Salah satu contoh validasi silang yaitu keadaan dimana metode bioanalisis yang telah tervalidasi dijadikan sebagai referensi dan metode bioanalisis lainnya dijadikan pembanding. Perbandingan harus dilakukan dua arah.

2.6.2 Standar Acuan

Analisis obat dan metabolitnya dalam matriks biologi memerlukan standar acuan (*reference standard*) dan sampel yang digunakan sebagai *quality control* (QC). Kemurnian dari standar acuan yang digunakan untuk sampel *spiked* dapat mempengaruhi data. Oleh karena itu, identitas dan kemurnian standar acuan harus diketahui dan pada saat pembuatan larutan harus diketahui konsentrasinya. Jika memungkinkan, standar acuan harus identik dengan dengan analit. Jika tidak memungkinkan dapat digunakan bentuk kimia lainnya seperti bentuk garam, ester, asam atau basa bebas.

Ada tiga jenis standar acuan yang digunakan, antara lain:

1. Standar acuan yang mempunyai sertifikat (misalnya standar dari USP)
2. Standar acuan yang dijual secara komersil dari sumber yang mempunyai reputasi
3. Standar acuan yang disintesis oleh laboratorium analitik atau institusi non komersial lainnya

Sampel yang digunakan sebagai *quality control* (QC) terdiri dari tiga konsentrasi yaitu rendah (*low*), sedang (*medium*), dan tinggi (*high*). Konsentrasi rendah merupakan tiga kali dari nilai konsentrasi *Lower Limit of Quantification* (LLOQ). Konsentrasi sedang adalah setengah dari nilai konsentrasi *Lower Limit of Quantification* (LLOQ) ditambah konsentrasi *Upper Limit of Quantification* (ULOQ). Sedangkan konsentrasi tinggi adalah 80% dari nilai *Upper Limit of Quantification* (ULOQ).

2.6.3 Pengembangan Metode Bioanalisis

Dasar parameter untuk validasi metode bioanalisis adalah akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduibilitas, dan stabilitas. Stabilitas analit pada sampel plasma juga perlu ditentukan. Pengembangan metode bioanalisis meliputi evaluasi selektivitas, akurasi, presisi, uji perolehan kembali (*% recovery*), kurva kalibrasi, dan stabilitas.

2.6.3.1 Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan metode analisis untuk membedakan dan mengukur kadar analit dengan adanya komponen lain dalam sampel. Untuk selektivitas, analisis sampel blanko dari matriks biologi yang sesuai (plasma, urin, atau matriks lainnya) dilakukan sedikitnya dari enam sumber yang berbeda. Masing-masing sampel harus diuji terhadap gangguan atau interferensi, dan selektivitas harus dipastikan pada batas kuantitasi terendah (LLOQ).

2.6.3.2 Akurasi

Akurasi dari metode analisis menggambarkan kedekatan rata-rata hasil pengujian dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi ditentukan oleh analisis berulang dari sampel yang mengandung analit dalam jumlah yang diketahui. Akurasi diukur menggunakan sedikitnya lima kali pengukuran untuk setiap konsentrasi yaitu pada konsentrasi rendah, sedang, tinggi. Pengukuran akurasi memenuhi syarat jika nilai rata-rata berada pada 15% nilai sebenarnya, kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka tidak boleh melebihi 20%. Pengukuran akurasi ditentukan oleh perbedaan antara nilai rata-rata dan nilai sebenarnya.

2.6.3.3 Presisi

Presisi dari metode analisis menggambarkan kedekatan hasil pengukuran individual analit yang satu dengan yang lainnya. Presisi diukur menggunakan sedikitnya lima kali pengukuran untuk setiap konsentrasi dan menggunakan minimal tiga rentang konsentrasi yaitu rendah, sedang, tinggi. Pengukurannya dapat dilakukan *intra assay* (dalam satu kali analisis) dan *inter assay* (dilakukan analisis selama 5 hari). Presisi ditentukan pada setiap konsentrasi, harus memiliki nilai koefisien variasi (KV) tidak lebih dari 15%, kecuali LLOQ dimana nilai KV tidak boleh lebih dari 20%.

2.6.3.4 Perolehan kembali (*Recovery*)

Perolehan kembali (*Recovery*) suatu analit adalah perbandingan respon detektor yang diperoleh dari sejumlah analit yang ditambahkan ke dalam matriks biologi dan diekstraksi dari matriks biologi tersebut dengan respon detektor yang diperoleh untuk kadar sebenarnya dari standar murni. Perolehan kembali tidak harus 100%, tetapi tingkat perolehan kembali analit dan baku dalam (*internal standard*) harus konsisten, presisi, dan reproduksibel. Uji perolehan kembali harus dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel pada tiga rentang konsentrasi yaitu rendah, sedang, tinggi dengan standar yang tidak diekstraksi yang mewakili perolehan kembali 100%.

2.6.3.5 Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi adalah hubungan antara respon instrumen dan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi disiapkan dalam matriks biologi yang sama dengan sampel dengan menambahkan sejumlah analit ke dalam matriks dengan konsentrasi yang diketahui. Pemilihan konsentrasi standar berdasarkan rentang pada literatur atau penelitian. Kurva kalibrasi terdiri dari sampel blanko (matriks sampel tanpa baku dalam), sampel *zero* (matriks dengan baku dalam), dan 6-8 non-*zero* sampel yang mencakup rentang pengukuran, termasuk LLOQ.

a. *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

Standar terendah pada kurva kalibrasi harus diterima sebagai LLOQ jika:

- i. Respon analit pada LLOQ minimal lima kali respon sampel blanko
- ii. Puncak analit dapat diidentifikasi, tidak ada gangguan, reproduksibel dengan presisi 20% dan akurasi 80-120%.

b. Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi dapat diterima jika memenuhi persyaratan berikut:

- i. 20% simpangan dari nilai LLOQ dan 15% simpangan menggunakan standar selain LLOQ.
- ii. Setidaknya empat dari enam non zero sampel memenuhi persyaratan tersebut, termasuk LLOQ dan konsentrasi tertinggi dari kurva kalibrasi.

2.6.3.6 Stabilitas

Stabilitas obat dalam cairan biologis adalah fungsi dari kondisi penyimpanan, sifat kimia obat, matriks dan sistem penyimpanan. Obat yang ada dalam matriks biologis dapat terurai sewaktu penyimpanan dan tidak dapat terdeteksi sewaktu sampel dianalisis.

Semua penentuan stabilitas harus menggunakan sampel yang disiapkan dari larutan stok analit yang dibuat baru, dalam matriks biologis yang bebas analit dan bebas gangguan. Jenis-jenis uji stabilitas antara lain:

a. Stabilitas Beku dan Cair (*Freeze and Thaw Stability*)

Stabilitas analit harus ditentukan setelah tiga siklus beku dan cair. Setidaknya tiga aliquot dari masing-masing konsentrasi rendah dan tinggi disimpan pada suhu penyimpanan yang diinginkan selama 24 jam dan dicairkan pada suhu kamar. Ketika mencair seluruhnya, sampel dibekukan kembali selama 12-24 jam pada kondisi yang sama. Siklus beku-cair diulang sebanyak dua kali, kemudian analisis dilakukan pada siklus ketiga. Jika analit tidak stabil pada suhu yang diinginkan, maka uji dapat dilakukan dengan menyimpan sampel pada suhu -70°C selama tiga siklus beku dan cair.

b. Stabilitas Suhu Jangka Pendek (*Short-Term Temperature Stability*)

Tiga aliquot dari masing-masing konsentrasi rendah dan tinggi harus dicairkan pada suhu kamar dan disimpan pada suhu ini selama 4-24 jam (atau berdasarkan durasi yang diinginkan dimana sampel stabil sesuai dengan penelitian) kemudian dianalisis.

c. Stabilitas Jangka Panjang (*Long-Term Stability*)

Waktu penyimpanan pada evaluasi stabilitas jangka panjang harus melebihi waktu antara pengumpulan sampel pertama kali sampai sampel terakhir dianalisis. Stabilitas jangka panjang ditentukan dengan menyimpan sedikitnya tiga aliquot dari masing-masing konsentrasi rendah dan tinggi pada kondisi yang sama seperti uji sampel. Konsentrasi dari semua sampel harus dibandingkan dengan rata-rata nilai perolehan kembali yang sesuai dengan konsentrasi standar dari hari pertama uji stabilitas jangka panjang.

d. Stabilitas Larutan Stok (*Stock Solution Stability*)

Stabilitas larutan stok dari obat dan baku dalam harus dievaluasi pada suhu kamar selama minimal enam jam. Jika larutan stok dibekukan selama periode tertentu, stabilitas harus terdokumentasi. Setelah tercapainya waktu penyimpanan yang diinginkan, stabilitas harus diuji dengan membandingkan respon instrumen terhadap larutan yang telah dibuat baru.

e. Stabilitas Post-Preparatif (*Post-Preparative Stability*)

Stabilitas sampel yang diproses, termasuk waktu selama sampel berada di dalam *autosampler* harus ditentukan. Stabilitas obat dan baku dalam harus ditetapkan selama waktu analisis untuk *batch* dalam validasi sampel, dengan menentukan konsentrasi berdasarkan kalibrasi standar.

2.7 Metode Analisis Kurkumin

Berikut adalah beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis kurkumin dalam plasma yang telah dilakukan sebelumnya :

1. Farmakokinetika metabolit kurkumin terkonjugasi pada subyek manusia sehat (Vareed, Kakarala, Ruffin, Crowell, Normolle, Djuric & Brenner, 2008)

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT dengan detektor UV pada panjang gelombang 420 nm. Menggunakan kolom Waters μ Bondapak® (250 x 4,6 mm; ukuran partikel 10 μ m). Fase gerak yang digunakan adalah asam asetat-metanol-air (0,1: 65: 35 v/v/v) dan metanol (100%) dengan metode gradien. Laju alir yang digunakan 2,0 mL/menit. Menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan etilasetat-metanol (95:5 v/v) sebagai larutan pengekstrak. Baku dalam yang digunakan adalah β -17-estradiol asetat. Kurva kalibrasi linear pada rentang 0,075 sampai 10,0 μ g/ mL.

2. Kurkumin dalam plasma dan urin: penetapan kadar dengan kromatografi cair kinerja tinggi (Heath, Pruitt, Brenner, & Rock, 2003)

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT dengan autosampler detektor UV pada panjang gelombang 262 nm. Menggunakan kolom Waters SymmetryShield® (150 x 3,9 mm, Waters, Milford, MA, USA). Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril-metanol-aqua *deionized*-asam asetat (41:23:36:1,v/v) dengan laju alir 1,0 mL/menit. Menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan etilasetat-metanol (95:5 v/v) sebagai larutan

pengekstrak. Baku dalam yang digunakan adalah β -17-estradiol asetat. Kurva kalibrasi linear pada rentang 0,2 sampai 7,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3. Pengembangan dan validasi metode kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik untuk penetapan kadar kurkumin dan piperin pada plasma manusia untuk studi farmakologi klinik (Sethi, Dua, Mohanty, Mishra, Jain & Edwards, 2009).

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT Hitachi detektor UV dengan panjang gelombang 415 nm. Menggunakan kolom Chromolith® SpeedROD RP-18 (4,6 mm x 50 mm, Merck). Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril-metanol-trikloroasetat-aqua *deionized* (17,6:35,3:0,1:47,0 v/v/v/v) dengan laju alir 2,5 mL/menit dan digunakan dapar fosfat 12 mM pH 3,4. Menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan etilasetat-propanol (9:1 v/v) sebagai larutan pengekstrak. Baku dalam yang digunakan adalah β -17-estradiol asetat. Kurva kalibrasi linear pada rentang 10-500 ng/mL ($r > 0,99$).

4. Studi *Pilot Cross-Over* untuk mengevaluasi bioavailabilitas oral BCM-95® CG (Biocurcumax™) pada manusia, peningkatan preparasi kurkumin (Antony, Merina, Iyer, Judy, Lennertz & Joyal, 2008).

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT dengan detektor UV pada panjang gelombang 420 nm. Menggunakan kolom ODS Phenomenex® (250 x 4,6 mm, ukuran partikel 5,0 μm). Fase gerak yang digunakan adalah metanol dengan laju alir 1,0 mL/menit. Menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan etilasetat sebagai larutan pengekstrak.

5. Validasi metode untuk penetapan kadar kurkumin dalam plasma dan jaringan otak dengan kromatografi cair kinerja tinggi detektor fluoresensi (Schriborr, Eckert, Rimbach, & Frank, 2010)

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT dengan autosampler detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi dan emisi 420 dan 470 nm untuk kurkumin, 280 dan 310 nm untuk β -17-estradiol asetat. Menggunakan kolom Jasco Reprosil-Pur Basic® C₁₈ (75 x 2 mm, ukuran partikel 1,8 μ m) dan *guard* kolom. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril-metanol-aqua *deionized*-asam asetat (49:20:30:1,v/v) dengan laju alir 0,4 mL/menit. Menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan etilasetat-metanol (95:5 v/v) sebagai larutan pengekstrak. Baku dalam yang digunakan adalah β -17-estradiol asetat. Kurva kalibrasi linear pada rentang 0,05 sampai 10 μ g/ mL.

6. Penetapan kadar kurkumin pada plasma tikus secara ekstraksi cair-cair menggunakan kromatografi cair-spektrometri massa dengan penyemprom ionik: pengembangan, validasi dan aplikasi pada studi farmakokinetik (Singh, Wajahudin, & Jain, 2010).

Kondisi :

Metode analisis menggunakan kromatografi cair-spektrometri massa dengan penyemprom ionik (Applied Biosystems, MDS Sciex Toronto, Canada). Menggunakan kolom Supelco Discovery® (4,6 x 50 mm, ukuran partikel 5,0 μ m). Fase gerak yang digunakan adalah dapar amonium asetat 0,01 M (pH 4,5) dan asetonitril dengan perbandingan (10:90 v/v) dengan laju alir 0,5 mL/menit. Menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan diklorometan-etilasetat (1:1 v/v) sebagai larutan pengekstrak. Baku dalam yang digunakan adalah biochanin. Kurva kalibrasi linear pada rentang 10 sampai 2000 ng/ mL ($r \geq 0,995$).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi di Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok selama 4 bulan dimulai dari bulan Februari 2011 sampai dengan Mei 2011.

3.2 Alat

Kromatografi cair kinerja tinggi (LC-10AD VP, Shimadzu) dilengkapi dengan Penghilang Gas (DGU-12A VP, Shimadzu), Pengendali Sistem (SCL-10A VP, Shimadzu), Detektor UV (SPD-10A VP, Shimadzu), Oven Kolom (HPLC Oven TC 1900), injektor manual, kolom C₁₈ Kromasil 100-5 (250 x 4,6 mm, 5µm) dan pengolah data pada komputer berupa perangkat lunak Class VP. Lihat Gambar 3.1. Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1601), Syringe (Hamilton), Timbangan analitik (Analytical Balance AND GR-202), Filter eluen 0,45 µm (Whatman), Penghilang Gas (Elma S40H Elmasonic), Sentrifugator (DSC-300SD & Spectrafuge 16 M), Vortex (Maxi Mix II-Barnstead), Mikropipet (Socorex Acura 825), Evaporator (TurboVap LV), *Blue tip* dan *Yellow tip*, Tabung sentrifus Mikrotube, dan Alat-alat gelas

3.3 Bahan

Kurkumin (USP), Irbesartan (Hetero Labs Limited), Etil Estradiol (Beijing Zizhu Pharmaceutical), Kalium Losartan (Ipca Laboratories Limited), Kurkuminoid (Merck), Asetonitril pro HPLC (Merck), Metanol pro HPLC (Merck), Asam asetat (Mallinckrodt), Etil asetat (Mallinckrodt), Aquabidestilata (Ikapharmindo Putramas Pharmaceutical Laboratories), Plasma darah (PMI)

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Larutan

3.4.1.1 Pembuatan Fase Gerak

Fase gerak dibuat sebanyak 500 mL dengan komposisi asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1). Sebanyak 165 mL asetonitril, 100 mL metanol, 230 mL aquabidestilata, dan 5 mL asam asetat dicampur dan disaring dengan menggunakan vakum dan filter 0,45 μm . Kemudian dihilangkan gas yang terdapat di dalam larutan tersebut menggunakan sistem penghilang gas.

3.4.1.2 Pembuatan Larutan Pengekstrak

Sebanyak 190 mL etil asetat dicampur dengan 10 mL metanol. Didapat larutan etil asetat-metanol (95:5 v/v).

3.4.1.3 Pembuatan Larutan Induk Kurkumin

Sebanyak 5,0 mg kurkumin dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, larutkan dengan metanol. Kemudian ditambahkan metanol sampai batas labu ukur dan didapat konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan tertentu.

3.4.1.4 Pembuatan Larutan Induk Kurkuminoid

Sebanyak 5,0 mg kurkuminoid dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, larutkan dengan metanol. Kemudian ditambahkan metanol sampai batas labu ukur dan didapat konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan tertentu.

3.4.1.5 Pembuatan Larutan Induk Irbesartan

Sebanyak 5,0 mg irbesartan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, larutkan dengan metanol. Kemudian ditambahkan metanol sampai batas labu ukur dan didapat konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan tertentu.

3.4.1.6 Pembuatan Larutan Induk Kalium Losartan

Sebanyak 5,0 mg kalium losartan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, larutkan dengan metanol. Kemudian ditambahkan metanol sampai batas labu ukur dan didapat konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan tertentu.

3.4.1.7 Pembuatan Larutan Induk Etilin Estradiol

Sebanyak 5,0 mg etiln estradiol dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, larutkan dengan metanol. Kemudian ditambahkan metanol sampai batas labu ukur dan didapat konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan tertentu.

3.4.2 Tahapan Penelitian

3.4.2.1 Penetapan Panjang Gelombang Analisis

Larutan induk kurkumin, irbesartan, kalium losartan, dan etiln estradiol masing-masing diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing larutan tersebut diukur nilai serapannya pada spektrofotometer UV-Vis dan dibuat kurva serapannya. Nilai panjang gelombang maksimum untuk masing-masing senyawa dipilih untuk analisis.

3.4.2.2 Optimasi Kondisi Analisis

a. Pemilihan Komposisi Fase Gerak

Larutan induk kurkuminoid diencerkan dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Sebanyak 20 μL aliquot disuntikkan ke dalam KCKT dengan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (49:20:30:1) sebagai kondisi awal (Sciborr, Eckert, Rimbach, & Frank, 2010). Laju alir yang digunakan sebesar 1,0 mL/menit dan hasil elusi dideteksi pada panjang gelombang analisis. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N), dan HETP.

Selanjutnya disuntikkan larutan kurkuminoid ke dalam alat KCKT dengan memvariasikan komposisi fase gerak sebagai berikut:

- i. Asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (40:20:39:1)
- ii. Asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1)

Deteksi dilakukan pada panjang gelombang terpilih. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N), dan HETP.

b. Penentuan Waktu Retensi

Larutan induk kurkumin, irbesartan, kalium losartan, dan etinil estradiol masing-masing diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Sebanyak 20 μL aliquot masing-masing larutan disuntikkan ke dalam KCKT dengan komposisi fase gerak sebagai berikut:

- i. Asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (49:20:30:1)
- ii. Asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (40:20:39:1)
- iii. Asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1)

Selanjutnya, waktu retensi (t_R) yang diperoleh dicatat.

c. Pemilihan Baku Dalam untuk Analisis Kurkumin dalam Plasma *In Vitro*

Disiapkan 3 replikat 0,5 mL plasma yang mengandung kurkumin dengan konsentrasi tertentu dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Selanjutnya, pada masing-masing replikat ditambahkan 40 μL irbesartan (100 $\mu\text{g/mL}$), etinil estradiol (100 $\mu\text{g/mL}$), kalium losartan (100 $\mu\text{g/mL}$) berturut-turut dan dikocok dengan vortex selama 30 detik. Lalu dilakukan penambahan larutan pengestrak campuran etil asetat- metanol (95:5) sebanyak 2,0 mL dan dikocok dengan vortex selama 3 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Setelah itu, sebanyak 1,0 mL lapisan organik diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian dikeringkan menggunakan gas nitrogen suhu 60 °C. Ekstrak kering yang dihasilkan direkonstitusi dalam 200 μL fase gerak dan divortex selama 30 detik serta disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Sebanyak 20 μL aliquot disuntikkan ke dalam KCKT.

d. Pemilihan Kecepatan Aliran Fase Gerak untuk Analisis

Larutan yang mengandung kurkumin dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ dan baku dalam terpilih (irbesartan) dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ disiapkan. Selanjutnya disuntikkan ke dalam alat KCKT sebanyak 20 μL aliquot menggunakan fase gerak terpilih asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1). Laju alir yang digunakan adalah 1,0 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 1,2 mL/menit dan 0,8 mL/menit. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N), dan HETP.

e. Optimasi penyiapan sampel

Sebanyak 0,5 mL plasma yang mengandung kurkumin dengan konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Selanjutnya, ditambahkan 40 μL baku dalam Irbesartan (100 $\mu\text{g/mL}$) dan dikocok dengan vortex selama 30 detik. Kemudian dilakukan optimasi penyiapan sampel meliputi optimasi volume penambahan larutan pengestrak dan waktu pengocokkan dengan vortex.

Pada tahap optimasi volume larutan pengestrak, dilakukan penambahan larutan campuran etil asetat-metanol (95:5). Penambahan larutan pengestrak ini divariasikan yaitu 1,0 , 2,0 dan 3,0 mL. Setelah itu, dilakukan optimasi waktu pengocokkan dengan vortex. Plasma yang telah ditambahkan larutan pengestrak tersebut dikocok menggunakan vortex dengan waktu pengocokkan yang divariasikan yaitu 1, 2 dan 3 menit. Tahap selanjutnya adalah sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Kemudian lapisan organik diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu diuapkan menggunakan gas nitrogen suhu 60 °C. Ekstrak kering yang dihasilkan direkonstitusi dalam 200 μL fase gerak dan dikocok menggunakan vortex selama 30 detik serta disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Sebanyak 20 μL aliquot disuntikkan ke dalam KCKT.

f. Uji Kesesuaian Sistem

Larutan campuran kurkumin dengan konsentrasi 5,0 µg/mL dan baku dalam Irbesartan dengan konsentrasi 5,0 µg/mL disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih yaitu menggunakan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dan laju alir 1,0 mL/menit. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N), HETP, dan presisi pada lima kali penyuntikan.

3.4.2.3 Penyiapan Sampel

Sebanyak 0,5 mL plasma yang mengandung kurkumin dengan konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Selanjutnya, ditambahkan 40 µL baku dalam Irbesartan (100 µg/mL) dan dikocok menggunakan vortex selama 30 detik. Lalu dilakukan penambahan larutan pengestrak etil asetat-metanol (95:5) sebanyak 2,0 mL dan dikocok dengan vortex kembali selama 3 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Setelah itu, sebanyak 1,0 mL lapisan organik diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian diuapkan menggunakan gas nitrogen suhu 60 °C. Ekstrak kering yang dihasilkan direkonstitusi dalam 200 µL fase gerak dan dikocok dengan vortex selama 30 detik serta disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Sebanyak 20 µL aliquot disuntikkan ke dalam KCKT dengan kondisi analisis terpilih yaitu menggunakan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dan laju alir 1,0 mL/menit.

3.4.2.4 Validasi Metode Bioanalisis Kurkumin dalam Plasma *In Vitro*

a. Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma/Uji Spesifisitas

Sebanyak 0,5 mL plasma dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Lalu dilakukan penambahan larutan pengestrak etil asetat- metanol (95:5) sebanyak 2,0 mL dan dikocok dengan vortex selama 3 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Setelah itu, sebanyak 1,0 mL lapisan organik diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian diuapkan menggunakan gas nitrogen suhu 60 °C. Ekstrak kering yang dihasilkan direkonstitusi

dalam 200 μL fase gerak dan dikocok dengan vortex selama 30 detik serta disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan hasil ekstraksi sebanyak 20,0 μL aliquot disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih yaitu fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dengan laju alir 1,0 mL/menit. Diamati apakah ada puncak pengotor atau pengganggu dalam plasma.

b. Pengukuran Batas Kuantitasi Terendah (LLOQ)

Larutan kurkumin dalam plasma dibuat dengan konsentrasi bertingkat dengan penambahan baku dalam Irbesartan (100 $\mu\text{g/ml}$), kemudian masing-masing larutan diekstraksi sesuai dengan cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih yaitu menggunakan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dan laju alir 1,0 mL/menit.

Dari data literatur (Vareed et al, 2008), diperoleh nilai LLOQ sebesar 75,0 ng/mL. Selanjutnya, larutan kurkumin dalam plasma dibuat dengan konsentrasi setengah atau seperempat dari nilai LLOQ literatur tersebut. Sebanyak 20,0 μL aliquot hasil ekstraksi disuntikkan ke alat KCKT. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai % *diff* dan koefisien variasinya (KV). LLOQ adalah kondisi terendah yang menunjukkan akurasi (nilai % *diff*) tidak lebih dari 20%, serta presisi (koefisien variasi) tidak lebih dari 20%.

c. Uji Selektivitas Metode Analisis dalam Plasma

Plasma yang mengandung kurkumin pada konsentrasi LLOQ disiapkan menggunakan enam plasma dari sumber yang berbeda. Selanjutnya dilakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih yaitu menggunakan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dan laju alir 1,0 mL/menit. Ada atau tidaknya gangguan (interferensi) ekstrak plasma di sekitar waktu retensi kurkumin dan baku dalam diamati, kemudian dihitung nilai presisi (koefisien variasi) dan akurasinya (% *diff*).

d. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Sampel blanko (plasma tanpa baku dalam), sampel *zero* (plasma dengan baku dalam), serta 6-8 sampel *non-zero* (plasma dengan analit termasuk LLOQ) dengan konsentrasi terpilih yaitu 20,6; 51,5; 103,0; 515,0; 1030,0; 2060,0; 4120,0 ng/mL disiapkan dengan penambahan baku dalam (Irbesartan 100 µg/ml). Ekstraksi dilakukan seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 µL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih yaitu menggunakan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dan laju alir 1,0 mL/menit. Setelah itu regresi perbandingan luas puncak (y) terhadap konsentrasi analit dalam plasma (x) dengan persamaan ($y = a + bx$) dari masing-masing konsentrasi dianalisis dan disiapkan kurva kalibrasinya.

e. Uji Linearitas

Dari data pengukuran pada pembuatan kurva kalibrasi, kemudian dianalisis dengan regresi luas puncak terhadap konsentrasi kurkumin dalam plasma dan diperoleh koefisien korelasi (r) yang menunjukkan linearitasnya.

f. Uji Akurasi dan Presisi

Larutan kurkumin dalam plasma konsentrasi rendah (62,04 ng/mL), sedang (1654,40 ng/mL), dan tinggi (3308,80 ng/mL) disiapkan dengan penambahan baku dalam (Irbesartan 100 µg/ml). Ekstraksi dilakukan seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 µL aliquot disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih yaitu menggunakan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dan laju alir 1,0 mL/menit. Prosedur tersebut diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi. Dari data yang diperoleh, dihitung perbedaan nilai terukur dengan nilai sebenarnya (% *diff*) dan nilai koefisien variasinya (KV) pada masing-masing konsentrasi. Uji akurasi dan presisi dilakukan secara *intra-day* dan *inter-day* selama lima hari.

g. Uji Perolehan Kembali (*% recovery*)

Larutan kurkumin dalam plasma konsentrasi rendah (62,04 ng/mL), sedang (1654,40 ng/mL), dan tinggi (3308,80 ng/mL) disiapkan dengan penambahan baku dalam (Irbesartan 100 µg/ml). Ekstraksi dilakukan seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 µL disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih yaitu menggunakan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dan laju alir 1,0 mL/menit. Prosedur tersebut diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi. Dari data yang diperoleh, dihitung perbandingan nilai terukur dari konsentrasi kurkumin dalam plasma dengan nilai yang sebenarnya (*% recovery*).

3.4.2.5 Uji Stabilitas

a. Stabilitas larutan stok

Dibuat larutan stok kurkumin dengan konsentrasi 5 µg/mL dan larutan baku dalam dengan konsentrasi 5 µg/mL. Kemudian larutan disimpan pada suhu kamar dengan rentang waktu 0, 6, dan 24 jam. Sebagian larutan disimpan pada lemari pendingin (suhu 4°C) dengan rentang waktu 0, 7, 14, 21, dan 28 hari. Sebanyak 20,0 µL aliquot larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih yaitu menggunakan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dan laju alir 1,0 mL/menit. Gejala ketidakstabilan zat dapat diamati dengan menghitung *% diff* dan mengamati luas puncak kromatogram. *% diff* dihitung dengan cara membandingkan respon instrumen dari larutan stok yang telah disimpan terhadap larutan stok yang disiapkan sesaat sebelum disuntikkan.

b. Stabilitas beku cair (*Freeze and Thaw stability*)

Larutan kurkumin dalam plasma konsentrasi rendah (62,04 ng/mL), dan tinggi (3308,08 ng/mL) disiapkan. Selanjutnya dilakukan tiga siklus beku-cair. Setelah itu, ditambahkan baku dalam (Irbesartan 100 µg/ml) dan dilakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel dan disuntikkan tiga aliquot sebanyak 20,0 µL untuk masing-masing konsentrasi ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih yaitu menggunakan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-

asam asetat (33:20:46:1) dan laju alir 1,0 mL/menit. Gejala ketidakstabilan zat dapat diamati dengan menghitung % *diff* dan mengamati luas puncak kromatogram.

c. Stabilitas suhu jangka pendek (*Short-Term Temperature Stability*)

Larutan kurkumin dalam plasma konsentrasi rendah (62,04 ng/mL), dan tinggi (3308,08 ng/mL) disiapkan. Selanjutnya larutan tersebut disimpan pada suhu kamar dengan rentang waktu 0, 6, dan 24 jam. Setelah itu, dilakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel dan disuntikkan tiga aliquot sebanyak 20,0 μ L untuk masing-masing konsentrasi ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih yaitu menggunakan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dan laju alir 1,0 mL/menit. Gejala ketidakstabilan zat dapat diamati dengan menghitung % *diff* dan mengamati luas puncak kromatogram.

d. Stabilitas jangka panjang (*Long-Term Temperature Stability*)

Larutan kurkumin dalam plasma konsentrasi rendah (62,04 ng/mL), dan tinggi (3308,08 ng/mL) disiapkan. Selanjutnya larutan tersebut disimpan pada lemari pendingin (-20 °C) selama penelitian berlangsung. Pada hari ke 0, 7, dan 14, larutan dianalisis dengan melakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga aliquot sebanyak 20,0 μ L untuk masing-masing konsentrasi ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih yaitu menggunakan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dan laju alir 1,0 mL/menit. Gejala ketidakstabilan zat dapat diamati dengan menghitung % *diff* dan mengamati luas puncak kromatogram.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penetapan Panjang Gelombang Analisis

Pada penelitian ini, pemilihan panjang gelombang analisis dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Senyawa zat aktif kurkumin dan baku dalam irbesartan dibuat spektrum serapannya dan kemudian dibuat *overlay* antara kedua spektrum tersebut. Spektrum serapan yang dihasilkan memperlihatkan bahwa kurkumin berada pada panjang gelombang sinar visual (sinar tampak) yaitu 420 nm sedangkan baku dalam irbesartan berada pada panjang gelombang sinar UV yaitu 250 nm sehingga diperoleh panjang gelombang optimum untuk analisis yaitu 257 nm. Tahap pemilihan panjang gelombang analisis tersebut diulangi untuk senyawa kalium losartan dan etinil estradiol. Panjang gelombang maksimum kedua senyawa yang diperoleh adalah 250 nm untuk kalium losartan dan 280 nm untuk etinil estradiol dimana spektrum serapan yang dihasilkan tidak berpotongan dengan spektrum serapan kurkumin sehingga tidak diperoleh panjang gelombang optimum.

Selanjutnya, penetapan panjang gelombang analisis dilakukan dengan menggunakan alat KCKT. Pada panjang gelombang optimum, luas puncak kurkumin yang diperoleh adalah sebesar 126315 dan luas puncak irbesartan sebesar 229853. Sedangkan pada panjang gelombang maksimum masing-masing, yaitu panjang gelombang 420 nm untuk kurkumin dan 250 nm untuk irbesartan, diperoleh luas puncak sebesar 622773 dan 239408 berturut-turut untuk kurkumin dan irbesartan. Sementara luas puncak untuk kalium losartan dan etinil estradiol adalah 171555 dan 34470. Hal inilah yang menjadi dasar mengapa pada penelitian ini digunakan dua panjang gelombang maksimum untuk masing-masing zat dengan gradien panjang gelombang pada menit ke-16.

Dilakukan gradien panjang gelombang untuk menganalisis kurkumin secara optimal agar diperoleh nilai LLOQ yang sekecil mungkin. Nilai LLOQ yang kecil menunjukkan semakin sensitifnya suatu metode analisis. Data luas puncak dan spektrum serapan senyawa zat aktif dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.1 sampai Gambar 4.3.

4.2 Optimasi Kondisi Analisis

4.2.1 Pemilihan Komposisi Fase Gerak

Pada tahap pemilihan komposisi fase gerak digunakan larutan kurkuminoid karena kurkumin merupakan salah satu dari tiga senyawa kurkuminoid. Oleh karena itu, kurkumin perlu dipisahkan terlebih dahulu dengan senyawa-senyawa kurkuminoid lainnya. Hal ini bertujuan agar kurkumin dapat dianalisis secara kuantitatif tanpa ada gangguan dari senyawa kurkuminoid lainnya (selektivitas dan spesifisitas) sehingga diharapkan metode analisis yang diperoleh dapat diaplikasikan untuk sediaan yang mengandung kurkumin dan kurkuminoid yang telah beredar.

Komposisi fase gerak sebagai kondisi awal adalah asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (49:20:30:1) (Sciborr, Eckert, Rimbach, & Frank, 2010) dengan laju alir 1,0 mL/menit. Pada kondisi ini senyawa kurkumin belum terpisah dari senyawa kurkuminoid lainnya dengan waktu retensi yang sangat singkat yaitu 6,050 menit. Kemudian komposisi fase gerak diubah menjadi asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (40:20:39:1) dan (33:20:46:1) masing-masing dengan laju alir 1,0 mL/menit.

Pada kondisi fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (40:20:39:1) dan laju alir 1,0 mL/menit, kurkumin belum terpisah sepenuhnya dari senyawa kurkuminoid lainnya. Pada kondisi asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dan laju alir 1,0 mL/menit, kurkumin dapat terpisah dengan baik dari senyawa kurkuminoid lainnya dengan waktu retensi (t_R) 21,317 menit, faktor ikutan (T_f) 1,15, resolusi (R) 2,47, jumlah lempeng teoritis (N) 8787,23 dan HETP 0,0284.

Dari hasil percobaan, komposisi fase gerak tersebut memberikan jumlah lempeng teoritis yang besar, nilai HETP yang kecil, faktor ikutan mendekati satu (simetris), dan dengan kondisi fase gerak ini pada kromatogram plasma blanko tidak ada puncak yang mengganggu pada waktu retensi kurkumin. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan Tabel 4.3

4.2.2 Penentuan Waktu Retensi

Baku dalam yang hendak diujikan pada penelitian ini adalah etinil estradiol, irbesartan, dan kalium losartan. Dengan menggunakan sistem yang telah terpilih sebelumnya, disuntikkan larutan standar kurkumin, etinil estradiol, irbesartan, dan kalium losartan masing-masing 10,0 µg/mL ke alat KCKT. Untuk memastikan pemisahan ketiga baku dalam yang diuji dengan kurkumin, sebanyak 20 µL aliquot larutan kurkumin, etinil estradiol, irbesartan, dan kalium losartan masing-masing disuntikkan ke alat KCKT menggunakan komposisi fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (49:20:30:1), asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (40:20:39:1), asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1).

Pada komposisi fase gerak pertama yaitu asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (49:20:30:1) waktu retensi yang diperoleh untuk kurkumin adalah 6,050 menit, etinil estradiol 5,675 menit, irbesartan 4,633 menit, dan kalium losartan 4,492 menit. Sedangkan pada komposisi fase gerak kedua yaitu asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (40:20:39:1) waktu retensi yang diperoleh untuk kurkumin adalah 10,553 menit, etinil estradiol 8,742 menit, irbesartan 6,853 menit, dan kalium losartan 6,300 menit. Sementara pada komposisi fase gerak ketiga yaitu asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) waktu retensi yang diperoleh untuk kurkumin adalah 21,200 menit, etinil estradiol 14,250 menit, irbesartan 10,883 menit, dan kalium losartan 9,458 menit.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa pada komposisi fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) ketiga senyawa yang diujikan dapat digunakan sebagai baku dalam karena memiliki pemisahan yang baik terhadap kurkumin. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.5, Gambar 4.7, dan Gambar 4.9.

4.2.3 Pemilihan Baku Dalam untuk Analisis Kurkumin dalam Plasma *In Vitro*

Penelitian ini mengadaptasi metode analisis yang telah dipublikasikan oleh Vareed et al. (2008), metode tersebut menggunakan β -17-estradiol asetat sebagai baku dalam. Namun, senyawa β -17-estradiol asetat sulit diperoleh sehingga senyawa yang dipilih sebagai baku dalam adalah etinil estradiol yang mempunyai kemiripan struktur dengan β -17-estradiol asetat.

Selanjutnya, etinil estradiol diekstraksi di dalam plasma secara *in vitro*, dan dianalisis dengan komposisi fase gerak terpilih, hasilnya etinil estradiol terekstraksi dengan baik pada waktu retensi 14,758 menit. Awalnya, pada penelitian ini hanya digunakan etinil estradiol sebagai baku dalam, tetapi pada pelaksanaannya ternyata penggunaan etinil estradiol sebagai baku dalam ini menemui kendala. Kendala tersebut yaitu pada plasma blanko terdapat gangguan di sekitar waktu retensi etinil estradiol dan sulit untuk dihilangkan sehingga perlu dilakukan percobaan menggunakan senyawa lain sebagai baku dalam.

Berdasarkan kondisi dan bahan yang terdapat di laboratorium dan ditunjang dengan studi literatur, diperoleh dua senyawa yang selanjutnya diujikan sebagai baku dalam yaitu irbesartan dan kalium losartan. Dari literatur (Ganesan, Nanjundan, Gomathi & Muralidharan, 2010), senyawa irbesartan dan kalium losartan dapat diekstraksi menggunakan larutan pengeksrak etil asetat & n-heksan (80:20) dengan fase gerak metanol-dapar ammonium format (20:80). Untuk melihat apakah irbesartan dapat dianalisis dengan sistem yang telah dipilih sebelumnya, maka kedua senyawa ini diekstrak menggunakan larutan pengeksrak etil asetat-metanol (95:5) dan disuntikkan ke dalam KCKT menggunakan komposisi fase gerak terpilih yaitu asetnitril-metanol-aqua bidestilata-asam asetat (33:20:46:1).

Dari percobaan yang telah dilakukan, irbesartan dan kalium losartan terekstraksi dari plasma. Waktu retensi dari irbesartan 10,550 menit dan kalium losartan 9,750 menit. Hasil tersebut kemudian dibandingkan dengan plasma blanko untuk melihat ada tidaknya pengganggu disekitar kromatogram baku dalam. Setelah plasma blanko dengan kromatogram dan gangguan disekitar waktu retensi dari kedua jenis baku dalam dibandingkan, diperoleh kesimpulan bahwa disekitar waktu retensi kalium losartan terdapat gangguan-gangguan dari plasma

sehingga baku dalam terpilih adalah irbesartan dimana tidak ada gangguan disekitar waktu retensi irbesartan. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Gambar 4.10 sampai Gambar 4.12.

Rumus struktur irbesartan tidak serupa dengan rumus struktur senyawa yang kurkumin. Namun, penggunaan irbesartan sebagai baku dalam dapat diterima karena sifat dan karakteristik irbesartan memenuhi kriteria untuk penggunaan baku dalam pada KCKT berdasarkan Johnson dan Stevenson.

Baku dalam digunakan untuk mengurangi kesalahan selama proses analisis, khususnya kesalahan pada saat melakukan ekstraksi obat dari plasma dan kesalahan dalam volume suntikan, yang akan mempengaruhi luas puncak yang dihasilkan. Penyimpangan kecil selama proses analisis dapat berdampak besar bagi kesalahan hasil analisis, sehingga penambahan baku dalam dapat membantu mengurangi penyimpangan-penyimpangan tersebut. Senyawa baku yang diketahui jumlahnya ditambahkan pada senyawa uji, kemudian campuran itu dibuat untuk disuntikkan ke KCKT dan dianalisis pada kondisi terpilih. Luas puncak baku dalam harus terpisah dengan luas puncak analit, pemisahan yang baik yaitu bila nilai resolusi lebih dari 1,5 (Johnson & Stevenson, 1991). Pertimbangan lain adalah puncak pengotor atau gangguan dari plasma tidak boleh mengganggu puncak dari baku dalam.

4.2.4 Pemilihan Kecepatan Aliran Fase Gerak untuk Analisis

Selanjutnya dilakukan optimasi kecepatan aliran fase gerak terpilih. Laju alir yang digunakan semula adalah 1,0 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 0,8 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Laju alir terpilih adalah 1,0 mL/menit karena memberikan nilai R, Tf, N dan HETP yang baik. Nilai resolusi (R) yang diperoleh yaitu 16,46, faktor ikutan (Tf) 1,12, jumlah lempeng teoritis (N) 10373,34, dan HETP 0,0241.

Pada kondisi laju alir 0,8 mL/menit, waktu analisis yang diperlukan lebih lama dari laju alir 1,0 mL/menit sehingga mengurangi efisiensi waktu analisis. Pada kondisi laju alir 1,2 mL/menit, waktu retensi dari baku dalam terlalu singkat sehingga dikhawatirkan akan terganggu oleh adanya pengotor/gangguan dari plasma. Data dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.13 sampai Gambar 4.15.

4.2.5 Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem ini perlu dilakukan sebelum metode analisis terpilih dilaksanakan. Secara normal terdapat variasi dalam peralatan dan teknik analisis sehingga uji kesesuaian sistem perlu dilakukan untuk memastikan sistem operasional akhir adalah efektif dan memberikan hasil yang sesuai dengan tujuan analisis. Selain itu, uji ini dapat memberikan jaminan bahwa sistem kromatografi yang digunakan akan bekerja dengan baik selama analisis berlangsung.

Dari hasil analisis 5 kali penyuntikan, dihitung perbandingan luas puncak antara zat aktif dengan baku dalam. Diperoleh nilai koefisien variasi dari perbandingan luas puncak adalah sebesar 0,51%. Data uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.5.

4.3 Optimasi dan Cara Penyiapan Sampel

Sebelum dianalisis menggunakan KCKT, kurkumin dalam plasma perlu diekstraksi terlebih dahulu dari komponen plasma yang mengganggu, khususnya protein. Ekstraksi kurkumin dalam plasma dilakukan dengan cara ekstraksi cair-cair menggunakan campuran larutan etil asetat-metanol (95:5). Penyiapan sampel dengan menggunakan ekstraksi cair cair ini bertujuan untuk memisahkan analit dari gangguan yang ada dalam plasma seperti protein dan senyawa endogen lainnya. Selain itu juga untuk memekatkan analit karena adanya tahap penguapan agar diperoleh hasil yang sensitif.

Pertama-tama, 0,5 mL plasma yang mengandung kurkumin dengan konsentrasi tertentu ditambahkan 40 μ L baku dalam Irbesartan (100 μ g/mL) dan dikocok menggunakan vortex selama 30 detik agar tercampur. Selanjutnya ditambahkan larutan pengestrak etil asetat-metanol (95:5), penambahan larutan pengestrak ini bertujuan untuk menarik kurkumin dari plasma. Proses ekstraksi dipengaruhi oleh volume larutan pengestrak yang ditambahkan, oleh karena itu perlu dilakukan optimasi volume penambahan larutan pengestrak agar kurkumin dalam plasma terekstraksi dengan baik. Berdasarkan percobaan, luas puncak kurkumin dan gangguan yang terdapat pada kromatogram dari variasi volume penambahan larutan pengestrak dibandingkan. Jumlah larutan pengestrak yang dipilih adalah 2,0 mL yaitu 4 kali jumlah plasma dimana luas puncak yang

dihasilkan besar dan tidak terdapat gangguan dari plasma. Sedangkan volume larutan pengestrak 1,0 mL luas puncak yang dihasilkan kecil dan terdapat gangguan disekitar waktu retensi kurkumin sehingga mengganggu analisis. Pada jumlah larutan pengestrak 3,0 mL, luas puncak yang dihasilkan lebih kecil dan tidak terdapat gangguan dari plasma.

Setelah itu, plasma yang telah ditambahkan larutan pengestrak dikocok menggunakan vortex. Pada tahap pengocokan ini, terjadi proses penarikan kurkumin dari plasma oleh etil asetat-metanol (95:5) sehingga perlu dilakukan optimasi waktu pengocokan dengan vortex agar kurkumin yang ditarik dari plasma optimal. Waktu pengocokan dengan vortex terpilih adalah 3 menit karena memberikan luas puncak lebih besar dibandingkan dengan waktu pengocokan dengan vortex selama 1 dan 2 menit. Data optimasi penyiapan sampel lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.6 dan Tabel 4.7

Tahap selanjutnya adalah sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Sentrifugasi berfungsi untuk memisahkan larutan sehingga larutan pengestrak terpisah dari protein-protein plasma setelah proses pengocokan. Setelah itu, lapisan organik diambil dan dipisahkan. Kemudian dikeringkan menggunakan gas nitrogen suhu 60 °C. Hal tersebut bertujuan untuk menguapkan etil asetat karena sifat etil asetat yang nonpolar dapat merusak kolom C₁₈. Ekstrak kering yang dihasilkan direkonstitusi dalam 200 µL fase gerak dan dikocok dengan vortex selama 30 detik serta disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Selanjutnya, sebanyak 20 µL aliquot disuntikkan ke dalam KCKT. Penguapan etil asetat dan rekonstitusi dalam sejumlah kecil fase gerak berperan menambah kepekatan kurkumin sehingga diharapkan metode yang digunakan lebih sensitif.

4.4 Validasi Metode Analisis Kurkumin dalam Plasma *In Vitro*

4.4.1 Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma/Uji Spesifisitas

Uji interferensi dilakukan untuk melihat kemungkinan adanya gangguan dari protein plasma pada waktu retensi zat aktif dan baku dalam. Uji ini dilakukan dengan melakukan ekstraksi cair-cair pada plasma kosong seperti pada cara penyiapan sampel. Setelah diekstraksi dan diperoleh supernatan hasil ekstraksi,

sebanyak 20 μ L aliquot disuntikkan ke dalam KCKT. Hasil uji spesifitas diperoleh puncak-puncak gangguan dari protein pada waktu retensi tertentu. Puncak gangguan terakhir terdapat pada menit ke 9,65 sehingga diharapkan tidak mengganggu kromatogram zat aktif dan baku dalam. Hasil pengotoran plasma dapat dilihat pada Gambar 4.16.

4.4.2 Batas Kuantitasi Terendah (LLOQ)

LLOQ merupakan standar terendah pada kurva kalibrasi yang dapat diterima dengan syarat respon analit pada LLOQ minimal lima kali respon sampel blanko dan puncak analit dapat diidentifikasi, tidak ada gangguan, reproduisibel dengan presisi 20% dan akurasi 80-120% (FDA, 2001). Semakin kecil nilai LLOQ menunjukkan semakin sensitifnya suatu metode analisis. Dalam analisis kadar obat dalam plasma, diperlukan suatu metode yang cukup sensitif yang dapat mengukur hingga konsentrasi terkecil obat dalam plasma.

Pada penelitian ini, konsentrasi LLOQ yang dibuat adalah 10,3 ng/mL dan 20,6 ng/mL. Konsentrasi tersebut berdasarkan rentang kurva kalibrasi literatur (Vareed et al, 2008) dengan nilai LLOQ 75 ng/mL. LLOQ yang diperoleh adalah 20,6 ng/mL. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.8.

Dari data dapat dilihat bahwa % *diff* yang didapat dari konsentrasi 20,6 ng/mL ini memenuhi persyaratan yaitu tidak lebih dari 20%. Nilai % *diff* antara -0,13% sampai 10,24%.

4.4.3 Uji Selektivitas Metode Analisis dalam Plasma

Dari hasil uji selektivitas yang dilakukan terhadap enam blanko plasma manusia yang berbeda pada konsentrasi LLOQ yaitu 20,6 ng/mL, diperoleh nilai koefisien variasinya (KV) 4,14% dan % *diff* antara -5,60% sampai 6,24% serta tidak ada gangguan dari senyawa lain atau komponen endogen plasma pada kromatogram. Data hasil uji selektivitas dapat dilihat pada Tabel 4.9.

Uji selektivitas ini bertujuan untuk melihat kemampuan suatu metode analisis dalam membedakan dan mengukur kadar analit dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel (matriks biologis) (FDA, 2001).

4.4.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Untuk analisis kurkumin dalam plasma, kurva kalibrasi dibuat pada rentang konsentrasi 20,6 – 4120,0 ng/mL. Kurva kalibrasi terdiri dari plasma blanko (plasma tanpa penambahan kurkumin dan baku dalam), plasma *zero* (plasma dengan penambahan baku dalam) dan 7 konsentrasi kurkumin dalam plasma (termasuk LLOQ) dengan penambahan baku dalam yaitu 20,6; 51,5; 103,0; 515,0; 1030,0; 2060,0; dan 4120,0 ng/mL. Pada penelitian ini, kurva kalibrasi dibuat setiap hari selama analisis berlangsung untuk mencegah terjadinya kesalahan akibat perbedaan kondisi alat KCKT antar hari.

Berdasarkan hasil perhitungan statistik regresi linear diperoleh persamaan garis kurva kalibrasi $y = 0,0007 - 0,0020 x$; dimana x adalah konsentrasi kurkumin dan y adalah perbandingan luas puncak kurkumin dengan baku dalam. Kurva kalibrasi dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.20. Data kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.10.

4.4.5 Uji Linearitas

Linearitas didapat dari kurva kalibrasi kurkumin dalam plasma. Linearitas kurkumin dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.20. Data hasil pengujian linearitas dapat dilihat pada Tabel 4.10.

Dari pembuatan kurva kalibrasi, diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0007 - 0,0020 x$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9999$. Maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis kurkumin dalam plasma dengan rentang konsentrasi lebih kurang 20,6 - 4120,0 ng/mL memenuhi kriteria uji linearitas dan dapat diterima untuk suatu metode analisis yang *valid*.

4.4.6 Uji Akurasi dan Presisi

Uji akurasi bertujuan memperoleh data kedekatan hasil pengujian dengan kadar sebenarnya. Uji presisi bertujuan memperoleh data kedekatan antara hasil pengujian yang satu dengan yang lainnya. Pada penelitian ini, uji akurasi dan presisi dilakukan selama 5 hari dan pengukurannya dilakukan selama satu hari (*intra-day*) dan selama 5 hari (*inter-day*)

Untuk uji akurasi dan presisi digunakan plasma yang mengandung kurkumin dengan 3 konsentrasi yaitu konsentrasi rendah, sedang dan tinggi (FDA, 2001). Konsentrasi rendah merupakan tiga kali dari nilai konsentrasi LLOQ. Konsentrasi sedang adalah setengah dari nilai konsentrasi LLOQ ditambah konsentrasi ULOQ. Sedangkan konsentrasi tinggi adalah 80% dari nilai ULOQ. Dari perhitungan, didapatkan konsentrasi rendah 62,04 ng/mL, konsentrasi sedang 1654,40 ng/mL dan konsentrasi tinggi 3308,80 ng/mL.

Untuk uji akurasi dan presisi, persyaratan yang harus dipenuhi yaitu % *diff* dan KV tidak lebih dari 15% untuk masing-masing konsentrasi selama satu hari (*intra-day*) serta nilai % *diff* dan KV dari tiap konsentrasi tidak berubah secara signifikan dari hari ke hari (*inter-day*).

Uji akurasi dan presisi intra hari pada hari pertama diperoleh nilai % *diff* dan KV berturut-turut -8,14% sampai 13,26% dan 4,67% untuk konsentrasi rendah, 4,71% untuk konsentrasi rendah dan 6,53% untuk konsentrasi tinggi. Data % *diff* dan KV untuk uji akurasi dan presisi intra hari selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.11 sampai Tabel 4.15. Sedangkan data % *diff* dan KV untuk uji akurasi dan presisi antar hari dapat dilihat pada Tabel 4.16. Dari hasil percobaan, uji akurasi dan presisi yang telah dilakukan untuk analisis kurkumin dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan.

4.4.7 Uji Perolehan Kembali (% *recovery*)

Uji perolehan kembali bertujuan untuk mengamati perbandingan respon detektor analit yang diekstraksi dari sampel biologis dengan respon detektor kadar yang sebenarnya. Perolehan kembali dari analit tidak perlu 100% tetapi perolehan kembali dari analit dan baku dalam harus konsisten, presisi, dan reproduibel (FDA, 2001).

Pada uji perolehan kembali digunakan plasma yang mengandung kurkumin dengan 3 konsentrasi yaitu konsentrasi rendah 62,04 ng/mL, konsentrasi sedang 1654,40 ng/mL dan konsentrasi tinggi 3308,80 ng/mL. Berdasarkan percobaan, perolehan kembali untuk konsentrasi rendah 88,17% - 113,28% , sedang 88,03% - 114,59% dan tinggi 91,86% - 113,14% dengan nilai % *diff* -11,97% sampai 14,59% serta nilai KV 6,82%, 8,40% dan 6,82 untuk

Universitas Indonesia

konsentrasi tinggi, sedang, dan rendah. Data hasil uji perolehan kembali dapat dilihat pada Tabel 4.17

Dari hasil percobaan, nilai persen perolehan kembali yang telah dilakukan untuk analisis kurkumin dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan yaitu konsisten, presisi, dan reproduibel.

4.5 Uji Stabilitas

4.5.1 Stabilitas larutan stok

Pengujian dilakukan larutan stok yang mengandung kurkumin dan irbesartan dengan konsentrasi masing-masing 5,0 µg/mL. Uji ini dilakukan untuk melihat kestabilan larutan stok selama penelitian berlangsung. Apabila stabil, larutan stok tidak perlu dibuat baru pada setiap analisis. Hasil pengujian menunjukkan kestabilan larutan kurkumin pada suhu kamar dalam rentang waktu 0, 6, dan 24 jam dan penyimpanan pada lemari pendingin (4°C) dalam rentang waktu 0 sampai 28 hari. Hal ini ditunjukkan dari nilai % *diff* yang tidak lebih dari 15% yaitu antara -1,67% sampai 0,77%. Data hasil uji stabilitas larutan stok dapat dilihat pada Tabel 4.18.

4.5.2 Stabilitas beku cair (*Freeze and Thaw stability*)

Uji stabilitas beku cair dilakukan pada dua konsentrasi, yaitu konsentrasi rendah (62,04 ng/mL) dan tinggi (3308,80 ng/mL). Sebanyak 0,5 mL plasma dengan konsentrasi rendah dan tinggi dibekukan di dalam lemari pendingin selama 12-24 jam. Kemudian dicairkan pada suhu ruang dan proses tersebut diulang sebanyak tiga kali. Pada siklus beku dan cair ketiga, plasma diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel dan disuntikkan ke alat KCKT. Hasil pengujian menunjukkan kestabilan dengan % *diff* dan KV tidak melampaui 15% yaitu -13,83% sampai 5,02% untuk % *diff* dan 1,48% serta 4,35% untuk KV. Data hasil uji stabilitas beku cair dapat dilihat pada Tabel 4.19.

4.5.3 Stabilitas suhu jangka pendek (*Short-Term Temperature Stability*)

Pengujian dilakukan terhadap dua konsentrasi, yaitu konsentrasi rendah (62,04 ng/mL) dan konsentrasi tinggi (3308,80 ng/mL). Hasil pengujian menunjukkan kestabilan larutan kurkumin dalam plasma pada suhu kamar, yang ditunjukkan dari nilai % *diff* yang tidak lebih dari 15% yaitu antara -14,46% sampai 13,01 %. Data hasil uji stabilitas jangka pendek dapat dilihat pada Tabel 4.20.

4.5.4 Stabilitas jangka panjang (*Long-Term Temperature Stability*)

Stabilitas jangka panjang dilakukan pada hari ke-7 dan 14 terhadap dua konsentrasi yaitu konsentrasi rendah (62,04 ng/mL) dan konsentrasi tinggi (3308,80 ng/mL). Hasil pengujian menunjukkan bahwa kurkumin masih stabil selama 14 hari dengan % *diff* yang tidak lebih dari 15% yaitu antara -14,81% sampai 13,44%. Data hasil uji stabilitas jangka panjang dapat dilihat pada Tabel 4.21.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

5.1.1 Kondisi optimum untuk analisis kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan irbesartan sebagai baku dalam menggunakan KCKT dengan detektor UV, kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 µm ukuran partikel 5µm adalah menggunakan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1) dengan laju alir 1,0 mL/menit menggunakan irbesartan sebagai baku dalam, dimana deteksi dilakukan pada panjang gelombang 420 nm dan 250 nm untuk kurkumin dan irbesartan. Gradien panjang gelombang dilakukan pada menit ke-16. Pada proses optimasi ekstraksi kurkumin dalam plasma, hasil ekstraksi terbaik ditunjukkan melalui proses penambahan volume pengekstrak etil asetat-metanol (95:5) sebanyak 2 mL dan waktu pengocokkan dengan vortex selama 3 menit.

5.1.2 Dari hasil validasi diperoleh nilai LLOQ sebesar 20,60 ng/mL, pada rentang konsentrasi 20,60 – 4120,00 ng/mL dihasilkan kurva kalibrasi kurkumin yang linear dengan koefisien korelasi (r) 0,9999, akurasi (% *diff*) dari metode ini antara -11,97% hingga 14,59 % dengan presisi (KV) antara 1,17% hingga 8,51%, dan nilai uji perolehan kembali antara 88,03% hingga 114,59%. Hasil validasi tersebut memperlihatkan bahwa metode analisis telah memenuhi kriteria akurasi, presisi, linearitas, selektivitas, dan stabilitas sesuai ketentuan yang berlaku sehingga dapat digunakan untuk analisis kurkumin dalam plasma.

5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk dapat dilakukan analisis kurkumin dalam plasma *in vitro* menggunakan baku dalam yang memiliki panjang gelombang visual yaitu 380-900 nm. Diharapkan dengan penggunaan baku dalam tersebut, tidak perlu dilakukan gradien panjang gelombang ketika analisis berlangsung.

DAFTAR ACUAN

- Aggarwal, B. B., et al. (2007). Curcumin-Biological and Medicinal Properties. *Dalam: Turmeric: The Genus Curcuma*. USA: CRC Press.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., & Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Mol Pharmaceutics*, 4, 6, 807-818
- Antony, B., Merina, B., Iyer, V.S., Judy, N., Lennertz, K., & Joyal, S. (2008). A Pilot Cross-Over Study to Evaluate Human Oral Bioavailability of BCM-95® CG (Biocurcumax™), A Novel Bioenhanced Preparation of Curcumin. Desember 10, 2010. <http://www.bcm95.com/pdf/Cross-Over-Study.pdf>
- Badmaev, V., & Majeed, M. (2009). *Curcumins from Curcuma longa in Disease Preventive and Treatment*. Januari 10, 2011. http://www.quintehealthsolutions.com/Sabinsa-Kurkumins_From_Curcuma-2009.pdf
- Chamberlain, J. (1985). *Analysis of Drugs in Biological Fluids*. Florida, USA: CRC Press.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., & Banerjee, R. K. (2004). Turmeric and Curcumin: Biological Actions and Medicinal Applications. *Current Science*, Vol. 87, No. 1, 10 July 2004
- Croom, K. F., Curran, M. P., Goa, K. L., Perry, C. M. (2004). *Irbesartan: A Review of Its Use in Hypertension and In The Management of Diabetic Nephropathy*, Vol. 64, 999-1028
- Evans, G. (2004). *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. USA: CRC Press.
- Food and Drug Administration. (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. Desember 15, 2010. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar

- Ganesan, M., Nanjundan, S., Gomathi, M., & Muralidharan, S. (2010). Method Development and Validation of Irbesartan using LCMS/MS: Application to Pharmacokinetic Studies. *J. Chem. Pharm*, 2, 740-746
- Gilman, A.G., et al. (2006). *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (11th ed.). USA: Macmillan Publishing.
- Goel, A., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2008). Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology*, 75, 787–809
- Harahap, Y. (2010). *Peran Bioanalisis dalam Penjaminan Kualitas Obat dan Peningkatan Kualitas Hidup Pasien*. Jakarta: UI Press
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Hasibuan, C. (2009). Optimasi Penetapan Kadar Andrografolid dan Kurkuminoid dalam Campuran Ekstrak *Andrographis paniculata* dan *Curcuma domestica* secara Kromatografi Lapis Tipis Densitometri. Depok: Skripsi: Progam Sarjana Farmasi FMIPA UI.
- Heath, D. D., Pruitt, M. A., Brenner, D. E., Rock, C. L. (2003). Curcumin in Plasma and Urine: Quantitation by High-Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr B*, 783, 287–295
- Johnson, E. L., & Stevenson, R. (1991). *Dasar Kromatografi Cair* (Kosasih Padmawinata, Penerjemah). Bandung: Penerbit ITB.
- Lacy, C. F., Armstrong, L. L., Goldman, M. P., & Lance, L. L. (2005). *Drug Information Handbook* (13th ed). USA: Lexi-Comp Inc.
- Martindale* (34th ed). (2005). London: Pharmaceutical Press London.
- Oktora, L., (2006). Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. III, No.1, April 2006, 01 - 07
- Parwa, B. (1991). *Analisis Farmasi: Metode Modern*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Sharma, R. A., Gescher, A.J., & Steward, W.P. (2005). Curcumin: The Story So Far. *European Journal of Cancer*, 41, 1955–1968

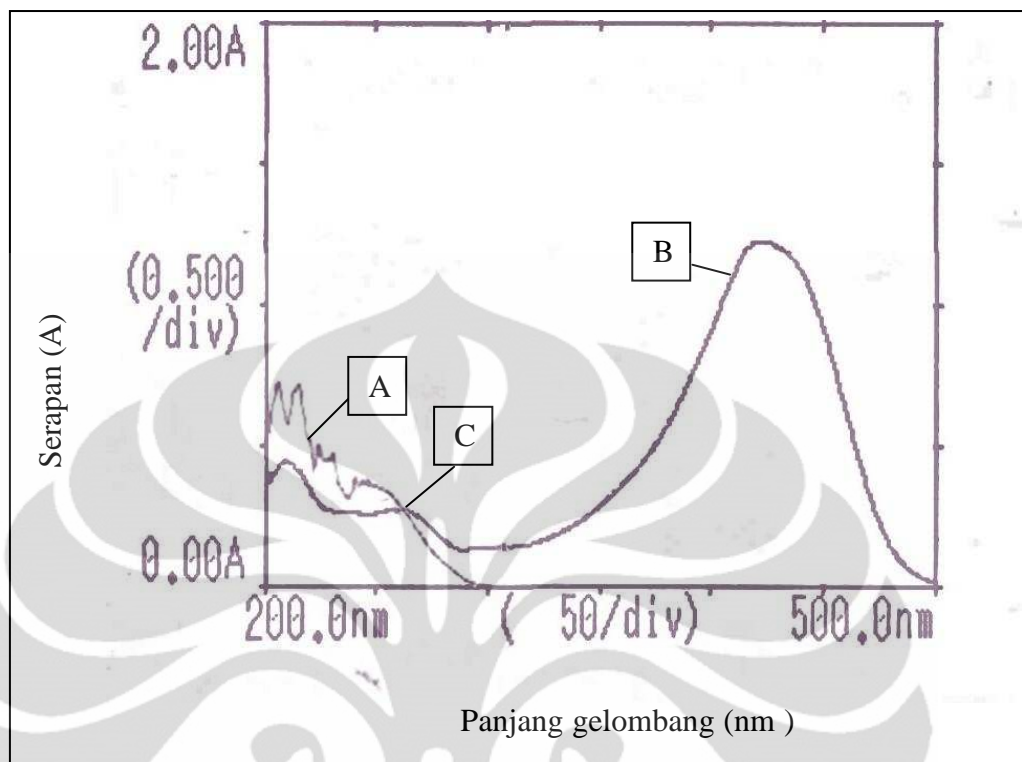
- Schiborr, C., Eckert, G. P., Rimbach, G., & Frank, J. (2010). A Validated Method for The Quantification of Curcumin in Plasma and Brain Tissue by Fast Narrow-Bore High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Anal Bioanal Chem*, 397, 1917–1925
- Singh, S.P., Wahajuddin, & Jain, G.K. (2010). Determination of Curcumin in Rat Plasma by Liquid–Liquid Extraction using LC–MS/MS with Electrospray Ionization: Assay Development, Validation and Application to a Pharmacokinetic Study. *J Bioanal Biomed*, 2, 079–084.
- Sethi, P., Dua, V. K., Mohanty, S., Mishra, S. K., Jain, R., & Edwards, G. (2009). Development and Validation of a Reversed Phase HPLC Method for Simultaneous Determination of Curcumin and Piperine in Human Plasma for Application in Clinical Pharmacological Studies. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32, 2961–2974
- Sukandar, E. Y. (2006). *Tren dan Paradigma Dunia Farmasi, Industri-Klinik-Teknologi Kesehatan, disampaikan dalam orasi ilmiah Dies Natalis ITB*. Desember 15, 2010. http://www.itb.ac.id/focus/focus_file/orasi-ilmiah-dies-45.pdf
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (1997). *Practical HPLC Method Development* (2nd ed.). USA: John Wiley & Sons.
- Tanaman Obat Indonesia. (n.d). Januari 15, 2010. http://www.iptek.net.id/ind/pd_tanobat/view.php?id=2
- The Merck Index* (14th ed). (2006). USA. Merck Research Laboratories.
- United States of Pharmacopeia* (30th ed). (2006). USA. The United States Pharmacopeial Convention
- Vareed S. K. (2008). Pharmacokinetics of Curcumin Conjugate Metabolites in Healthy Human Subjects. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17, 1411–1417
- WHO Monograph on Selected Medicinal Plants* (1st vol). (1999). Malta: Interprint



Keterangan gambar :

- A. Wadah penampung fase gerak
- B. Penghilang gas (DGU-12A VP, Shimadzu)
- C. Kromatografi cair kinerja tinggi (LC-10AD VP, Shimadzu)
- D. Injektor manual
- E. Detektor UV (SPD-10A VP, Shimadzu)
- F. Pengendali sistem (SCL-10A VP, Shimadzu)
- G. Oven Kolom (HPLC Oven TC 1900)
- H. Komputer dengan perangkat lunak Class VP

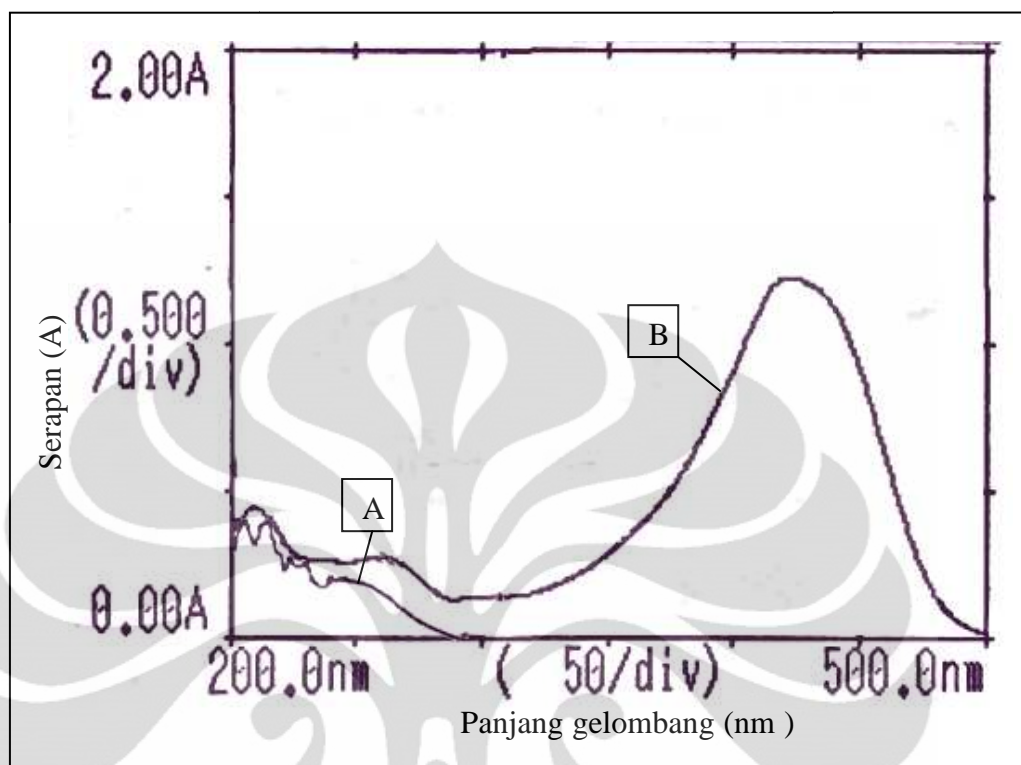
Gambar 3.1 Peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)



Keterangan

- A. Irbesartan
 Konsentrasi : 10,20 $\mu\text{g/mL}$
 Serapan : 0,4067 A
 Panjang gelombang maksimum : 250 nm
- B. Kurkumin
 Konsentrasi : 10,04 $\mu\text{g/mL}$
 Serapan : 1,3338 A
 Panjang gelombang maksimum : 420 nm
- C. Panjang gelombang optimum : 257 nm

Gambar 4.1. Spektrum Serapan Kurkumin dan Irbesartan pada spektrofotometer UV-Vis



Keterangan

A. Kalium Losartan

Konsentrasi : 10,71 $\mu\text{g/mL}$

Serapan : 0,1898 A

Panjang gelombang maksimum : 250 nm

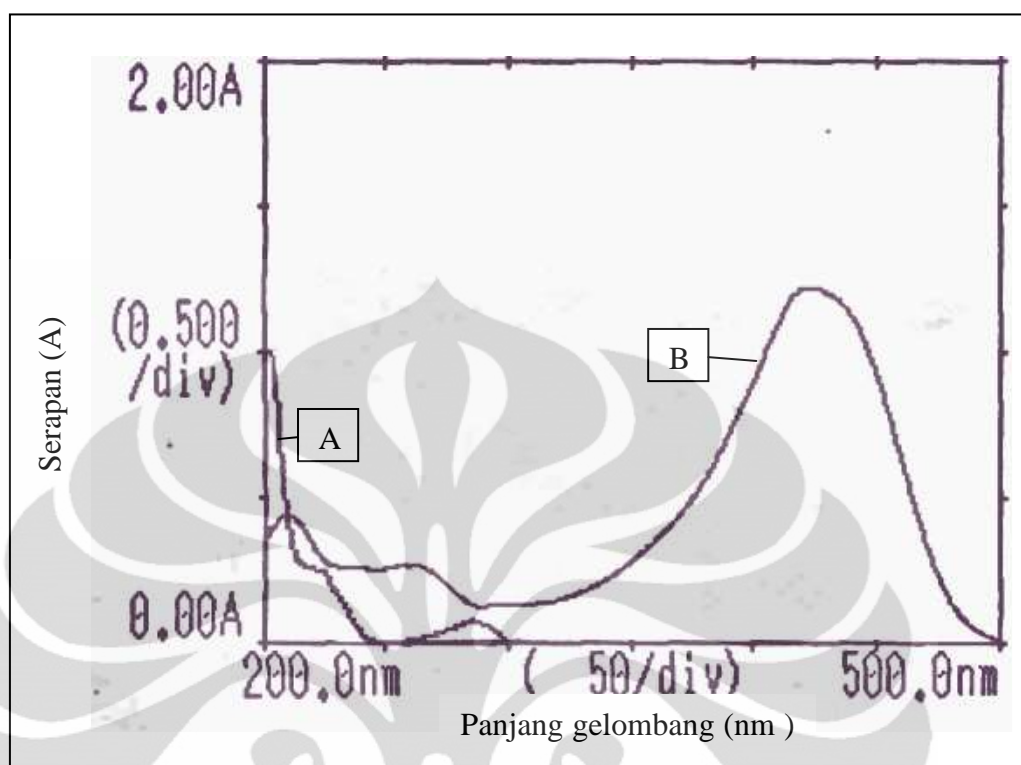
B. Kurkumin

Konsentrasi : 10,04 $\mu\text{g/mL}$

Serapan : 1,3338 A

Panjang gelombang maksimum : 420 nm

Gambar 4.2. Spektrum Serapan Kurkumin dan Kalium Losartan pada spektrofotometer UV-Vis



Keterangan

A. Etinil Estradiol

Konsentrasi : 10,07 $\mu\text{g/mL}$

Serapan : 0,0732 A

Panjang gelombang maksimum : 280 nm

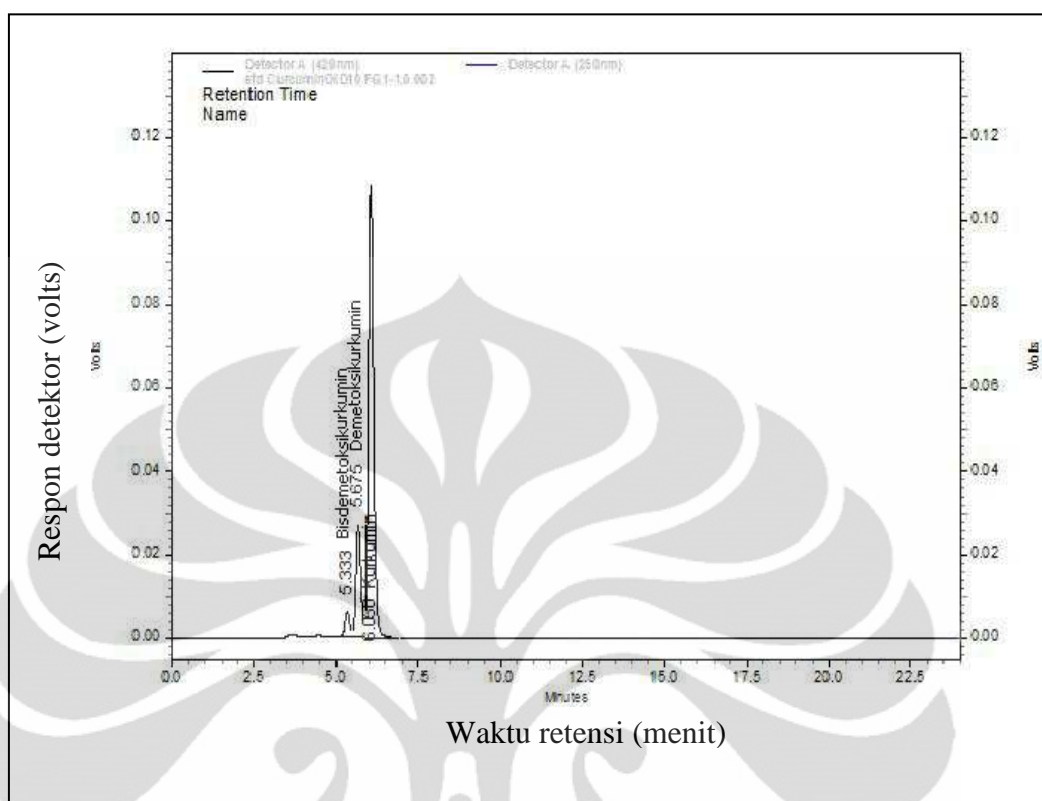
B. Kurkumin

Konsentrasi : 10,04 $\mu\text{g/mL}$

Serapan : 1,3338 A

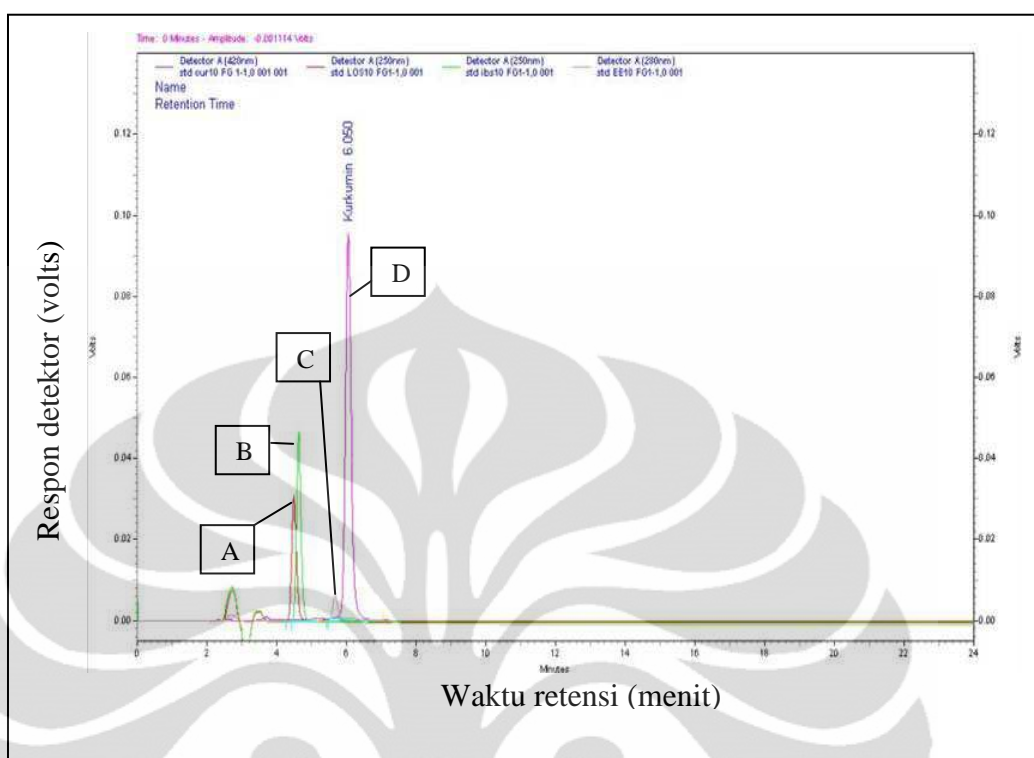
Panjang gelombang maksimum : 420 nm

Gambar 4.3. Spektrum Serapan Kurkumin dan Etinil Estradiol pada spektrofotometer UV-Vis



Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (49:20:30:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 420 nm; volume penyuntikan 20,0 µL

Gambar 4.4 Kromatogram larutan standar kurkuminoid dengan konsentrasi 10 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (49:20:30:1)

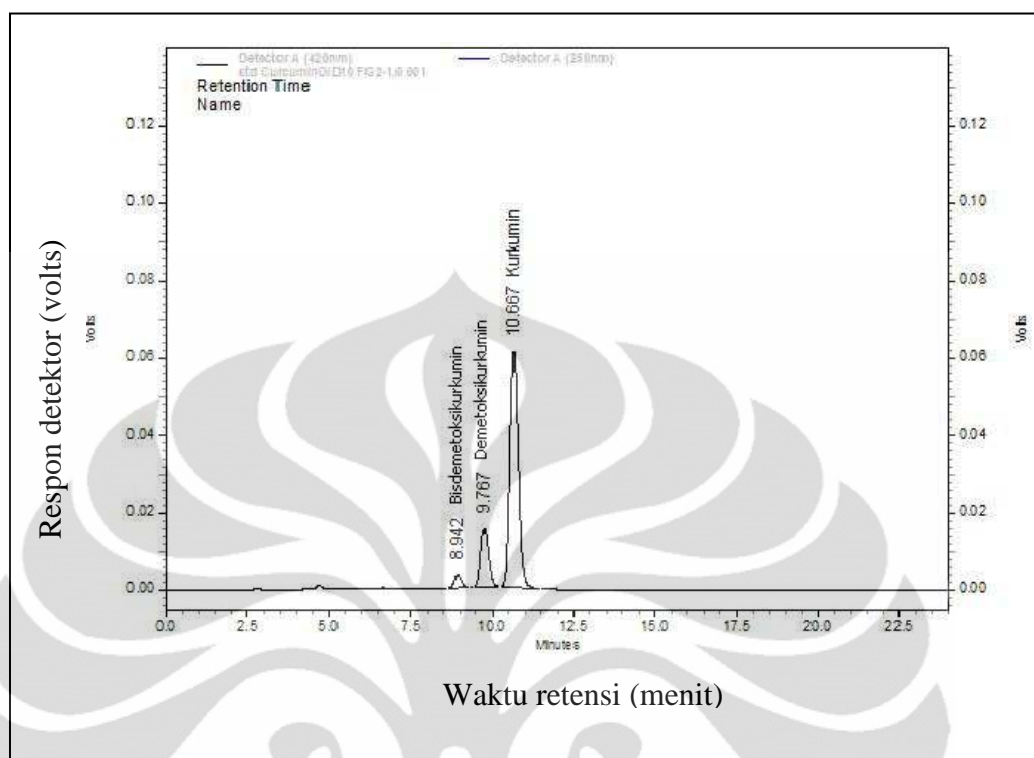


Kondisi: kolom C_{18} Kromasil[®] 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 μm , fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (49:20:30:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm untuk kalium losartan dan irbesartan, panjang gelombang 280 nm untuk etinil estradiol, dan 420 nm untuk kurkumin; volume penyuntikan 20,0 μL

Keterangan :

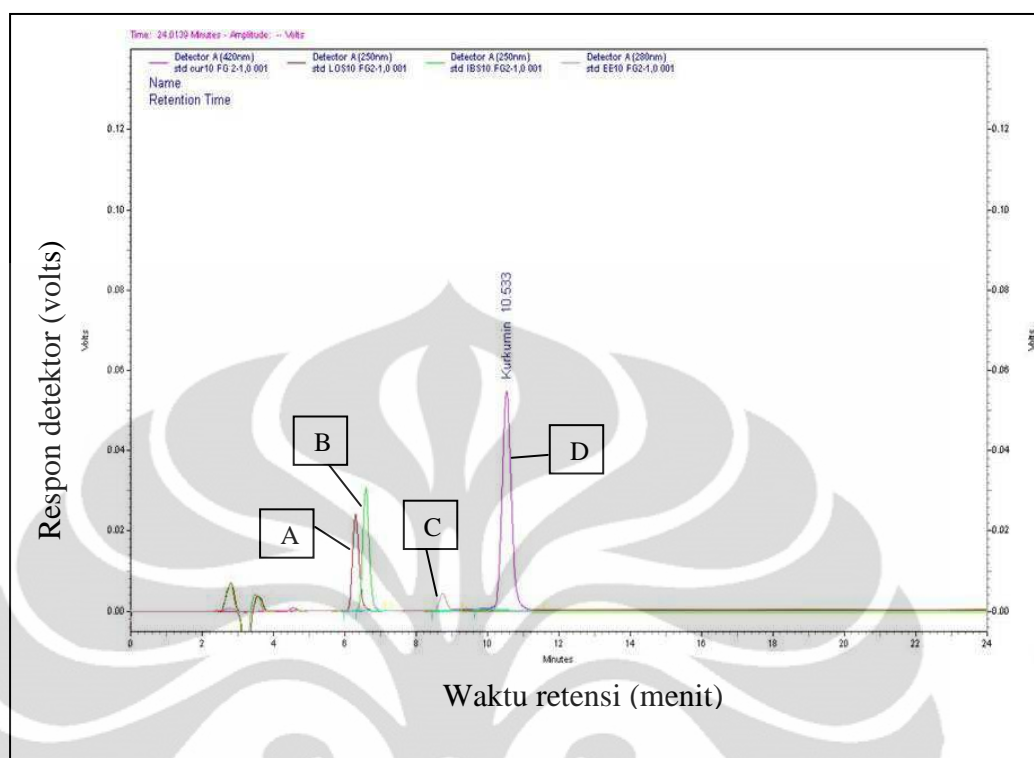
- A. Kalium losartan 10 $\mu\text{g/mL}$ dengan waktu retensi 4,492 menit
- B. Irbesartan 10 $\mu\text{g/mL}$ dengan waktu retensi 4,633 menit
- C. Etinil estradiol 10 $\mu\text{g/mL}$ 5,675 menit
- D. Kurkumin 10 $\mu\text{g/mL}$ 6,050 menit

Gambar 4.5 *Overlay* kromatogram larutan standar dengan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (49:20:30:1)



Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (40:20:39:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 420 nm; volume penyuntikan 20,0 µL

Gambar 4.6 Kromatogram larutan standar kurkuminoid dengan konsentrasi 10 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (40:20:39:1)

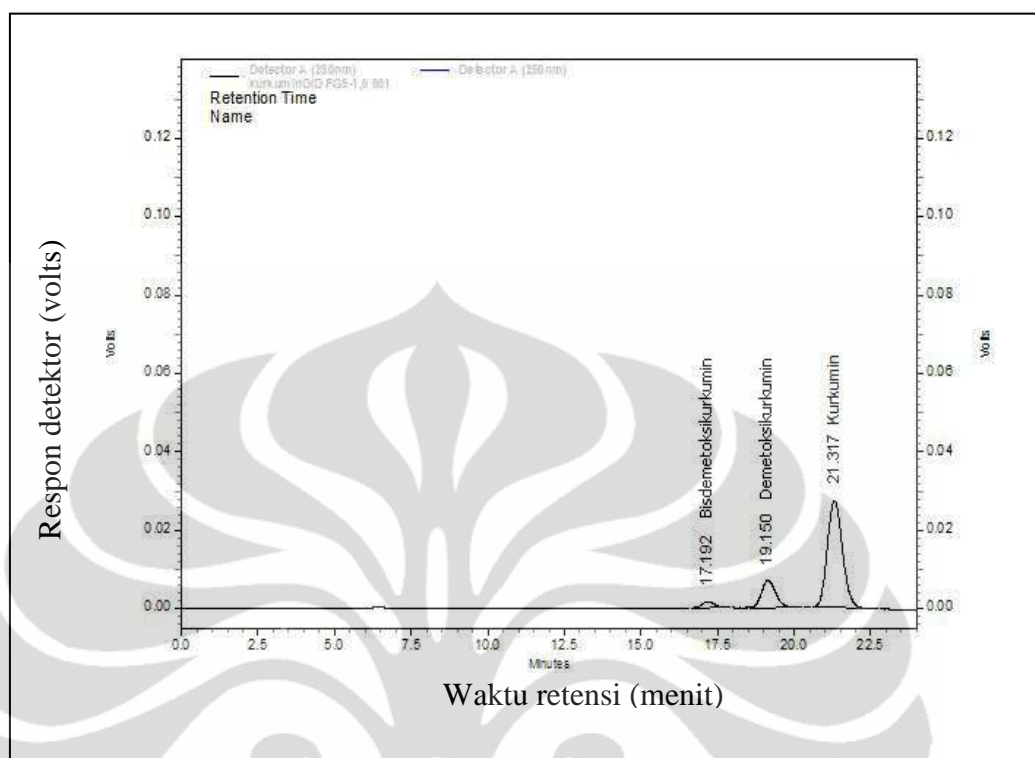


Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (40:20:39:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm untuk kalium losartan dan irbesartan, panjang gelombang 280 nm untuk etinil estradiol dan panjang gelombang 420 nm untuk kurkumin; volume penyuntikan 20,0 µL

Keterangan :

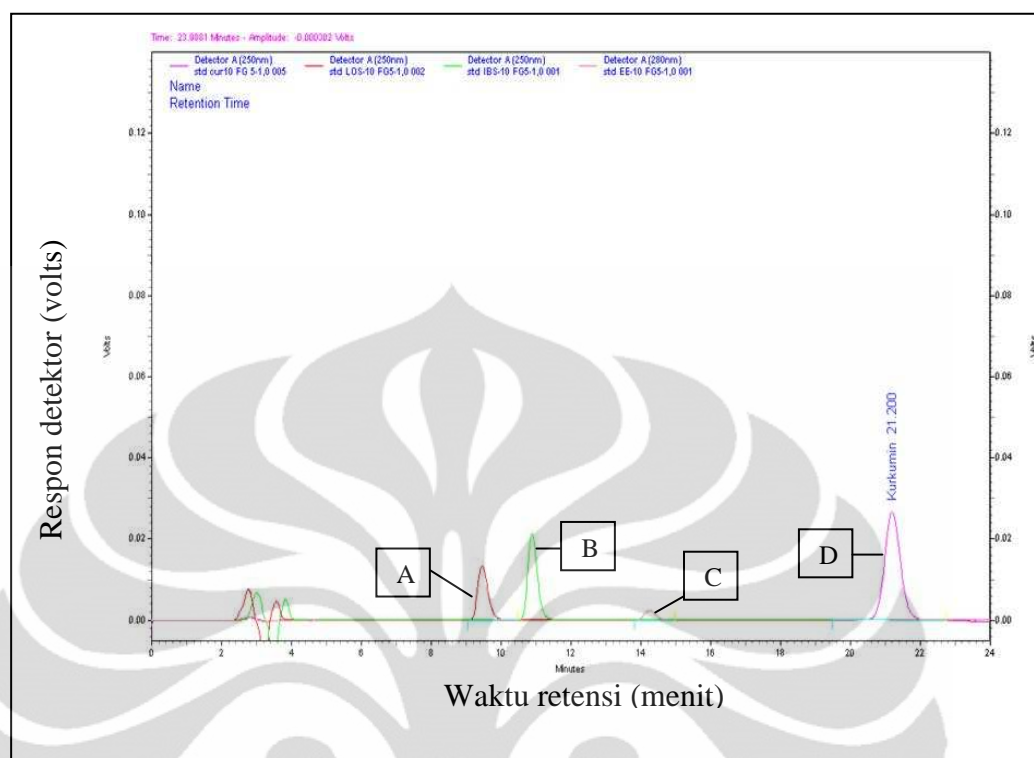
- A. Kalium losartan 10 µg/mL dengan waktu retensi 6,300 menit
- B. Irbesartan 10 µg/mL dengan waktu retensi 6,853 menit
- C. Etinil estradiol 10 µg/mL dengan waktu retensi 8,742 menit
- D. Kurkumin 10 µg/mL dengan waktu retensi 10,553 menit

Gambar 4.7 *Overlay* kromatogram larutan standar dengan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (40:20:39:1)



Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil[®] 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 μm , fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 420 nm; volume penyuntikan 20,0 μL .

Gambar 4.8 Kromatogram larutan standar kurkuminoid dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ dengan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1)

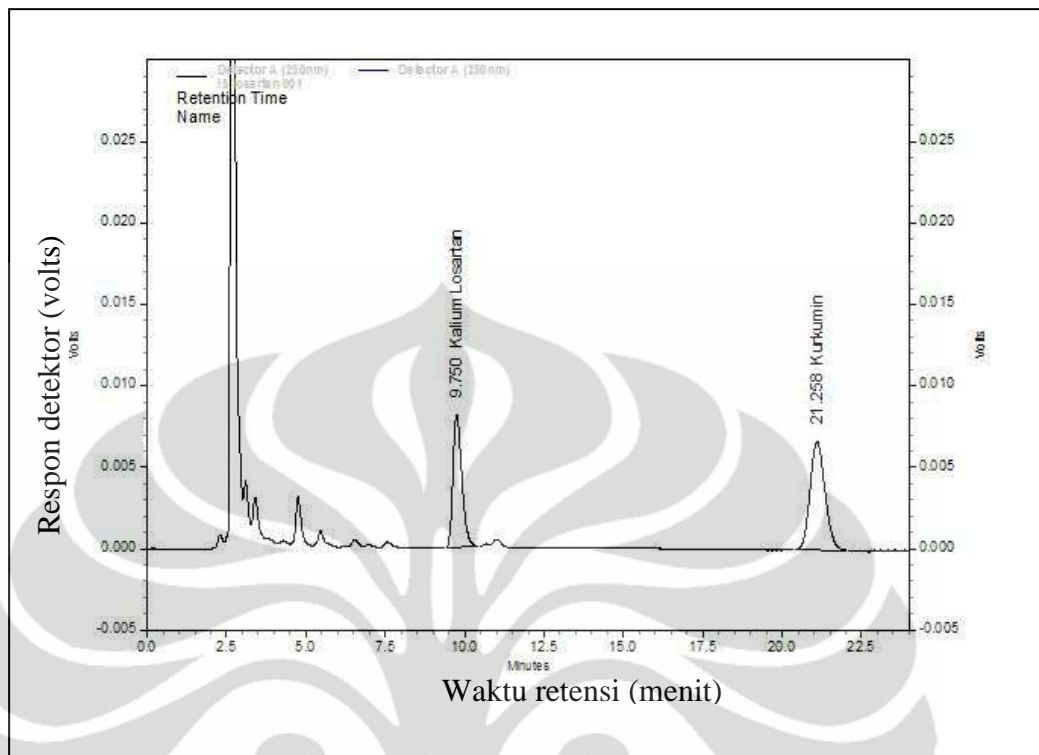


Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm untuk kalium losartan dan irbesartan, panjang gelombang 280 nm untuk etinil estradiol dan panjang gelombang 420 nm untuk kurkumin; volume penyuntikan 20,0 µL

Keterangan :

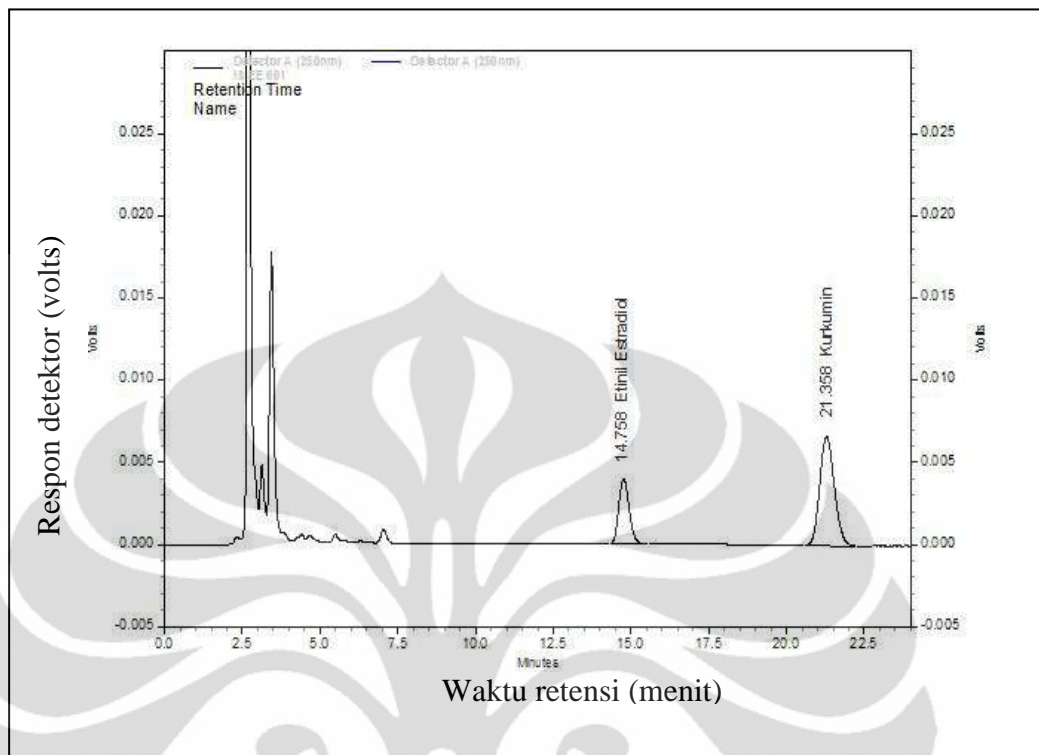
- A. Kalium losartan 10 µg/mL dengan waktu retensi 9,458 menit
- B. Irbesartan 10 µg/mL dengan waktu retensi 10,883 menit
- C. Etinil estradiol 10 µg/mL dengan waktu retensi 14,450 menit
- D. Kurkumin 10 µg/mL dengan waktu retensi 21,200 menit

Gambar 4.9 *Overlay* kromatogram larutan standar dengan fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1)



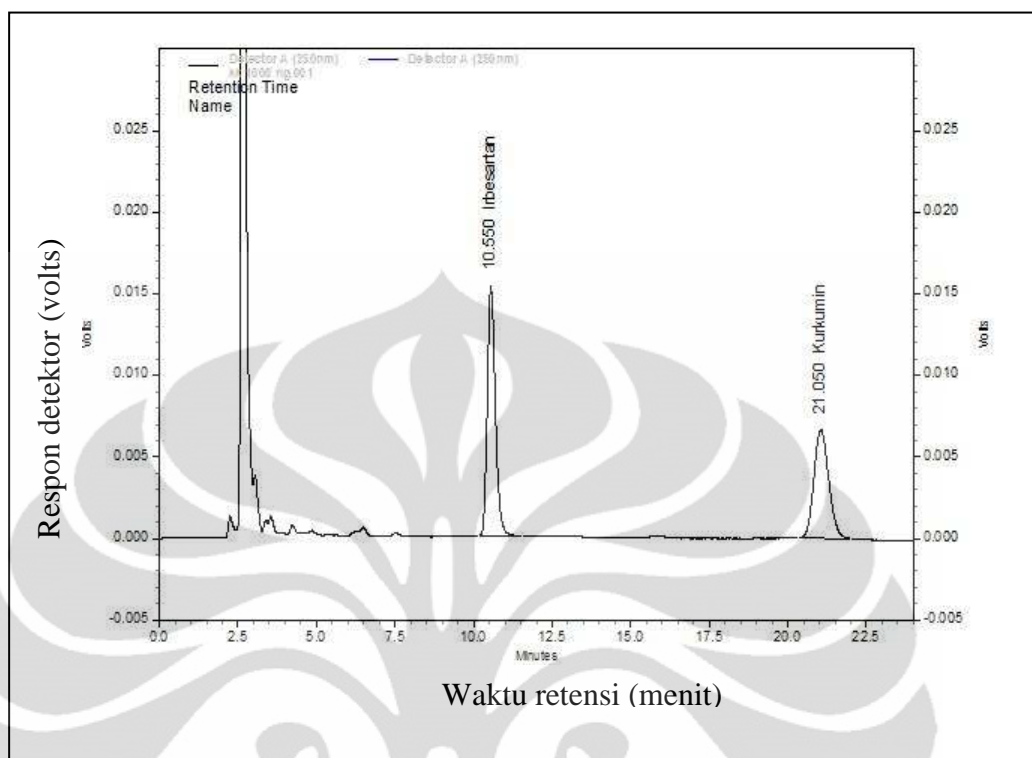
Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Gambar 4.10 Kromatogram ekstrak kurkumin (1 µg/mL) dengan penambahan kalium losartan (100 µg/mL) dalam plasma *in vitro*



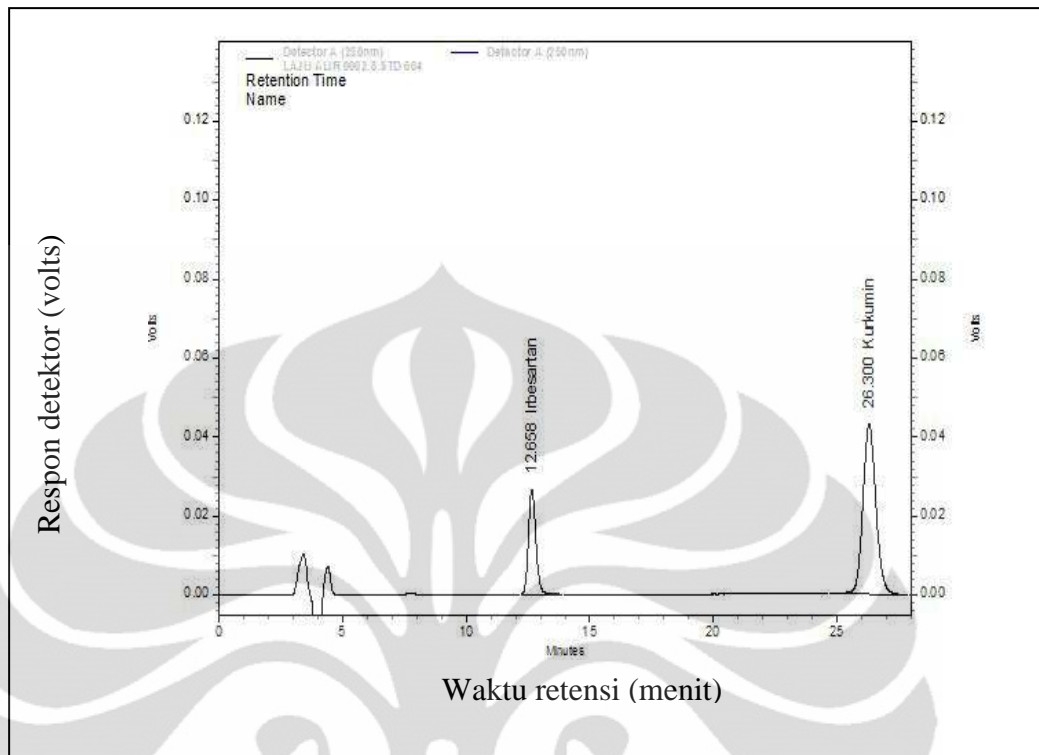
Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 280 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-18; volume penyuntikan 20,0 µL

Gambar 4.11 Kromatogram ekstrak kurkumin (1 µg/mL) dengan penambahan etinil estradiol (100 µg/mL) dalam plasma *in vitro*



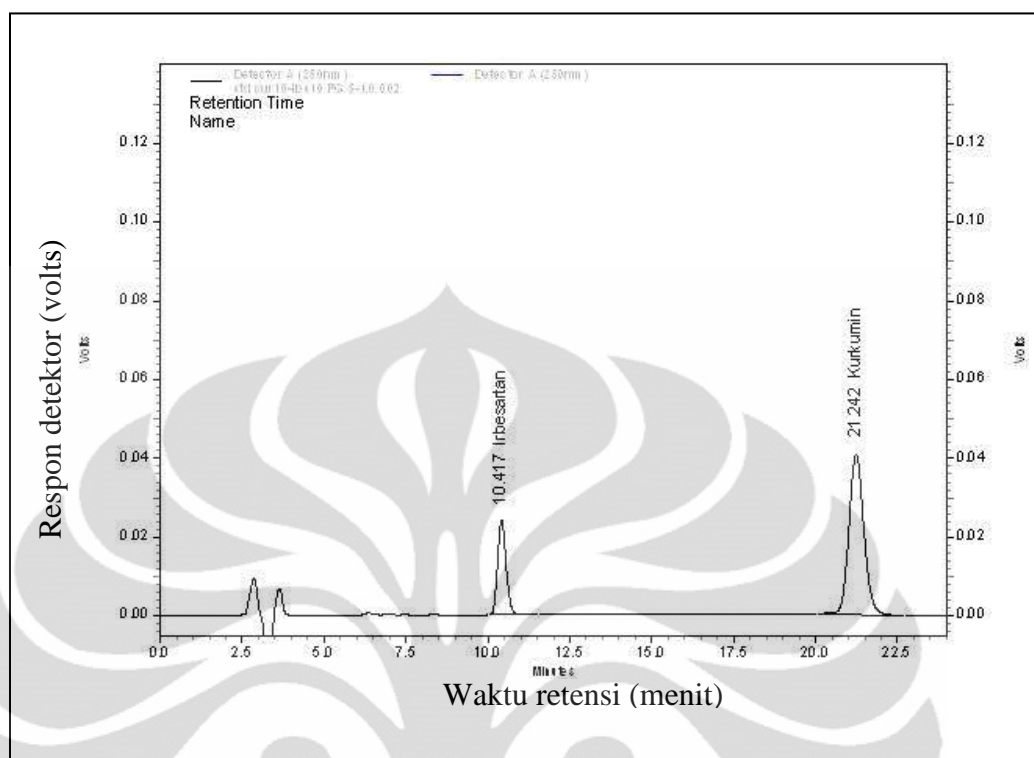
Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil[®] 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 μm , fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 μL

Gambar 4.12 Kromatogram ekstrak kurkumin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dengan penambahan irbesartan (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dalam plasma *in vitro*



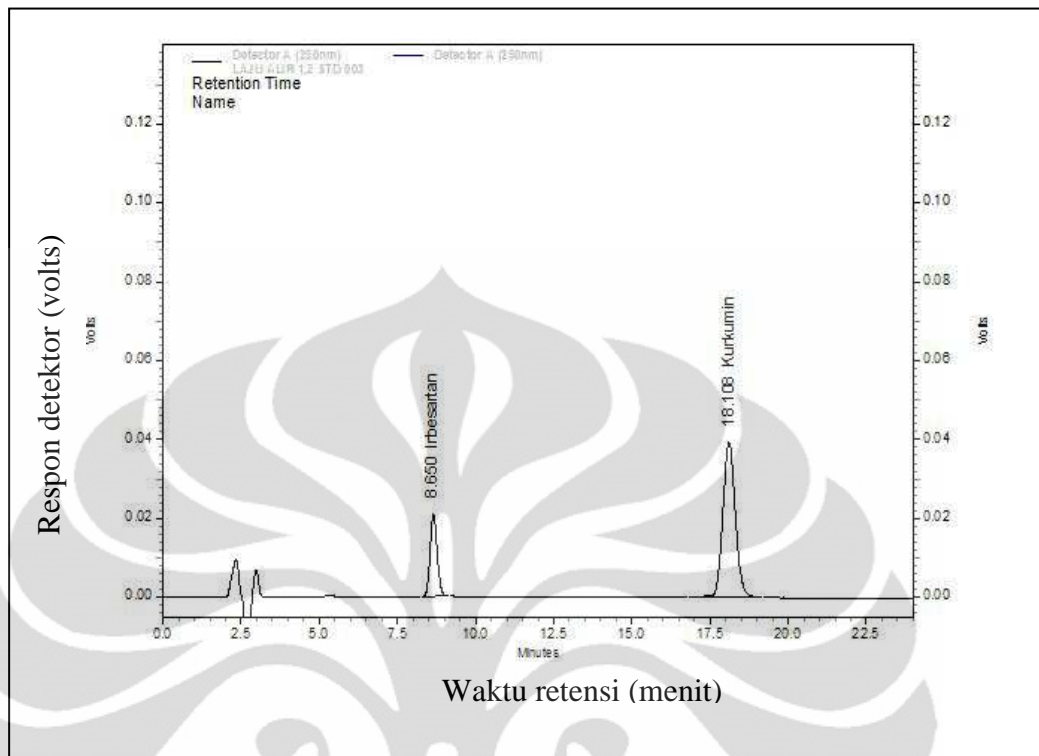
Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Gambar 4.13 Kromatogram campuran larutan standar kurkumin dan irbesartan dengan konsentrasi masing-masing 10 µg/mL dengan laju alir 0,8 mL/menit



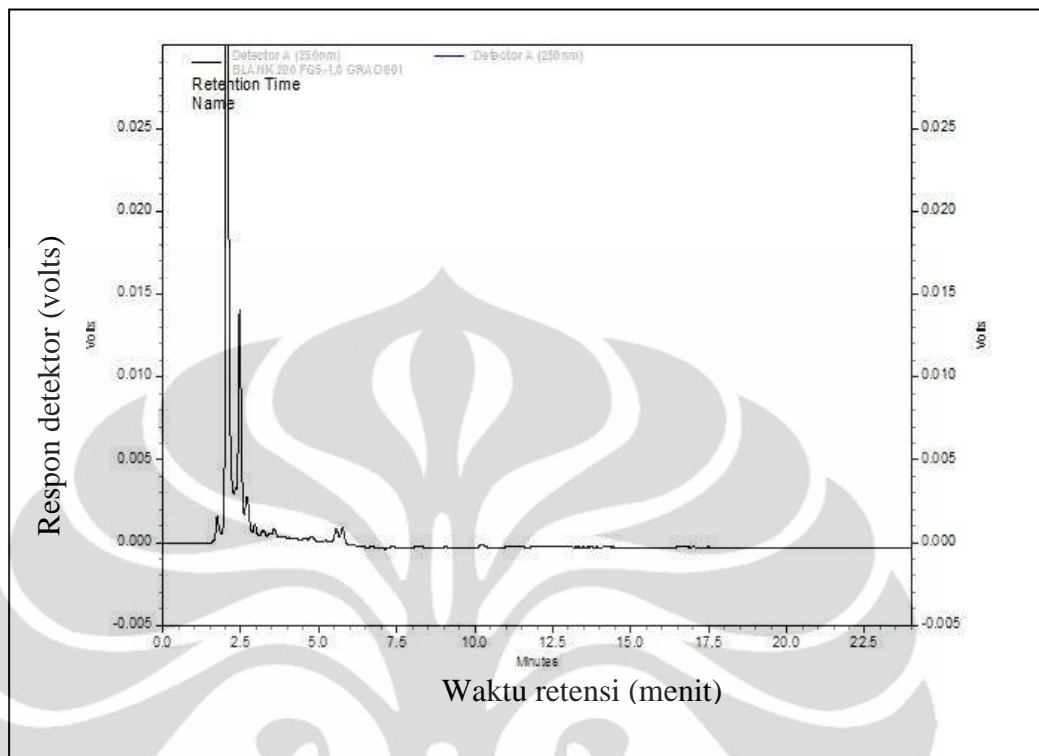
Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Gambar 4.14 Kromatogram campuran larutan standar kurkumin dan irbesartan dengan konsentrasi masing-masing 10 µg/mL dengan laju alir 1,0 mL/menit



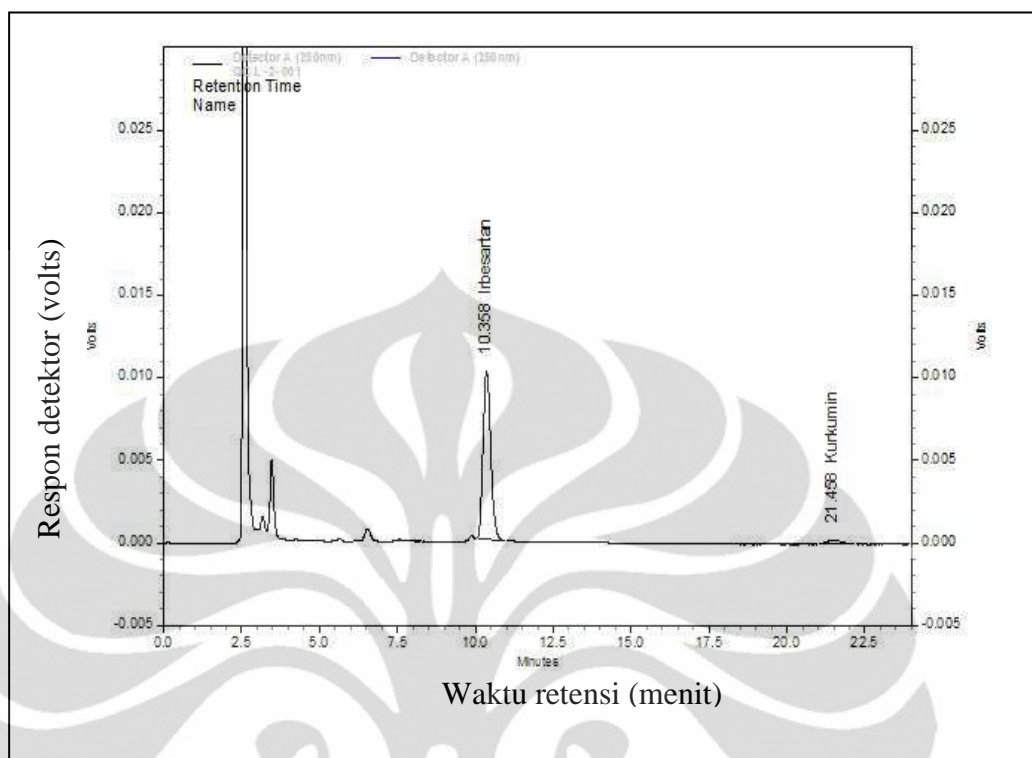
Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,2 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Gambar 4.15 Kromatogram campuran larutan standar kurkumin dan irbesartan dengan konsentrasi masing-masing 10 µg/mL dengan laju alir 1,2 mL/menit



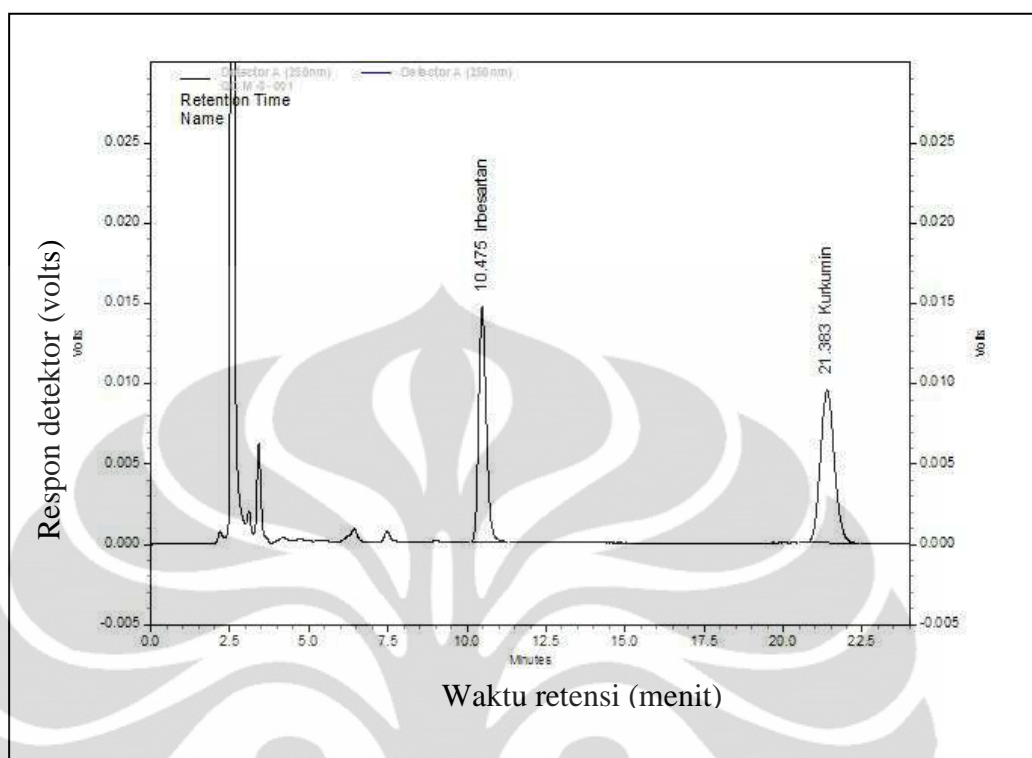
Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Gambar 4.16 Kromatogram ekstrak plasma tanpa penambahan kurkumin dan baku dalam irbesartan (plasma blanko)



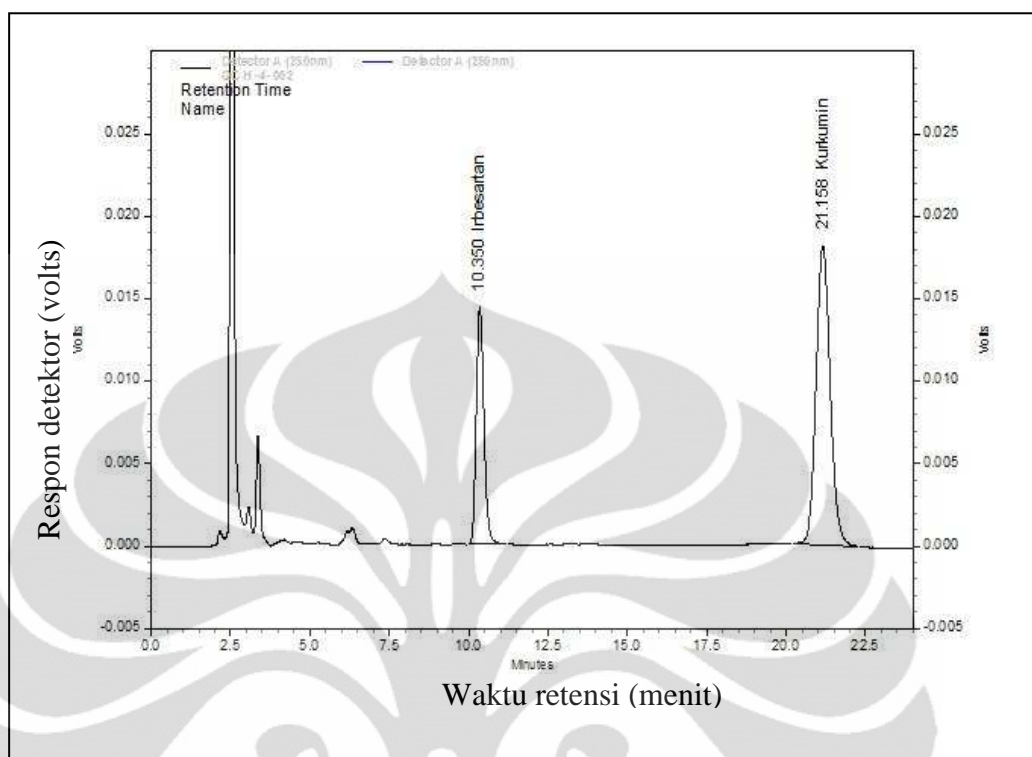
Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Gambar 4.17 Kromatogram ekstrak plasma kurkumin konsentrasi rendah (62,04 ng/mL) dengan baku dalam irbesartan dalam plasma *in vitro*



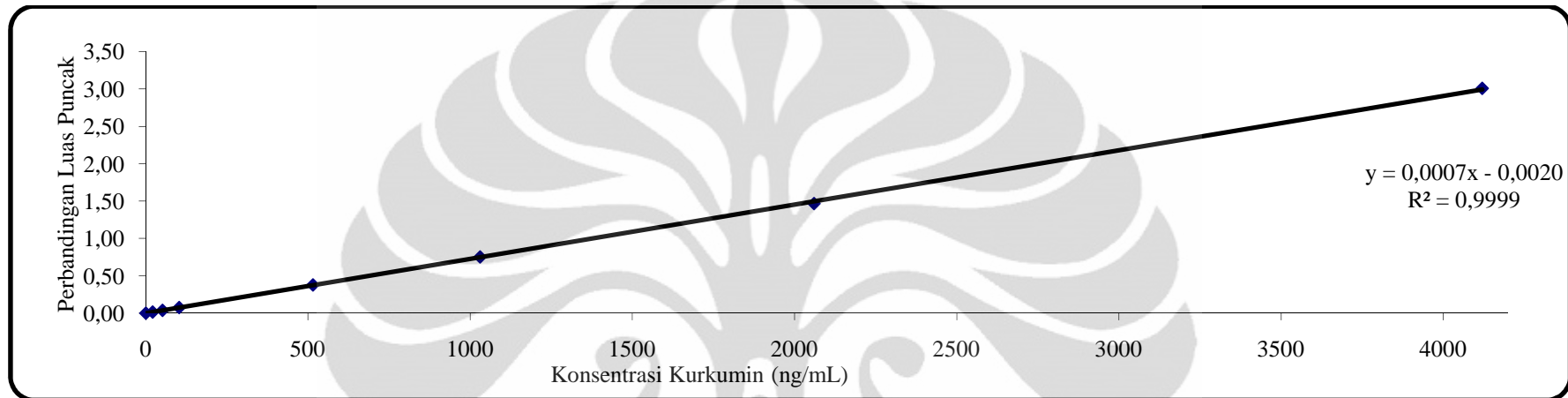
Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Gambar 4.18 Kromatogram ekstrak plasma kurkumin konsentrasi sedang (1654,40 ng/mL) dengan baku dalam irbesartan dalam plasma *in vitro*



Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Gambar 4.19 Kromatogram ekstrak plasma kurkumin konsentrasi tinggi (3308,80 ng/mL) dengan baku dalam irbesartan dalam plasma *in vitro*



Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil[®] 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Gambar 4.20 Kurva kalibrasi kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Tabel 4.1 Hubungan antara panjang gelombang dengan luas puncak

Panjang gelombang	Luas Puncak			
	Kurkumin	Irbesartan	Kalium Losartan	Etinil Estradiol
257	126315	229853	-	-
250-420	622773	239408	-	-
250-420	626941	-	171555	-
280-420	621948	-	-	34470

Tabel 4.2 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, resolusi dan faktor ikutan kromatogram kurkuminoid terhadap perubahan komposisi fase gerak

Komposisi fase gerak	Waktu retensi (menit)	Jumlah lempeng (N)	HETP	Faktor ikutan (Tf)	Resolusi (R)
Asetonitril – metanol - aquabidestilata - asam asetat (49:20:30:1)	6,05	6599,86	0,0378	1,16	1,28
Asetonitril – metanol - aquabidestilata - asam asetat (40:20:39:1)	10,667	8748,85	0,0285	1,15	1,43
Asetonitril – metanol - aquabidestilata - asam asetat (33:20:46:1)	21,317	8787,23	0,0284	1,15	2,47

Tabel 4.3 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram kurkumin terhadap perubahan komposisi fase gerak

Komposisi fase gerak	Waktu retensi (menit)	Jumlah lempeng (N)	HETP	Faktor ikutan (Tf)
Asetonitril – metanol - aquabidestilata - asam asetat (49:20:30:1)	6,050	6660,86	0,0375	1,19
Asetonitril – metanol - aquabidestilata - asam asetat (40:20:39:1)	10,533	7909,34	0,0316	1,13
Asetonitril – metanol - aquabidestilata - asam asetat (33:20:46:1)	21,200	10211,74	0,0245	1,12

Tabel 4.4 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram kurkumin terhadap perubahan laju alir fase gerak

Laju alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)		Jumlah Lempeng (N)	HETP	Faktor Ikutan (Tf)	R (terhadap baku dalam)
	Kurkumin	Baku Dalam (Irbesartan)				
0,8	26,300	12,658	12116,17	0,0206	1,14	18,16
1,0	21,242	10,417	10373,34	0,0241	1,12	16,46
1,2	18,108	8,650	9779,7	0,0256	1,09	16,39

Tabel 4.5 Data uji kesesuaian sistem

Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Rata-Rata Perbandingan Luas Puncak	SD	KV(%)
Kurkumin	Irbesartan				
593865	222560	2,6683	2,68	0,01	0,51
603582	224511	2,6884			
600163	221877	2,7049			
603291	225002	2,6813			
611631	228328	2,6787			

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil[®] 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Tabel 4.6 Data optimasi volume penambahan larutan pengestrak etil asetat 95% - metanol 5%

Volume Penambahan Larutan Pengestrak (mL)	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak
	Kurkumin	Irbesartan	
1	57761	36591	1,5786
2	207236	287123	0,7218
3	153905	161123	0,9552

Tabel 4.7 Data optimasi waktu pengocokan dengan vortex

Waktu Pengocokan dengan Vortex (menit)	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak
	Kurkumin	Irbesartan	
1	132172	227976	0,5798
2	170764	228330	0,7479
3	176297	257026	0,6859

Tabel 4.8 Data pengukuran batas kuantitasi terendah (LLOQ) kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi terukur	SD	KV	% <i>diff</i>
	Kurkumin	Irbesartan						
20,6	4646	288775	0,0161	22,71	21,63	1,14	5,29	10,24
	3979	272252	0,0146	20,23				-1,78
	4279	288775	0,0148	20,57				-0,13
	3543	224934	0,0158	22,14				7,49
	4098	256762	0,0160	22,49				9,19
10,3	2096	272925	0,0077	8,59	9,17	2,66	29,00	-16,64
	2487	268712	0,0093	11,23				9,05
	1822	272950	0,0067	6,90				-33,02
	2470	245379	0,0101	12,59				22,27
	1775	274290	0,0065	6,56				-36,35

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Tabel 4.9 Data uji selektivitas kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Plasma	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi terukur	SD	KV (%)	% diff
		Kurkumin	Irbesartan						
20,60	A	3321	299517	0,0111	21,68	20,61	0,85	4,14	5,22
		3089	293365	0,0105	20,61				0,04
	B	3314	295972	0,0112	21,88				6,24
		3501	332836	0,0105	20,59				-0,06
	C	3409	317313	0,0107	21,02				2,03
		4052	365978	0,0111	21,65				5,07
	D	3131	290914	0,0108	21,05				2,21
		3510	348032	0,0101	19,76				-4,08
	E	2939	294031	0,0100	19,59				-4,91
		3016	294649	0,0102	20,05				-2,68
	F	2715	265913	0,0102	20,00				-2,92
		3618	364660	0,0099	19,45				-5,60

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Tabel 4.10 Data kurva kalibrasi kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% <i>diff</i>
	Kurkumin	Irbesartan			
0	0	221000	0,0000	0,00	0,00
20,60	3835	252208	0,0152	23,64	14,77
51,50	9669	261565	0,0370	53,56	4,01
103,00	18705	248535	0,0753	106,22	3,13
515,00	90543	241122	0,3755	519,09	0,79
1030,00	177827	236184	0,7529	1038,06	0,78
2060,00	351279	239588	1,4662	2018,86	-2,00
4120,00	774919	257687	3,0072	4137,92	0,43

Persamaan regresi linier : $y = 0,0007x - 0,0020$ $r = 0,9999$

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil[®] 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 μm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 μL

Tabel 4.11 Data uji akurasi dan presisi kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam, Hari ke-1 (*intra-day*)

Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% diff
	Kurkumin	Irbesartan						
62,04	11413	250818	0,0455	70,17	67,67	3,16	4,67	13,11
	11095	265935	0,0417	64,78				4,42
	10485	255938	0,0410	63,71				2,69
	9472	208964	0,0453	69,92				12,71
	8454	186906	0,0452	69,79				12,49
1654,40	252730	194334	1,3005	1859,17	1778,00	83,79	4,71	12,38
	292620	240926	1,2146	1736,68				4,97
	297235	244694	1,2147	1736,90				4,99
	276977	235272	1,1773	1683,50				1,76
	294020	224319	1,3107	1873,75				13,26
3308,80	550526	244221	2,2542	3218,70	3239,68	211,68	6,53	-2,72
	505537	236004	2,1421	3058,84				-7,55
	514514	241731	2,1285	3039,44				-8,14
	560551	240448	2,3313	3328,56				0,60
	567465	228023	2,4886	3552,87				7,38

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil[®] 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Tabel 4.12 Data uji akurasi dan presisi kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam, Hari ke-2 (*intra-day*)

Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% diff
	Kurkumin	Irbesartan						
62,04	11084	229556	0,0483	69,13	63,56	3,98	6,26	11,43
	9570	233083	0,0411	59,19				-4,59
	9660	230936	0,0418	60,25				-2,88
	10756	238185	0,0452	64,83				4,50
	10697	238497	0,0449	64,41				3,82
1654,40	288284	225075	1,2808	1764,00	1625,09	102,49	6,31	6,62
	277830	235264	1,1809	1626,62				-1,68
	300317	248391	1,2090	1665,29				0,66
	285822	248596	1,1497	1583,74				-4,27
	252113	233753	1,0785	1485,83				-10,19
3308,80	524592	200771	2,6129	3595,69	3479,60	245,34	7,05	8,67
	520107	195566	2,6595	3659,78				10,61
	481136	185151	2,5986	3576,06				8,08
	465611	210079	2,2164	3050,43				-7,81
	532425	208388	2,5550	3516,05				6,26

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Tabel 4.13 Data uji akurasi dan presisi kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam, Hari ke-3 (*intra-day*)

Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% diff
	Kurkumin	Irbesartan						
62,04	9392	187557	0,0501	70,26	68,60	1,57	2,29	13,24
	10549	210605	0,0501	70,28				13,28
	11114	233083	0,0477	66,82				7,70
	12029	248591	0,0484	67,83				9,33
	9561	197557	0,0484	67,84				9,35
1654,40	242853	229960	1,0561	1517,07	1519,66	78,57	5,17	-8,30
	197283	192301	1,0259	1473,70				-10,92
	246186	213834	1,1513	1654,03				-0,02
	174454	172073	1,0138	1456,34				-11,97
	219045	210176	1,0422	1497,13				-9,51
3308,80	460344	202108	2,2777	3274,05	3305,57	198,02	5,99	-1,05
	463184	213108	2,1735	3124,13				-5,58
	473489	187242	2,5288	3635,10				9,86
	465611	210079	2,2164	3185,81				-3,72
	444514	193110	2,3019	3308,79				0,00

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Tabel 4.14 Data uji akurasi dan presisi kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam, Hari ke-4 (*intra-day*)

Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
	Kurkumin	Irbesartan						
62,04	9815	206536	0,0475	68,88	65,40	3,00	4,59	11,03
	9027	202924	0,0445	64,64				4,20
	9610	217908	0,0441	64,11				3,33
	8374	198342	0,0422	61,48				-0,90
	8634	184426	0,0468	67,90				9,44
1654,40	292729	217831	1,3438	1878,92	1796,85	69,15	3,85	13,57
	287966	232267	1,2398	1733,67				4,79
	296768	224750	1,3204	1846,25				11,60
	279400	216402	1,2911	1805,31				9,12
	271341	220583	1,2301	1720,13				3,97
3308,80	429249	184414	2,3276	3252,60	3434,39	157,11	4,57	-1,70
	493951	203830	2,4233	3386,24				2,34
	554165	224951	2,4635	3442,29				4,03
	561489	212935	2,6369	3684,43				11,35
	482517	197934	2,4378	3406,38				2,95

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Tabel 4.15 Data uji akurasi dan presisi kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam, Hari ke-5 (*intra-day*)

Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
	Kurkumin	Irbesartan						
62,04	13725	237971	0,0577	64,99	60,36	5,13	8,51	4,75
	11874	218953	0,0542	59,84				-3,55
	8053	137731	0,0585	66,17				6,66
	12827	252538	0,0508	54,70				-11,83
	13604	262918	0,0517	56,12				-9,54
1654,40	321535	250659	1,2828	1895,70	1843,70	61,89	3,36	14,59
	286424	225244	1,2716	1879,05				13,58
	221652	181225	1,2231	1806,51				9,19
	315929	247712	1,2754	1884,69				13,92
	291456	245546	1,1870	1752,56				5,93
3308,80	534938	215149	2,4864	3694,31	3697,93	43,34	1,17	11,65
	591000	239469	2,4680	3666,81				10,82
	608885	241961	2,5165	3739,29				13,01
	596531	243106	2,4538	3645,64				10,18
	582944	231387	2,5193	3743,60				13,14

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Tabel 4.16 Data uji akurasi dan presisi antar hari dari kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

						VARIASI INTRA HARI			VARIASI ANTAR HARI			
Hari	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% <i>diff</i>	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	
	Kurkumin	Irbesartan										
62,04 (ng/mL)	1	11413	250818	0,0455	70,17	67,67	3,16	4,67	65,12	3,31	5,08	
		11095	265935	0,0417	64,78							4,42
		10485	255938	0,0410	63,71							2,69
		9472	208964	0,0453	69,92							12,71
		8454	186906	0,0452	69,79							12,49
	2	11084	229556	0,0483	69,13	11,43	63,56	3,98	6,26	65,12	3,31	5,08
		9570	233083	0,0411	59,19	-4,59						
		9660	230936	0,0418	60,25	-2,88						
		10756	238185	0,0452	64,83	4,50						
		10697	238497	0,0449	64,41	3,82						
	3	9392	187557	0,0501	70,26	13,24	68,60	1,57	2,29	65,12	3,31	5,08
		10549	210605	0,0501	70,28	13,28						
		11114	233083	0,0477	66,82	7,70						
		12029	248591	0,0484	67,83	9,33						
		9561	197557	0,0484	67,84	9,35						

4	9815	206536	0,0475	68,88	11,03	65,40	3,00	4,59			
	9027	202924	0,0445	64,64	4,20						
	9610	217908	0,0441	64,11	3,33						
	8374	198342	0,0422	61,48	-0,90						
	8634	184426	0,0468	67,90	9,44						
5	13725	237971	0,0577	64,99	4,75	60,36	5,13	8,51			
	11874	218953	0,0542	59,84	-3,55						
	8053	137731	0,0585	66,17	6,66						
	12827	252538	0,0508	54,70	-11,83						
	13604	262918	0,0517	56,12	-9,54						

Lanjutan

						VARIASI INTRA HARI			VARIASI ANTAR HARI			
1654,40 (ng/mL)	Hari	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% <i>diff</i>	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)
		Kurkumin	Irbesartan									
	1	252730	194334	1,3005	1859,17	12,38	1778,00	83,79	4,71	1712,66	135,51	7,91
		292620	240926	1,2146	1736,68	4,97						
		297235	244694	1,2147	1736,90	4,99						
		276977	235272	1,1773	1683,50	1,76						
		294020	224319	1,3107	1873,75	13,26						
	2	288284	225075	1,2808	1764,00	6,62	1625,09	102,49	6,31			
		277830	235264	1,1809	1626,62	-1,68						
		300317	248391	1,2090	1665,29	0,66						
		285822	248596	1,1497	1583,74	-4,27						
		252113	233753	1,0785	1485,83	-10,19						
	3	242853	229960	1,0561	1517,07	-8,30	1519,66	78,57	5,17			
		197283	192301	1,0259	1473,70	-10,92						
		246186	213834	1,1513	1654,03	-0,02						
		174454	172073	1,0138	1456,34	-11,97						
		219045	210176	1,0422	1497,13	-9,51						
	4	292729	217831	1,3438	1878,92	13,57	1796,85	69,15	3,85			
		287966	232267	1,2398	1733,67	4,79						
		296768	224750	1,3204	1846,25	11,60						

5	279400	216402	1,2911	1805,31	9,12	1843,70	61,89	3,36			
	271341	220583	1,2301	1720,13	3,97						
	321535	250659	1,2828	1895,70	14,59						
	286424	225244	1,2716	1879,05	13,58						
	221652	181225	1,2231	1806,51	9,19						
	315929	247712	1,2754	1884,69	13,92						
	291456	245546	1,1870	1752,56	5,93						

Lanjutan

						VARIASI INTRA HARI			VARIASI ANTAR HARI			
3308,80 (ng/mL)	Hari	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% <i>diff</i>	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)
		Kurkumin	Irbesartan									
	1	550526	244221	2,2542	3218,70	-2,72	3239,68	211,68	6,53	3431,44	177,45	5,17
		505537	236004	2,1421	3058,84	-7,55						
		514514	241731	2,1285	3039,44	-8,14						
		560551	240448	2,3313	3328,56	0,60						
		567465	228023	2,4886	3552,87	7,38						
	2	524592	200771	2,6129	3595,69	8,67	3479,60	245,34	7,05			
		520107	195566	2,6595	3659,78	10,61						
		481136	185151	2,5986	3576,06	8,08						
		465611	210079	2,2164	3050,43	-7,81						
		532425	208388	2,5550	3516,05	6,26						
	3	460344	202108	2,2777	3274,05	-1,05	3305,57	198,02	5,99			
		463184	213108	2,1735	3124,13	-5,58						
		473489	187242	2,5288	3635,10	9,86						
		465611	210079	2,2164	3185,81	-3,72						
		444514	193110	2,3019	3308,79	0,00						
4	429249	184414	2,3276	3252,60	-1,70	3434,39	157,11	4,57				
	493951	203830	2,4233	3386,24	2,34							
	554165	224951	2,4635	3442,29	4,03							

5	561489	212935	2,6369	3684,43	11,35	3697,93	43,34	1,17			
	482517	197934	2,4378	3406,38	2,95						
	534938	215149	2,4864	3694,31	11,65						
	591000	239469	2,4680	3666,81	10,82						
	608885	241961	2,5165	3739,29	13,01						
	596531	243106	2,4538	3645,64	10,18						
	582944	231387	2,5193	3743,60	13,14						

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil[®] 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Tabel 4.17. Data uji perolehan kembali (% *recovery*) kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Perolehan kembali (%)
	Kurkumin	Irbesartan			
62,04 (ng/mL)	11413	250818	0,0455	70,17	113,11
	11095	265935	0,0417	64,78	104,42
	10485	255938	0,0410	63,71	102,69
	9472	208964	0,0453	69,92	112,71
	8454	186906	0,0452	69,79	112,49
	11084	229556	0,0483	69,13	111,43
	9570	233083	0,0411	59,19	95,41
	9660	230936	0,0418	60,25	97,12
	10756	238185	0,0452	64,83	104,50
	10697	238497	0,0449	64,41	103,82
	9392	187557	0,0501	70,26	113,24
	10549	210605	0,0501	70,28	113,28
	11114	233083	0,0477	66,82	107,70
	12029	248591	0,0484	67,83	109,33
	9561	197557	0,0484	67,84	109,35
	9815	206536	0,0475	68,88	111,03
	9027	202924	0,0445	64,64	104,20
	9610	217908	0,0441	64,11	103,33
	8374	198342	0,0422	61,48	99,10
	8634	184426	0,0468	67,90	109,44
13725	237971	0,0577	64,99	104,75	
11874	218953	0,0542	59,84	96,45	
8053	137731	0,0585	66,17	106,66	
12827	252538	0,0508	54,70	88,17	
13604	262918	0,0517	56,12	90,46	
Rata-rata perolehan kembali (%)					104,97
SD					7,16
KV (%)					6,82

Lanjutan

	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Perolehan kembali (%)
	Kurkumin	Irbesartan			
1654,40 (ng/mL)	252730	194334	1,3005	1859,17	112,38
	292620	240926	1,2146	1736,68	104,97
	297235	244694	1,2147	1736,90	104,99
	276977	235272	1,1773	1683,50	101,76
	294020	224319	1,3107	1873,75	113,26
	288284	225075	1,2808	1764,00	106,62
	277830	235264	1,1809	1626,62	98,32
	300317	248391	1,2090	1665,29	100,66
	285822	248596	1,1497	1583,74	95,73
	252113	233753	1,0785	1485,83	89,81
	242853	229960	1,0561	1517,07	91,70
	197283	192301	1,0259	1473,70	89,08
	246186	213834	1,1513	1654,03	99,98
	174454	172073	1,0138	1456,34	88,03
	219045	210176	1,0422	1497,13	90,49
	292729	217831	1,3438	1878,92	113,57
	287966	232267	1,2398	1733,67	104,79
	296768	224750	1,3204	1846,25	111,60
	279400	216402	1,2911	1805,31	109,12
	271341	220583	1,2301	1720,13	103,97
	321535	250659	1,2828	1895,70	114,59
	286424	225244	1,2716	1879,05	113,58
	221652	181225	1,2231	1806,51	109,19
315929	247712	1,2754	1884,69	113,92	
291456	245546	1,1870	1752,56	105,93	
Rata-rata perolehan kembali (%)					103,52
SD					8,69
KV (%)					8,40

Lanjutan

	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Perolehan kembali
	Kurkumin	Irbesartan			
3308,80 (ng/mL)	550526	244221	2,2542	3218,70	97,28
	505537	236004	2,1421	3058,84	92,45
	514514	241731	2,1285	3039,44	91,86
	560551	240448	2,3313	3328,56	100,60
	567465	228023	2,4886	3552,87	107,38
	524592	200771	2,6129	3595,69	108,67
	520107	195566	2,6595	3659,78	110,61
	481136	185151	2,5986	3576,06	108,08
	465611	210079	2,2164	3050,43	92,19
	532425	208388	2,5550	3516,05	106,26
	460344	202108	2,2777	3274,05	98,95
	463184	213108	2,1735	3124,13	94,42
	473489	187242	2,5288	3635,10	109,86
	465611	210079	2,2164	3185,81	96,28
	444514	193110	2,3019	3308,79	100,00
	429249	184414	2,3276	3252,60	98,30
	493951	203830	2,4233	3386,24	102,34
	554165	224951	2,4635	3442,29	104,03
	561489	212935	2,6369	3684,43	111,35
	482517	197934	2,4378	3406,38	102,95
	534938	215149	2,4864	3694,31	111,65
	591000	239469	2,4680	3666,81	110,82
	608885	241961	2,5165	3739,29	113,01
596531	243106	2,4538	3645,64	110,18	
582944	231387	2,5193	3743,60	113,14	
Rata-rata perolehan kembali					103,71
SD					7,07
KV					6,82

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Tabel 4.18 Data uji stabilitas stok solution kurkumin dengan penambahan baku dalam

WAKTU	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Rata-Rata Perbandingan Luas Puncak	SD	KV(%)	% diff
	Kurkumin	Irbesartan					
0 JAM	611631	228328	2,6787	2,68	0,01	0,26	
	603582	224511	2,6884				
12 JAM	629828	236553	2,6625	2,67	0,02	0,60	-0,78
	621336	231403	2,6851				0,06
24 JAM	629474	236987	2,6562	2,67	0,01	0,54	-1,02
	622349	232527	2,6765				-0,27
7 HARI	629503	236770	2,6587	2,67	0,02	0,86	-0,93
	628038	233369	2,6912				0,28
14 HARI	618279	231881	2,6664	2,66	0,01	0,29	-0,64
	629361	237007	2,6555				-1,05
21 HARI	603755	228793	2,6389	2,67	0,05	1,73	-1,67
	621366	229773	2,7043				0,77
28 HARI	613530	230304	2,6640	2,68	0,02	0,67	-0,73
	618813	230101	2,6893				0,21

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Tabel 4.19 Data uji stabilitas beku cair kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Hari ke-	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
		Kurkumin	Irbesartan						
62,04	0	11413	250818	0,0455	70,17	66,22	3,47	5,23	13,11
		11095	265935	0,0417	64,78				4,42
		10485	255938	0,0410	63,71				2,69
	3	10721	293933	0,0365	53,46	56,09	2,44	4,35	-13,83
		7541	194928	0,0387	56,55				-8,85
		7170	179605	0,0399	58,27				-6,08
3308,80	0	550526	244221	2,2542	3218,70	3105,66	98,38	3,17	-2,72
		505537	236004	2,1421	3058,84				-7,55
		514514	241731	2,1285	3039,44				-8,14
	3	466450	193154	2,4149	3374,46	3428,76	50,68	1,48	1,98
		484488	194825	2,4868	3474,82				5,02
		432995	176036	2,4597	3436,99				3,87

Kondisi: kolom C₁₈ Kromasil® 100-5 dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, fase gerak asetonitril-metanol-aquabidestilata-asam asetat (33:20:46:1); kecepatan alir 1,0 mL/menit; detektor UV pada panjang gelombang 250 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 420 nm pada menit ke-16; volume penyuntikan 20,0 µL

Tabel 4.20 Data uji stabilitas jangka pendek kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Jam ke-	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
		Kurkumin	Irbesartan						
62,04	0	13725	237971	0,0577	64,99	63,67	3,37	5,29	4,75
		11874	218953	0,0542	59,84				-3,55
		8053	137731	0,0585	66,17				6,66
	6	13539	233101	0,0581	65,60	60,21	5,00	8,30	5,73
		13692	254064	0,0539	59,33				-4,36
		10778	209404	0,0515	55,71				-10,20
	24	12435	280312	0,0444	58,00	54,87	2,72	4,95	-6,52
		10193	246541	0,0413	53,55				-13,68
		10778	262795	0,0410	53,07				-14,46
3308,8	0	534938	215149	2,4864	3694,31	3700,14	36,59	0,99	11,65
		591000	239469	2,4680	3666,81				10,82
		608885	241961	2,5165	3739,29				13,01
	6	528848	232702	2,2726	3374,94	3373,86	211,48	6,27	2,00
		643656	302180	2,1300	3161,84				-4,44
		681449	282398	2,4131	3584,80				8,34
	24	557066	269586	2,0664	3035,31	3018,84	23,58	0,78	-8,27
		525273	257885	2,0368	2991,83				-9,58
		466775	226331	2,0624	3029,39				-8,44

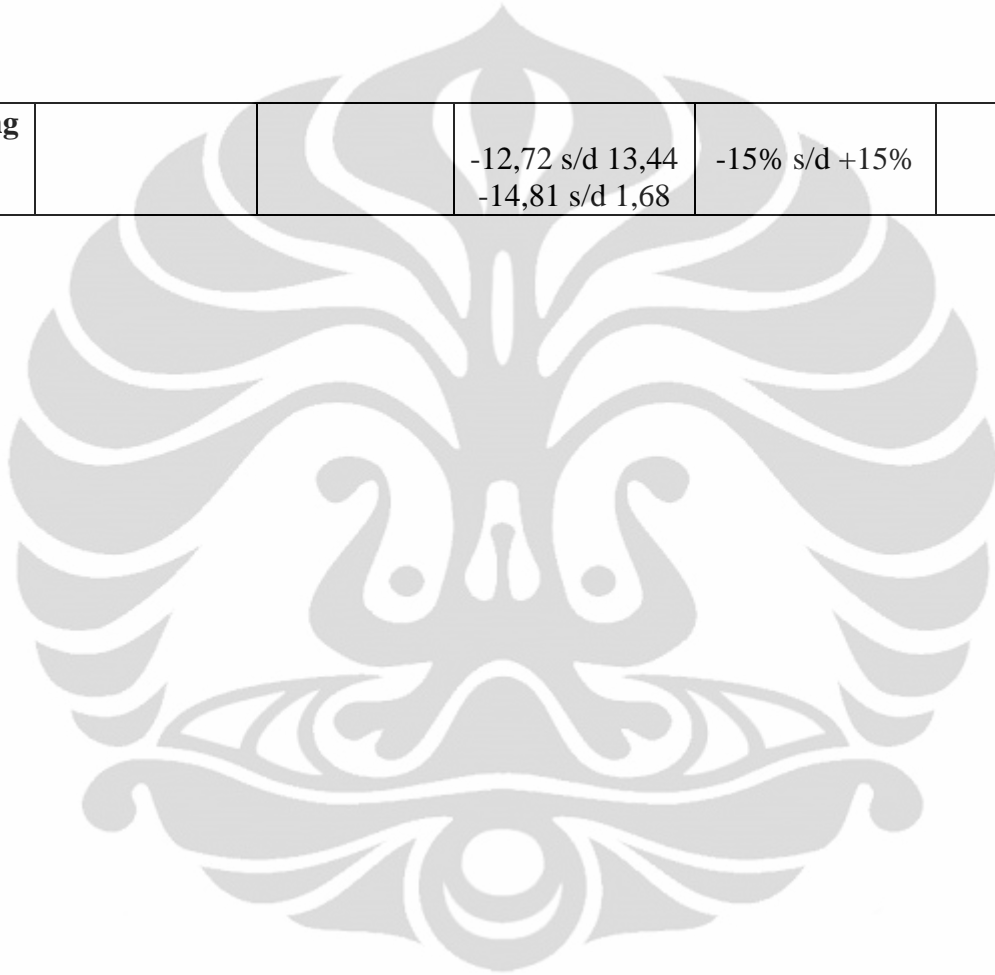
Tabel 4.21 Data uji stabilitas jangka panjang kurkumin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Hari ke-	Luas Puncak		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% <i>diff</i>
		Kurkumin	Irbesartan			
62,04	0	12625	310522	0,0407	70,38	13,44
		11190	301858	0,0371	64,37	3,76
		12045	372310	0,0324	56,47	-8,98
	7	11927	249469	0,0478	54,45	-12,23
		12253	254428	0,0482	54,90	-11,51
		11406	224138	0,0509	58,41	-5,85
	14	12490	242891	0,0514	59,10	-4,74
		11036	231972	0,0476	54,15	-12,72
		11619	234304	0,0496	56,74	-8,54
3308,08	0	465434	231824	2,0077	3364,23	1,68
		517045	289699	1,7848	2990,91	-9,61
		550217	290645	1,8931	3172,30	-4,13
	7	541822	234964	2,3060	2958,82	-10,58
		461133	209893	2,1970	2818,65	-14,81
		508436	229090	2,2194	2847,43	-13,94
	14	469967	210682	2,2307	2862,00	-13,50
		469577	212754	2,2071	2831,70	-14,42
		474917	215448	2,2043	2828,08	-14,53

Tabel 4.22 Data hasil validasi metode analisis

Parameter analisis	KV (%)	Syarat	% <i>diff</i>	Syarat	% Perolehan Kembali	Syarat
LLOQ	5,59	≤ 20%	-1,78 s/d 10,24	-20% s/d +20%		
Akurasi 62,04 1654,40 3308,80			-11,83 s/d 13,28 -11,97 s/d 14,59 -7,81 s/d 13,14	-15% s/d +15%		
Presisi 62,04 1654,40 3308,80	2,29 s/d 8,51 3,36 s/d 6,31 1,17 s/d 7,05	≤ 15%				
% Perolehan Kembali 62,04 1654,40 3308,80					88,1 s/d 113,28 88,03 s/d 114,59 91,86 s/d 113,14	
Selektivitas	4,14	≤ 20%	-5,50 s/d 6,24	-20% s/d +20%		
Stabilitas larutan stok (sampai hari ke-28)			-1,67 s/d 0,77	-15% s/d +15%		
Stabilitas beku cair 62,04 3308,80			-13,83 s/d 13,11 -8,14 s/d 5,02	-15% s/d +15%		
Stabilitas jangka pendek 62,04 3308,80			-14,46 s/d 6,66 -9,58 s/d 13,01	-15% s/d +15%		

Stabilitas jangka panjang 62,04 3308,80			-12,72 s/d 13,44 -14,81 s/d 1,68	-15% s/d +15%		
--	--	--	-------------------------------------	---------------	--	--



Lampiran 1 Cara perhitungan efisiensi kolom

Jumlah Lempeng Teoritis :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Height Equivalent to A Theoretical Plate :

$$\text{HETP} = \frac{L}{N}$$

Faktor Ikutan :

$$T_f = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

Resolusi :

$$R = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

Keterangan :

N = jumlah lempeng teoritis

t_R = waktu retensi (menit)

W = lebar puncak

HETP = ukuran efisiensi kolom

L = panjang kolom (cm)

T_f = faktor ikutan

R = resolusi atau daya pisah

$W_{0,05}$ = lebar puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar

Lampiran 2 Cara memperoleh regresi linear

Persamaan garis $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum xi.yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum xi.yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{[N(\sum x^2) - (\sum x)^2 \times N(\sum Y^2) - (\sum y)^2]^{1/2}}$$

Lampiran 3 Cara perhitungan koefisien variasi dari fungsi

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{X}}$$

$$S_{y/x} = \frac{\sum(Y - Y_i)^2}{N - 2}$$

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b}$$

Keterangan ;

$S_{y/x}$ = simpangan baku residual

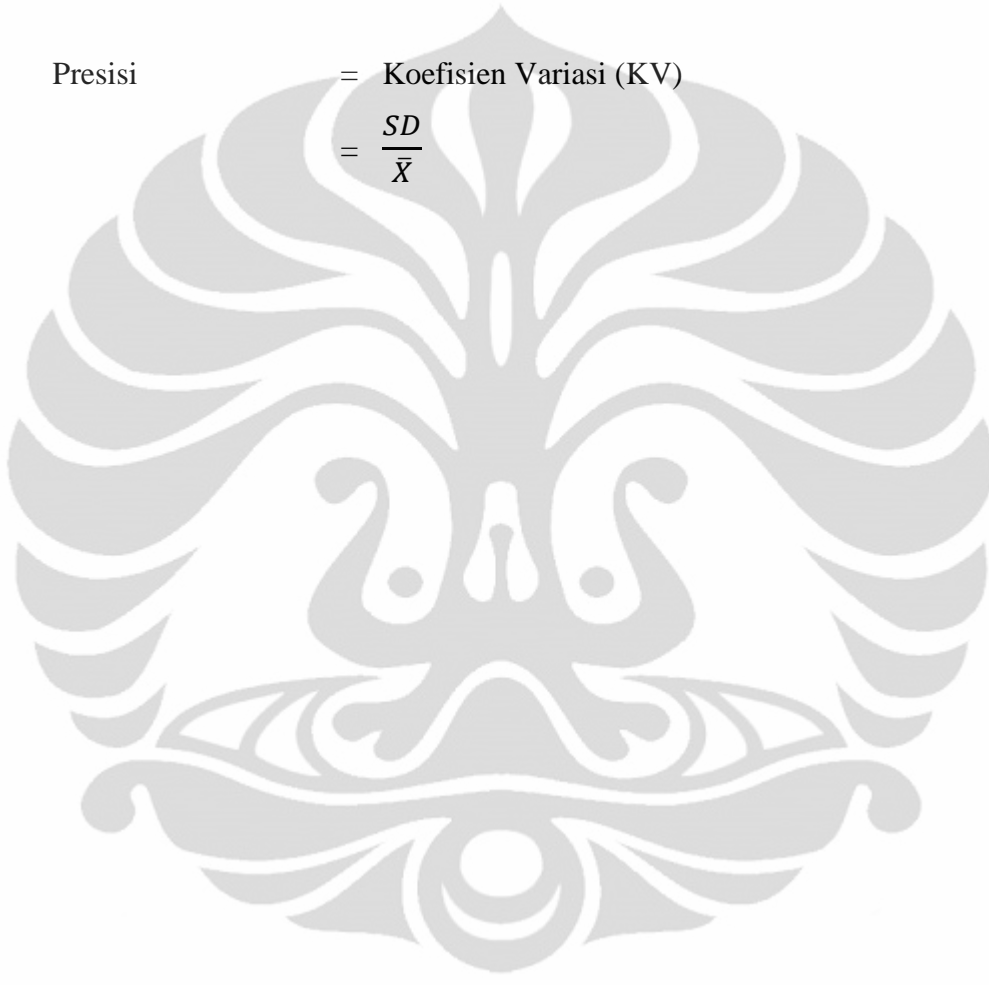
S_{x_0} = standar deviasi fungsi

b = arah garis linear dari kurva kalibrasi

Lampiran 4 Cara perhitungan presisi

$$\text{Simpangan baku (SD)} = \left(\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N - 1} \right)^{1/2}$$

$$\begin{aligned} \text{Presisi} &= \text{Koefisien Variasi (KV)} \\ &= \frac{SD}{\bar{X}} \end{aligned}$$



Lampiran 5 Cara perhitungan akurasi

$$\begin{aligned} \text{Akurasi} &= \% \text{ diff} \\ &= \frac{(\text{konsentrasi terukur} - \text{konsentrasi sebenarnya})}{\text{konsentrasi sebenarnya}} \times 100 \% \end{aligned}$$

Keterangan :

Konsentrasi terukur merupakan konsentrasi kurkumin yang diperoleh dari plot kurva kalibrasi



Lampiran 6 Cara perhitungan uji perolehan kembali

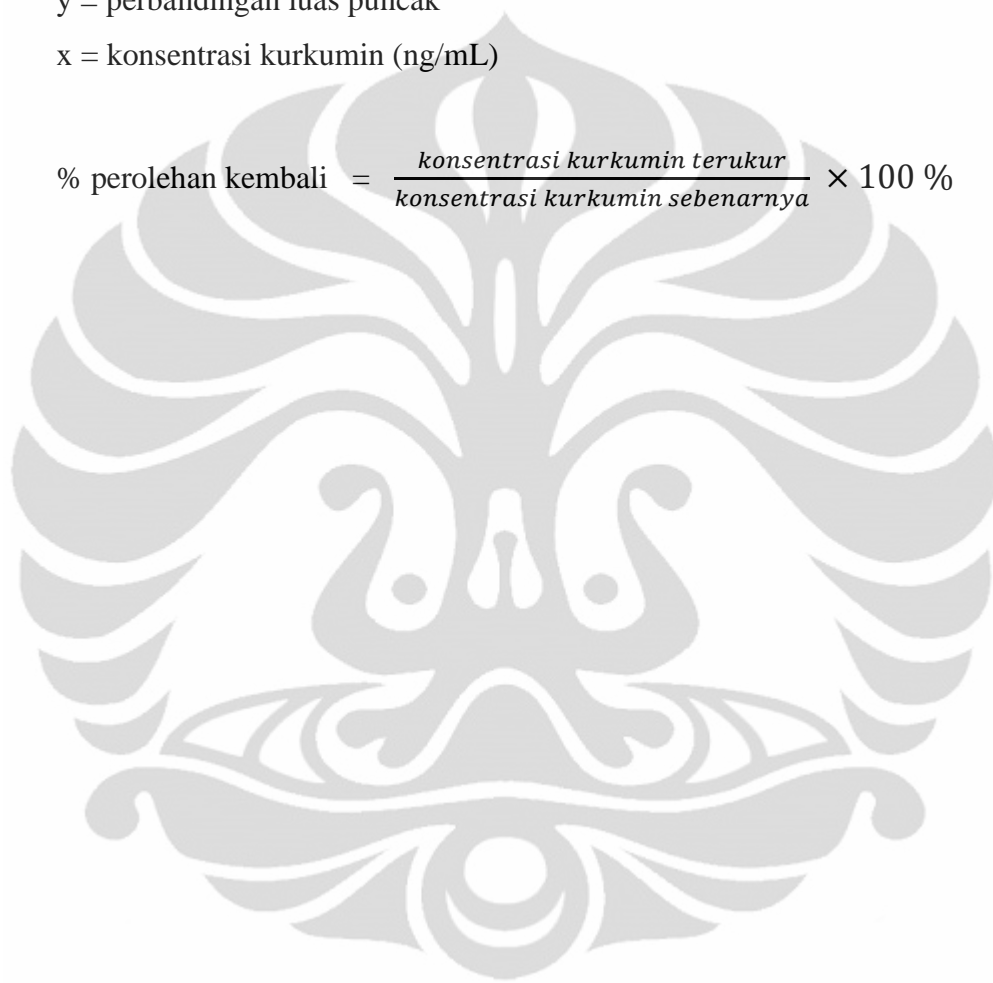
Persamaan kurva kalibrasi

$$y = a + bx$$


y = perbandingan luas puncak

x = konsentrasi kurkumin (ng/mL)

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\textit{konsentrasi kurkumin terukur}}{\textit{konsentrasi kurkumin sebenarnya}} \times 100 \%$$



Lampiran 7a Sertifikat Analisis Kurkumin

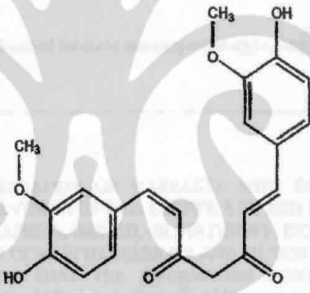


U.S. Pharmacopeia
The Standard of Quality™

USP Certificate

Curcumin

LOT FOH127



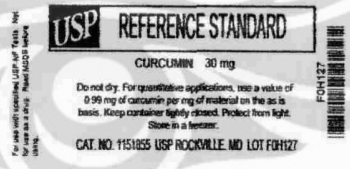
Molecular Formula
C₂₁H₂₀O₆

Molecular Weight
368.38

CAS Number
458-37-7

LABEL TEXT

megAsetia
PT. MEGASETIA AGUNG KIMIA
JAKARTA

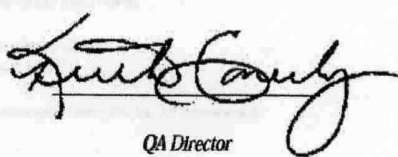


USP REFERENCE STANDARD
CURCUMIN 30 mg

Do not dry. For quantitative applications, use a value of 0.99 mg of curcumin per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Protect from light. Store in a desiccator.

CAT. NO. 151805 USP ROCKVILLE, MD LOT FOH127

USP certifies that the USP Reference Standards Committee, in accordance with their rules and procedures, determined that this USP Reference Standard lot is suitable to assess compliance with the monograph standards for which it is specified. The critical characteristics of this lot are usually determined independently in three or more laboratories, including USP, government, academic, and industrial collaborators.



QA Director

Page 1 of 2

06-Jun-2008

Lampiran 7b Sertifikat Analisis Kurkumin

Calculation Value

Unless otherwise stated on the Reference Standard label, a value of 100.0% should be used in USP or NF compendial applications for which the use of this Reference Standard is intended. Please refer to the specific Reference Standard label for further information.

Expiration

Current lots are identified in the Official USP Reference Standards catalog. In some cases, the previous lot may still be considered official. If so, it is identified in the column marked "Previous Lot/Valid Use Date." Ordinarily, the previous lot is carried in official status for about one year after the current lot enters distribution.

It is the responsibility of each user to determine that this lot is current when used. To ensure up-to-date information, USP publishes the Official USP Reference Standards Catalog, which contains official lot designations.

Instructions for Use

Follow the instructions in the appropriate USP or NF Monographs and General Requirements for Tests and Assays of the current USP-NF. In the event that instructions on the label of this lot differ from those found in the current USP-NF, those on the label supersede any instructions listed in Chapter <11>.

Non-Monograph Use

The suitability of this Reference Standard for use in non-compendial applications is solely the responsibility of the user.

megasetia

PT. MEGASETIA AGUNG KIN
J A K A R T A

LEGAL NOTICE

USP MAKES NO REPRESENTATION OR WARRANTY WITH RESPECT TO THE ACCURACY, COMPLETENESS, OR CURRENTNESS OF THIS CERTIFICATE; AND USP SPECIFICALLY DISCLAIMS ANY OTHER WARRANTY, EXPRESS, IMPLIED, OR STATUTORY, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. USP DOES NOT WARRANT THAT THE INFORMATION CONTAINED HEREIN MEETS THE CUSTOMER'S REQUIREMENTS. USP SHALL NOT BE LIABLE ON ACCOUNT OF ANY SUCH ERRORS OR OMISSIONS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices. This document is not a Material Safety Data Sheet.

This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.

Copyright 2008 The United States Pharmacopeial Convention, Inc. All rights reserved.

Page 2 of 2

06-Jun-2008

Lampiran 8 Sertifikat Analisis Irbesartan

**HETERO LABS LIMITED**

FACTORY : Survey No:10, I.D.A., Gaddapotharam, Jinnaram Mandal, Medak Dist., Andhra Pradesh, INDIA.
Tel : (08459) 277105

OFFICE : "HETERO CORPORATE", 7-2-A2, Industrial Estates, Sanath Nagar, Hyderabad - 500 018, A.P., INDIA.
Tel : 23704923/24/25, Fax : 81-40-23704926, 23714260


CERTIFICATE OF ANALYSIS


Name of the Product : IRBESARTAN.	Reference : USP
Batch No. : IR0170910	Batch Quantity : 102.8Kg
Date of Manufacture : September 2010	Analytical Report No. : IR017/10
Date of Expiry : August 2015	Date of Analysis : 07.10.2010

	TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS
01	Description	A white to Off-white crystalline powder	A white crystalline powder
02	Solubility	Slightly soluble in alcohol and in Dichloromethane. Practically insoluble in water	Complies
03	Identification	I.R.HPLC Similar to working standard.	Complies
04	Water content by K.F	Not more than 0.50%w/w	0.35%
05	Residue on Ignition	Not more than 0.20%w/w	0.05%
06	Heavy Metals	Not more than 0.002%	Less than 0.002%
07	Limit of azide	Not more than 10 ppm	Complies
08	Related compounds by HPLC	Impurity-A : NMT 0.20% #Impurity-1 : NMT 0.15% #Impurity-2 : NMT 0.15% #Impurity-3 : NMT 0.15% Max. single impurity : NMT 0.10% Total impurities : NMT 0.50%	0.01% Not detected Not detected 0.07% 0.07% 0.26%
09	Assay by HPLC	Between 98.0% and 102.0% w/w (On Anhydrous basis)	99.7%
10	Residual solvents by GC	Methanol : NMT 3000 ppm Acetone : NMT 3000 ppm Methylenechloride : NMT 600 ppm Cyclohexane : NMT 3880 ppm Dimethylformamide : NMT 880 ppm O-xylene : NMT 190 ppm	67 ppm 69 ppm Not detected Not detected Not detected 19 ppm

inhouse impurity.
The product **Conforms** to the above specifications.

Prepared by 

Checked by 


Authorized Signatory

Lampiran 9 Sertifikat Analisis Etinil Estradiol

(FOR PT SYDNA)



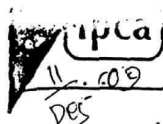
北京紫竹药业有限公司检验报告书

BEIJING ZIZHU-PHARMACEUTICAL CO.,LTD.

Certificate of Analysis

样品名称 Product	炔雌醇 Ethinyl Estradiol(Micro.)	规格 Packing size	
批号 Batch No.	20090603	检验号 Test Number	18090646
批 量 Quantity	10kg	报告书编号 Certificate No.	Y20090646
厂 名 Manufacturer	北京紫竹药业有限公司 BEIJING ZIZHU-PHARMACEUTICA L CO.,LTD.	收检日期 Test date	2009.06.08 Jun 08, 2009
检验依据 Standards	USP30	报告日期 Report date	2009.06.11 Jun 11, 2009
检验项目 Tests	标准规定 Specifications	检验结果 Results	
[性状] Description	白色或几乎白色粉末,无臭, 无味 White or practically white ,odorless powder	白色粉末,无臭, 无味 white ,odorless powder	
溶液的溶解性 Completeness of solution	应符合规定 Conforms to standards	符合规定 Passed	
[鉴别] Identification	应符合规定 Conforms to standards	符合规定 Passed	
红外吸收 (197K) IR (197K)	应符合规定 Conforms to standards	符合规定 Passed	
紫外吸收 (197U) UV (197U)	应符合规定 Conforms to standards	符合规定 Passed	
[检查] Tests			
熔点 Melting range	180~186℃ between 180~186℃	183.5~185.0℃	
比旋度 Specific rotation	-28° 至-29.5° -28° to -29.5°	-28.95°	
干燥失重 Loss on drying	≤1.0% Not more than 1.0%	0.4%	
残留溶剂 Residual Solvents	丙酮≤0.5% acetone≤0.5%	0.05%	
[含量测定] Assay	按干燥品计含 C ₂₀ H ₂₄ O ₂ 应为 97.0~102.0% 97.0~102.0% (on the dried basis)	99.17%	
微粒 Micronization	95% Not more than 5 microns	95%≤5microns	
结 论 Conclusion	符合规定 The product is up to the USP 30 standards.		
备 注 Remark	生产日期: 2009.06.05 Produce date: Jun.5, 2009	有效期至: 2012.06.04 Expire: Jun.4, 2012	
负责人 Director	叶艳	复核员 Checker	张进利 张进利
			检验员 Analyst

Lampiran 10 Sertifikat Analisis Kalium Losartan



IPCA LABORATORIES LIMITED
P. O. SEJAVTA 457 002. DIST. RATLAM (M. P.)

279080.279081.279082
TELEFAX 07412-278064. 278063


QUALITY DIVISION
CERTIFICATE OF ANALYSIS

NAME OF THE PRODUCT : LOSARTAN POTASSIUM USP

BATCH SIZE : 197.50 Kgs BATCH No. : 9002LB3R11
MFG. DATE : Apr. 2009 A. R. No. : IBD - 090899
RETEST DATE : Mar. 2014 DATE : 28/05/2009

TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS
DESCRIPTION	White to off-white powder.	Conforms
SOLUBILITY	Freely soluble in water; slightly soluble in acetonitrile.	Conforms
IDENTIFICATION	A Infrared Absorption spectrum of test and standard are concordant. B The UV absorption spectra of a 10µg/ml solution of test and standard in methanol, exhibit maxima and minima at the same wavelengths. C. It meets the requirements of the test for Potassium	Conforms Conforms Conforms
WATER	NMT 0.5% w/w	0.17% w/w
HEAVY METALS	NMT 0.001% w/w	< 0.001% w/w
CHROMATOGRAPHIC PURITY (By HPLC)	Any individual impurity : NMT 0.20% Total impurities : NMT 0.50%	0.06% 0.09%
ASSAY (By HPLC)	98.5% - 101.0% (on anhydrous, solvent-free basis)	99.6%
RELATED SUBSTANCES (By HPLC)	2-Butyl-4-Chloro-5-formyl Imidazole (BCFI) : NMT 0.15% 2-tetrazolyl-4-methylbiphenyl (TMB) : NMT 0.15% Isomer of Losartan : NMT 0.10% Any unknown impurity : NMT 0.10% Total impurities : NMT 0.50%	< 0.05% < 0.05% < 0.05% < 0.05% < 0.05%
RESIDUAL SOLVENTS	Methanol : NMT 1000 ppm Isopropyl Alcohol : NMT 2000 ppm Methylene Chloride : NMT 200 ppm Ethanol : NMT 2500 ppm Tertiary butanol : NMT 100 ppm	Not Detected 107 ppm Not Detected 113 ppm Not Detected
POLYMORPHISM (By DSC)	Samples exhibit an endothermic maximum of melting at an onset temperature in the range of 267°C to 277°C and an additional endotherm in the range of 229°C to 250°C.	274.64°C 242.38°C
REMARKS :	The above sample CONFORMS as per above Specifications.	


ANALYST
DATE : 09/10/2009


MANAGER QUALITY CONTROL
DATE OF PRINT : 09/10/2009

Lampiran 11 Sertifikat Analisis Kurkuminoid



Specification

820354 Curcumin for synthesis

	Spec. Values
Assay (acidimetric)	> 99 %
Identity (IR)	passes test

Dr. Wolfgang Bollert

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature