

**VALIDASI METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI PADA PENETAPAN KADAR ZERUMBONE YANG
DIPEROLEH DARI LEMPUYANG WANGI**

(*Zingiber aromaticum* Vahl)

RISQAH MATHAR

N11109284



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2013

**VALIDASI METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI
PADA PENETAPAN KADAR ZERUMBONE YANG DIPEROLEH
DARI LEMPUYANG WANGI (*Zingiber aromaticum* Vahl)**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2013

VALIDASI METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI PADA
PENETAPAN KADAR ZERUMBONE YANG DIPEROLEH DARI
LEMPUYANG WANGI (*Zingiber aromaticum* Vahl)

RISQAH MATHAR

N111 09 284

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Pertama

Drs. H. Syaharuddin Kasim, M.Si, Apt
NIP. 19630801 199003 1 001

Dra. Christiana Lethe, M.Si, Apt
NIP . 19481002 198203 2 001

Pada tanggal,2013

PENGESAHAN
VALIDASI METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI PADA
PENETAPAN KADAR ZERUMBONE YANG DIPEROLEH DARI LEMPUYANG
WANGI (*Zingiber aromaticum* Vahl)

OLEH
RISQAH MATHAR
N111 09 284

Dipetrahankan Dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farnasi Universitas Hasanuddin
Pada Tanggal,.....2013

Panitia penguji skripsi

- 1. Ketua** : Dr. Hj.Sartini,M.Si., Apt. (.....)
- 2. Sektretaris** : Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt. (.....)
- 3. Anggota (Ex off)** : Drs. H.Syahrudin Kasim, M.Si, Apt (.....)
- 4. Anggota (Ex off)** : Dra.Cristiana Lethe, M.Si, Apt (.....)
- 5. Anggota** : Dra.Ermina Pakki, M.Si, Apt (.....)

Mengetahui
Dekan Fakultas Farnasi
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt
NIP. 19560224 198601 2 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh batal demi hukum.

Makassar, 25 Juli 2013

Penyusun,

Risqah Mathar

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah segala rasa syukur terpanjat ke hadirat Allah SWT, berkat Rahmat dan Karunia-Nya yang dilimpahkan berupa kekuatan tenaga dan fikiran, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat dan salam penulis haturkan kepada Nabi Muhammad SAW yang senantiasa menuntun seluruh umat manusia ke jalan Allah SWT.

Skripsi ini disusun berdasarkan hasil penelitian penulis dengan judul “ Validasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi pada Penetapan Kadar Zerumbon Yang Diperoleh dari Lempuyang Wangi (*Zingiber aromaticum* Vahl) untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Sains program studi Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih yang setulus-tulusnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada bapak Drs. H. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt dan Ibu Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt selaku pembimbing yang telah memberikan bimbingan, arahan, beserta saran selama penyusunan skripsi ini.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada :

1. Ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA, Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
2. Ibu Dr. Sartini.M.Si., Apt, Ibu Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt dan Ibu Dra.Ermina Pakki,M.Si., Apt selaku tim penguji skripsi yang memberikan saran dan arahnya.
3. Bapak/Ibu Dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas segala Ilmu pengetahuan yang diberikan selama masa perkuliahan.
4. Bapak/Ibu Staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas segala fasilitas dan bantuan lainnya selama masa perkuliahan.
5. Ucapan terima kasih dan penghargaan yang tiada terhingga untuk Umi dan Abi Tersayang serta saudaraku tercinta, terima kasih atas doa restu dan pengorbanannya selama ini.
6. Teman-teman S1 farmasi, khususnya Nasriah,Soendaria Intan,Ayu Asyhari,Pratiwi Syarifuddin dan Suhermawan. Jazakillah khoirant katsiran atas bantuan dan dukungannya..Teman –teman Zerumbon ,Dian Chikita, Faisah, Angela dan Helmi Nurliani terima kasih atas bantuan dan dukungannya selama ini .
- 7.Ucapan terima kasih saya kepada Sufrianto Jufri.SKg yang selalu memberikan bantuan dan doa serta semangat selama ini.Dan kepada Risna Aspanti S.Kom terima kasih atas bantuannya selama ini.

Akhirnya semoga karya ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Amin Allahumma Amin.

Makassar, 25 Juli 2013

Risqah Mathar

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian validasi metode kromatografi cair kinerja tinggi pada penetapan kadar zerumbon yang diperoleh dari lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* Vahl). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui validitas metode kromatografi cair kinerja tinggi pada penetapan kadar senyawa zerumbone dari isolat lempuyang wangi yang dihasilkan dengan melihat parameter validasi yang meliputi; presisi, limit kuantitasi, keterulangan, linearitas dan limit deteksi. Sistem kromatografi cair kinerja tinggi terdiri dari kolom Shim-pack ODS C18 250x 4,6 mm menggunakan fase gerak metanol pro HPLC dengan laju alir 0,6ul/menit dengan suhu 40°C. Berbagai parameter dianalisis dengan menggunakan panjang gelombang maksimum 259 nm. Berdasarkan data penelitian dapat disimpulkan bahwa Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dinyatakan valid pada penetapan kadar zerumbon yang diperoleh dari lempuyang wangi dengan hasil pengujian linearitas dengan konsentrasi 25,50,100,200,300,400, dan 500 dengan nilai $r = 0,997$. Hasil persisi sebesar 0,7% untuk pembandingan dan 2,5% untuk sampel. LOD dengan nilai 0,1 ug/ml dan LOQ 0,5ug/ml. Hasil pengujian Keterulangan nilai Koevisien variasi yaitu 1,15% dan 2,53%.

ABSTRACT

Validation studies have been conducted high performance liquid chromatography method to assay zerumbon derived from *Zingiber aromaticum* Vahl. This study aims to determine the validity of the method of high performance liquid chromatography assay zerumbone compound of fragrant ginger isolates generated by looking at the parameter validation which includes; precision, limit of quantitation, repeatability, linearity and limit deteksi. Sistemkromatografi consists of high-performance liquid column Shim-pack 250X 4.6 mm C18 ODS using methanol mobile phase with a flow rate of HPLC pro 0.6 ul / min. Various parameters were analyzed using the maximum wavelength of 259 nm. Based on data from this study concluded that the method of High Performance Liquid Chromatography declared invalid on zerumbon assay obtained from ginger scented with the test results 25,50,100,200,300,400 linearity with concentration, and 500 dengan value of 0.997. Results precision of 0.7 and 2.5% for comparator sampel. LOD% to the value of 0.1 ug / ml and LOQ 0.5 ug / ml. Repeatability test results Koevisien value variation is 1.15% and 2.53%.

DAFTAR ISI

halaman	
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Uraian Tumbuhan	5
II.1.1 Klasifikasi Tumbuhan	5
II.1.2 Morfologi Tumbuhan	5
II.1.3 Khasiat	6
II.1.4 Kandungan kimia	6
II.2 Uraian Tentang Zerumbon.....	7
II.2.1 Terpen.....	7
II.2.2 Sesquiterpenoid.....	7
II.2.3 Zerumbon	8
II.3. Validasi Metode Analisis.....	8
II.3.1 Parameter Validasi	9
II.3.1.1 Linearitas.....	9
II.3.1.2 Limit Deteksi	10
II.3.1.3 Limit Kuantifikasi	11
II.3.1.4 Ketelitian	11

II.3.1.5 Ketepatan.....	11
II.3.1.6 Selektivitas.....	12
II.4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	12
II.4.1 Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	13
II.4.2 Bagian Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	13
II.4.2.1 Wadah Fase Gerak.....	13
II.4.2.2 Fase Gerak	14
II.4.2.3 Pompa Pada Kromatografi Cir Kinerja Tinggi	15
II.4.2.4 Kolom dan Fase Diam pada KCKT	16
II.4.2.5 Detektor KCKT.....	17
II.4.2.6 Tempat Injeksi Sampel	20
II.4.2.7 Komputer,Integrator,atau Rekorder.....	21
II.4.3 Jenis-jenis KCKT.....	21
II.4.3.1. Kromatografi Adsorbsi.....	21
II.4.2.2. Kromatografi Partisi.....	22
II.4.2.3 Kromatografi Penukar Ion.....	22
II.4.2.4. Kromatografi Pasangan Ion.....	23
II.4.2.5. Kromatografi Eksklusi Ukuran.....	23
II.5.Derivatisasi pada KCKT.....	24
II.6 Densitometri	24
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN.....	25
III.1 Alat dan Bahan	25
III.2 Metode Kerja	25
III.2.1 Pemilihan panjang gelombang	25
III.3.Uji Validasi.....	26
III.3.1 Penyiapan Larutan Baku Zerumbon.....	26
III.3.2 Uji Presisi	26

III.3.3.Uji Keterulangan	27
III.3.4 Uji Linearitas	27
III.3.5 Uji LOQ dan LOD	27
III.4 Analisis Data	27
III.5 Pembahasan Hasil	28
III.6 Pengambilan Kesimpulan	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
IV.1 Hasil Penelitian	29
IV.1.1 Pemilihan Panjang Gelombang Maksimum.....	29
IV.1.2 Hasil Pengujian Linearitas	29
IV.1.3 Kurva Baku Linearitas.....	30
IV.1.4 Hasil Pegujian Batas Deteksi dan Kuantitas	30
IV.1.5 Hasil Pengujian Presisi	31
IV.1.6 Hasil Pengujian Keterulangan Sampel	31
IV.1.7 Hasil Pengujian Ketrulangan Pembanding	32
IV.2 Pembahasan.....	32
IV.2.1 Pemilihan Panjang Gelombang Maksimum	33
IV.2.2 Presisi	33
IV.2.3 Linearitas	34
IV.2.4 Batas Deteksi	34
IV.2.5 Batas Kuantitas	35
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	36
V.1 Kesimpulan	36
V.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37

DAFTAR TABEL

Tabel halaman

1. Hasil pengujian linearitas pada panjang gelombang max.....	29
2. Hasil Pengujian Batas Deteksi dan Batas Kuantitas	30
3. Hasil Pengujian Presisi pada konsentrasi terendah dan konsentrasi tertinggi.....	31
4. Hasil Pengujian Keterulangan Sampel 200 ppm.....	31
5. Hasil Pengujian Keterulangan Perbandingan Zerumbon	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar halaman

1. Gambar stuktur zerumbone	8
2. Instrumen dasar kromatografi cair kinerja tinggi	13
3. Injektor pada kromatografi cair kinerja tinggi.....	20
4. Gambar panjang gelombang maksimum	28
5. Grafik Data linearitas Zerumbon	30
6. Foto Tanaman lempuyang wangi(<i>Zingiber aromaticum</i> Vahl).....	39
7. Foto Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	39

DAFTAR LAMPIRAN

halaman

1. Tanaman Lempuyang wangi	39
2. Instrumen kromatografi cair kinerja tinggi	39
3. Skema Kerja Penetapan Kadar Zerumbon dalam sampel dan presisi metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	40
4. Pengujian Linearitas, Batas Deteksi dan Batas Kuantitas Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	41
5. Pengujian Keterulangan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	42
6. Perhitungan LOD dan LOQ.....	43
7. Perhitungan Presisi	45
8. Perhitungan Keterulangan	46
9. Kromatogram Linearitas Dari HPLC.....	47
10. Kromatogram Presisi Konsentrasi Terendah Dari HPLC	48
11. Kromatogram Presisi Konsentrasi Tertinggi Dari HPLC	49
12. Kromatogram Keterulangan Sampel Isolat Zerumbon HPLC	50
13. Kromatogram Keterulangan Pembanding Zerumbon HPLC	51

BAB I

PENDAHULUAN

Tumbuhan merupakan bahan alam yang banyak digunakan sebagai obat tradisional dan telah digunakan sejak lama oleh masyarakat Indonesia, bahkan sampai sekarang pengobatan ini terus berkembang dan mengalami peningkatan baik untuk pemeliharaan kesehatan maupun pengobatan gangguan kesehatan(1). Sementara ini banyak orang beranggapan bahwa penggunaan tanaman obat atau obat tradisional relatif lebih aman dibandingkan obat sintesis. Obat tradisional dan tanaman obat banyak digunakan masyarakat menengah ke bawah terutama dalam upaya preventif, promotif dan rehabilitatif. Salah satu tanaman yang sering digunakan sebagai obat yaitu dari suku Zingibericeae (lempuyang wangi)(2).

Tanaman lempuyang wangi termasuk familia atau suku Zingiberaceae (Tampubolon, 1981). Bagian tumbuhan lempuyang wangi yang digunakan sebagai obat adalah rimpangnya (rhizoma). Rimpang lempuyang wangi memiliki aroma yang khas yang disebabkan oleh komponen kimia yang terkandung di dalam minyak atsiri lempuyang wangi. Senyawa kimia yang mendominasi susunan minyak atsiri pada rimpang lempuyang wangi adalah limonen, yang merupakan zat aktif yang menyebabkan lempuyang wangi mengeluarkan bau sedap yang khas. Secara tradisional rimpang lempuyang wangi digunakan untuk mengobati sakit perut, sakit kulit, influenza, anemia, malaria, batuk, dan

vertigo. Zerumbon yang merupakan senyawa aktif dalam lempuyang wangi diduga mempunyai khasiat menyembuhkan berbagai penyakit (Indri Ambarsari et al 2007). Manju dan Nalini (2005) melaporkan bahwa dalam rimpang lempuyang wangi yang berperan sebagai zat anti kanker adalah senyawa sesquiterpene zerumbon(3.4).

Zerumbon merupakan suatu sesquiterpene berbentuk kristal golongan terpenoida yang terdiri dari tiga satuan isoprena yang memiliki bobot molekul (BM) 218 m/z, bersifat nonpolar, volatil dan memiliki karakteristik sitotoksik yang selektif terhadap garis sel kanker dan garis sel normal, serta sebagai anti inflamasi dan kemoterapi(2).

Zerumbon telah terbukti sangat ampuh sebagai antikanker dan antitumor, zerumbon menekan aktivasi NF-kappaB dan NF-kappaB- diatur ekspresi gen yang disebabkan oleh karsinogen, dan melaporkan bahwa penghambatan ini dapat memberikan molekul dasar untuk pencegahan dan pengobatan kanker (Takada et al., 2005). Pada tahun yang sama juga(Huang 2005) mengidentifikasi bahwa zerumbon menghambat pertumbuhan P-388D sel dan fragmentasi DNA yang diinduksi dan secara signifikan memperpanjang hidup P-388D (1)-bantalan CDF(1) pada tikus. Selain itu juga menghambat pertumbuhan lini sel leukemia manusia (HL-60 sel) dan Kanker usus besar manusia (HT-29) in vitro (Kirana et al.,2003). Zerumbon bertindak sebagai kemoterapi dan sangat ampuh melawan kanker usus besar dan kulit (Tanaka et al., 2001)(5).

Untuk mendukung pengembangan sediaan obat tradisional dari lempuyang wangi, maka diperlukan suatu metode analisis untuk menentukan zat aktif dalam tanaman tersebut. Menurut Rohman dan Ibnu (2007), kriteria yang harus dipenuhi suatu metode analisis yang baik adalah: Peka (sensitive) artinya metode harus dapat digunakan untuk menetapkan kadar senyawa dalam konsentrasi yang kecil. Selektif, artinya untuk penetapan kadar senyawa tertentu, metode tersebut tidak banyak terpengaruh oleh adanya senyawa lain. Tepat (precise) artinya metode tersebut menghasilkan suatu hasil analisis yang sama atau hampir sama dalam satu seri pengukuran (penetapan). Teliti (accurate) artinya metode dapat menghasilkan nilai rata-rata (mean) yang sangat dekat dengan nilai sebenarnya (true value). Kasar (rugged) artinya ada perubahan komposisi pelarut atau variasi lingkungan tidak menyebabkan perubahan hasil analisis. Praktis artinya metode tersebut mudah dikerjakan serta tidak banyak memerlukan waktu dan biaya(6,7,8).

Menurut International conference of harmonization (ICH) ada sepuluh parameter validasi yang dapat dilakukan adalah Presisi, Batas deteksi, Batas kuantitas, Spesifitas, Linearitas, Kisaran (range), Ketahanan, Kekasaran dan Kesesuaian sistem (6). Salah satu metode analisis yang banyak untuk digunakan saat ini adalah kromatografi cair kinerja tinggi. Kromatografi cair kinerja tingkat tinggi (KCKT). Hampir semua laboratorium analisis kimia memiliki instrumen KCKT. Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan, pemurnian dan penentuan kadar

senyawa obat dalam sediaan farmasetika. Lebih lanjut, KCKT juga dapat digunakan untuk identifikasi kualitatif senyawa obat dengan mendasarkan pada parameter waktu retensi senyawa obat standar dan senyawa obat dalam sampel(7).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas, maka rumusan masalah yang dapat diambil adalah: “apakah metode kromatografi cair kinerja tinggi valid untuk digunakan pada penetapan kadar senyawa zerumbone yang diperoleh dari Lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* Vahl) memenuhi uji validasi?

Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui validitas metode kromatografi cair kinerja tinggi pada penetapan kadar senyawa zerumbone dari ekstrak lembuyang wangi yang dihasilkan dengan melihat parameter validasi yang meliputi; presisi, keterulangan, limit kuantitasi, linearitas dan limit deteksi.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat diperoleh suatu metode yang valid dan handal sehingga dapat digunakan sebagai acuan dalam proses analisis senyawa zerumbone dalam sediaan obat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Bahan

II.1.1 Klasifikasi

- Regnum : Plantae
- Divisi : Spermathophyta
- Anak divisi : Angiospermae
- Kelas : Monocotyledonae
- Bangsa : Zingiberales
- Suku : Zingiberaceae
- Marga : Zingiber
- Jenis : *Zingiber aromaticum* Vahl.(9)

II.1.2 Morfologi

Habitat tanaman ini yaitu di semak dengan tinggi kurang lebih 75 cm, mempunyai batang yang semu, lunak, merupakan pelepah daun, bulat, didalam tanah membentuk rimpang, berwarna hijau. Daun tunggal berseling, bulat telur dengan ujung meruncing, tepi rata pertulangan menyirip, panjang kurang lebih 20 cm, lebar 9 cm, warna hijau. Bunga berbentuk tandan terdapat diujung, rangkai panjang kurang lebih 20 cm, kelopak bergigi satu, tajuk berbentuk tabung, putik salu berwarna hijau kemerah-merahan. Buah kotak ,bulat telur,panjang kurang lebih 12 mm, diameter 8mm, berwarna merah. Bijinya bulat panjang, diameter kurang lebih 4mm±.Akar serabut , putih kotor(9).

II.1.3 Khasiat

Rimpang *Zingiber aromaticum* berkhasiat sebagai obat masuk angin, obat sakit perut, obat wasir, obat sesak nafas, obat pilek, obat radang usus, obat kolera, obat malaria, obat syaraf lemah, obat encok dan obat cacing, penambah darah dan penambah nafsu makan. Untuk obat masuk angin dipakai \pm 10 gram rimpang segar *Zingiber aromaticum*, dicuci, diparut, peras kemudian disaring. Hasil saringan ditambah 2 sendok makan madu dan 2 gelas air matang panas, diaduk, diminum sehari dua kali sama banyak pagi dan sore (9).

II.1.4 Kandungan kimia

Kandungan zat dalam rimpang lempuyang wangi antara lain adalah α -kurkumen, bisabolen, zingiberen, kariofilen, seskuifelandren, zerumbon, limonen, kamfer, zat pedas gingerol, sogaol, zingeron, paradol, heksahidroksurkumin, dihidrogingerol. Informasi lain menyebutkan bahwa kandungan zat dalam rimpang lempuyang wangi antara lain adalah damar, tanin, resin, pati, gula (BPPT, 2005) (2).

Beberapa senyawa kimia penyusun minyak atsiri dari lempuyang wangi adalah α -curcumine 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione ($C_{21}H_{20}O_6$). Bisabolene 2-methyl-6-(4-methyl-1-cyclohex-3-enylidene)-hept-2-ene ($C_{15}H_{24}$). Zingiberen 5-(1,5-dimethylhex-4-enyl)-2-methylcyclohexa-1,3-dien ($C_{15}H_{24}O$) α -kariofilen 2,6,9-humulatrien, humulen, humulen ($C_{15}H_{24}$). Zerumbone 2,6,9,9-Tetramethylcycloundeca-2,6,10-trien-1-one ($C_{15}H_{22}O$) Limonen 1-methyl-4-prop-1-en-2-yl-

cyclohexene ($C_{10}H_{16}$) b-linalool 3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol ($C_{10}H_{18}O$)
 Camphor 1,7,7-trimethylnorbornan-2-one ($C_{10}H_{16}O$) Gingerol 5-hydroxy-
 1-(4-hydroxy-3-methoxy-cyclohexyl)-decan-3-one($C_{17}H_{32}O_4$).Paradol 1-
 (4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)decan-3-one $C_{17}H_{26}O_3$ (2).

II.2 Uraian Tentang Zerumbone

II.2.1 Terpen

Kata Terpenoid mencakup sejumlah besar senyawa tumbuhan, dan istilah ini digunakan untuk menunjukkan bahwa secara biosintesis semua senyawa tumbuhan itu berasal dari senyawa yang sama. Jadi, semua terpenoid dari molekul Isoprene $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$ dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan C5. Kemudian senyawa ini dipilah-pilah menjadi beberapa golongan berdasarkan jumlah satuan yang terdapat dalam senyawa tersebut : hemiterpene (C5), monoterpena (C10), seskuiaterpena (C15), diterpena (C20), sesterpena (C25) dan triterpena (C30) (10,17)

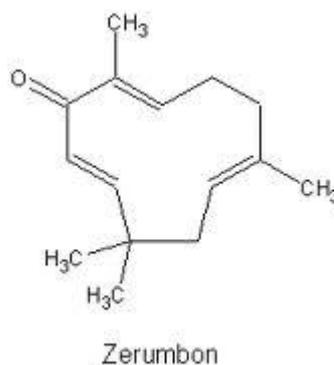
II.2.2 Sesquiterpenoid

Sesquiterpenoid adalah senyawa C15, biasanya dianggap berasal dari tiga satuan isoprene. Seperti Monoterpenoid, Sesquiterpenoid terdapat sebagai komponen minyak atsiri yang tersuling uap, dan berperan penting dalam memberi aroma kepada buah dan bunga yang kita kenal (10,17).

II.2.3 Zerumbon

Zerumbon merupakan suatu seskuiterpena berbentuk kristal golongan terpenoida yang terdiri dari tiga satuan isoprena yang memiliki bobot molekul(BM) 218 m/z, bersifat nonpolar, volatil, memiliki struktur keton silang terkonjugasi pada sebelas cincin karbon (3).

Zerumbone memiliki rumus molekul $C^{15}H^{22}O$ dengan berat molekul 218.3345800, serta titik didih $321^{\circ}C - 322^{\circ}C$. sinonim dari Zerumbone berdasarkan data IUPAC adalah 2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-2,6,10-trien-1-one(10).



Gambar 1. Struktur Zerumbone ($C^{15}H^{22}O$).

II.3 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan suatu tahapan penting dalam penjaminan mutu analisis kuantitatif. Validasi metode menurut United States Pharmacopeia(USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis bersifat akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Selain itu, validasi metode dilakukan jika terjadi perubahan kondisi antara kondisi analisis dan kondisi pada saat validasi metode, atau terjadi perubahan metode dari metode standar. Beberapa manfaat validasi metode analisis adalah untuk mengevaluasi

unjuk kerja suatu metode analisis, menjamin prosedur analisis, menjamin keakuratan dan kedapatulangan hasil prosedur analisis, dan mengurangi risiko penyimpangan yang mungkin timbul (6,7).

Validasi menurut Harmita merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi menurut SK Menkes RI No.43/Menkes/SK/II/1988 tentang cara pembuatan obat yang baik(CPOB) merupakan suatu tindakan pembuktian dengan cara yang sesuai bahwa tiap bahan, prosedur, kegiatan, sistem, perlengkapan, atau mekanisme yang digunakan dalam produksi dan pengawasan akan senantiasa mencapai hasil yang diinginkan (Depkes RI 2001). Association of South East Asian Nation Good Manufacturing Practice (ASEAN GMP) menyatakan bahwa validasi adalah kegiatan membuktikan dengan pasti bahwa material, proses, prosedur, aktivitas, sistem, peralatan, atau mekanisme yang digunakan di pabrik akan mencapai hasil yang diharapkan pada standar yang konsisten (7).

II.3.1 Parameter Validasi

II.3.1.1.Linearitas

Linearitas menunjukkan kemampuan suatu metode analisis untuk memperoleh hasil pengujian yang sesuai dengan konsentrasi analit dalam contoh pada kisaran konsentrasi tertentu. Linearitas suatu metode analisis adalah ukuran yang menunjukkan tingkat kesesuaian atau korelasi antara

kadar analit dan respons detektor, dinyatakan sebagai koefisien korelasi (r). Respons detektor yang digunakan adalah luas area puncak untuk instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Koefisien korelasi didapat dengan cara menghitung regresi dari persamaan linearnya, sedangkan perpotongan dengan sumbu y menyatakan ukuran biasnya. Selang linearitas adalah selang antara konsentrasi tertinggi dan terendah dari analit yang dapat ditetapkan menggunakan suatu metode dengan tingkat, ketelitian, kecermatan, dan koefisien korelasi yang telah dilakukan. Nilai r yang dihasilkan lebih besar atau sama dengan 0.9900(8). Secara matematis, nilai r dapat dihitung dengan menggunakan rumus dengan

r = koefisien korelasi

x_i = konsentrasi analit setiap ulangan

\bar{x} = konsentrasi analit rerata

y_i = luas area puncak setiap ulangan

\bar{y} = luas area puncak rerata

II.3.1.2.Limit Deteksi

Limit deteksi (LD) adalah konsentrasi analit terendah di dalam suatu contoh yang dapat dideteksi tetapi tidak harus terkuantitasi pada kondisi percobaan yang ditetapkan. Umumnya nisbah respons antara analit:derau adalah 3:1. LD dihitung dari rerata kemiringan garis dan simpangan baku intersep kurva standar yang diperoleh (10,11).

II.3.1.3 Limit Kuantifikasi

Limit kuantifikasi adalah konsentrasi analit terendah yang terdapat dalam contoh yang dapat diukur secara tepat dan teliti. Limit Kuantifikasi dapat dihitung sebagai konsentrasi analit yang memiliki respons analit:derau sebesar 10:1. LK dihitung dari rerata kemiringan garis dan simpangan baku intersep kurva standar yang diperoleh (10,11).

II.3.1.4. Ketelitian

Ketelitian dapat dinyatakan dengan tiga cara, yaitu kedapatulangan, ketelitian intermediet, dan ketertiruan. Ketelitian adalah kesamaan hasil dari tiap individu ketika metode tersebut diterapkan berulang kali pada berbagai pencuplikan suatu contoh homogen. Ketelitian diukur dengan menghitung simpangan baku relatif (SBR) dari lima kali pengukuran ulang. Menurut ICH syarat penerimaan parameter validasi ini, sebagai berikut: sangat teliti (%SBR \leq 1), teliti (%SBR 1-2), sedang (%SBR 2-5), dan tidak teliti (%SBR \geq 5)(12,20).

II.3.1.5. Ketepatan

Ketepatan suatu prosedur analisis didefinisikan sebagai kedekatan hasil yang diterima (baik sebagai nilai teoretis maupun dengan nilai rujukan yang diterima) dengan nilai yang diperoleh dari hasil pengukuran. Ketepatan adalah kedekatan nilai hasil percobaan yang diperoleh dari suatu metode terhadap nilai sebenarnya. Ketepatan diukur dengan menghitung perolehan kembali (PK) menggunakan metode penambahan

standar. Nilai PK bergantung pada matriks contoh, prosedur proses contoh, dan konsentrasi analit (12,13).

II.3.1.6 Selektivitas (Spesifisitas)

Definisi Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan (13,14).

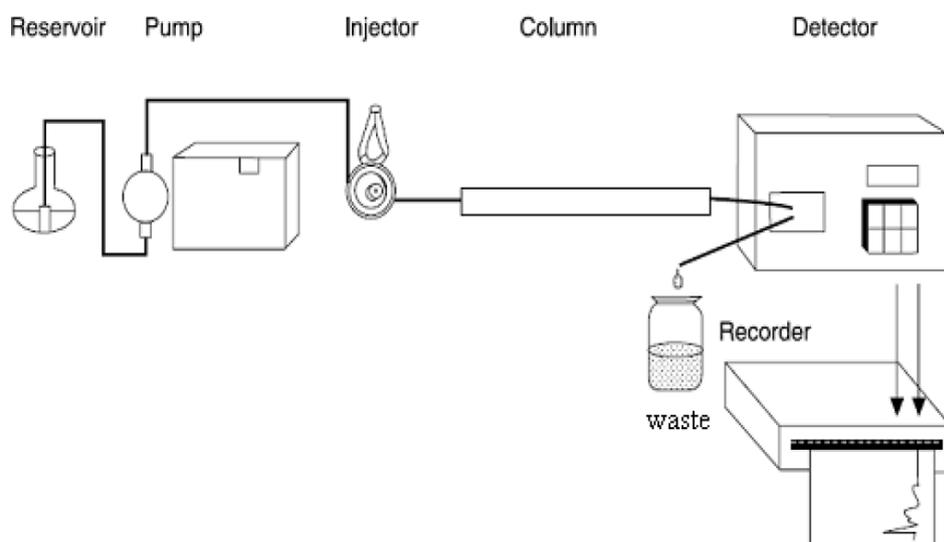
II.4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi merupakan tehnik dimana analit atau zat-zat tertentu terpisah perbedaan kecepatan elusi dikarenakan zat-zat ini melewati suatu kolom kromatografi. KCKT adalah suatu teknik analisis kromatografi dengan menggunakan tekanan tinggi yang berguna untuk pemisahan ion atau molekul terlarut dalam suatu larutan. Teknik ini berkembang untuk mengatasi kelemahan-kelemahan pemisahan pada kromatografi gas, seperti senyawa yang relatif tidak tahan panas dan senyawa yang tidak volatil. KCKT berdasarkan kepolaran kolomnya dibagi menjadi dua, yaitu fase normal dan terbalik. Kromatografi fase normal menggunakan fase diam lebih polar daripada fase gerak, sedangkan pada kromatografi fase

terbalik, fase gerak lebih polar daripada fase diam. Proses pemisahan campuran komponen terjadi di dalam kolom, yaitu berdasarkan perbedaan distribusi masing-masing komponen pada fase diam dan fase gerak. Zat-zat yang berinteraksi kuat dengan fase diam akan tertahan lebih lama dalam kolom, sedangkan yang berinteraksi lemah akan keluar dengan cepat dari kolom (7,13,14).

II.4.1 Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi terdiri atas 6 bagian, yakni: wadah fase gerak (*reservoir*), pompa (*pump*), tempat injeksi sampel (*injector*), kolom (*column*), detektor (*detector*) dan perekam (*recorder*)(18).



Gambar 2. Instrumen dasar kromatografi cair kinerja tinggi

II.4.2 Bagian –bagian Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

II.4.2.1. Wadah Fase Gerak

Wadah fase gerak merupakan wadah untuk menampung fase gerak yang digunakan selama proses pemisahan dengan KCKT. Wadah

ini harus inert atau lembam dan bersih atau tidak bereaksi dengan komponen fase gerak. Sebagai wadah fase gerak, dapat digunakan wadah pelarut kosong ataupun labu laboratorium. Wadah ini biasanya menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter(7,13).

Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan degassing atau penghilangan gas yang ada pada fase gerak, sebab akan mengacaukan analisis. Adanya pengotor dalam reagen dapat menyebabkan gangguan pada sistem kromatografi. Adanya partikel kecil dapat terkumpul dalam kolom atau dalam tabung yang sempit, sehingga dapat mengakibatkan suatu kekosongan pada kolom. Karena itu fase gerak sebelum digunakan harus disaring terlebih dahulu (7).

II.4.2.2.Fase Gerak

Fase gerak atau biasanya disebut eluen terdiri atas satu atau campuran pelarut bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Fase gerak harus berinteraksi dengan fase diam yang sesuai untuk memisahkan campuran senyawa obat secepat dan seefisien mungkin. Kriteria pemilihan fase gerak didasarkan pada:

- a. Viskositas; pelarut dengan viskositas rendah menghasilkan tekanan yang lebih rendah dibandingkan pelarut dengan viskositas tinggi pada kecepatan alir tertentu. Viskositas rendah juga memungkinkan kromatografi yang lebih cepat karena perpindahan massa berlangsung lebih cepat.

- b. Transparansi terhadap UV ;jika detektor UV yang digunakan ,maka fase gerak harus transparan secara sempurna pada panjang gelombang yang digunakan.
- c. Indeks bias ;hal ini hanya penting jika detektor indeks bias yang digunakan. Perbedaan indeks bias antara pelarut dengan sampel harus besar jika kita bekerja dengan batas-batas deteksi tertentu.
- d. Titik didih;titik didih fase gerak yang rendah diperlukan jika eluat akan dilakukan pemrosesan lebih lanjut supaya memudahkan dalam penguapannya.
- e. Kemurnian ;kriteria ini mempunyai makna yang berbeda tergantung pada penggunaan yang diinginkan ,yakni tidak adanya senyawa yang mengganggu pada bentuk deteksi yang digunakan ,tidak adanya senyawa yang menggganggu elusi gradien.
- f. Lambam (inert) terkait dengan senyawa sampel ;fase gerak harus tidak bereaksi sama sekali dengan campuran sampel .
- g. Toksisitas;seorang analis harus menghindari penggunaan produk yang toksik semaksimal mungkin. Pelarut-pelarut terklorinasi dapat melepaskan gas fosgen yang sangat toksik.
- h. Harga

II.4.2.3.Pompa pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Pompa yang cocok digunakan pada KCKT adalah pompa yang mempunyai syarat sebagai syarat wadah pelarut yakni pompa harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah

gelas, baja tahan karat, teflon dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 500psi 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(15).

Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fase gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan dan bebas dari gangguan. Ada dua jenis pompa pada kckt yaitu pompa dengan tekanan konstan , dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan. Tipe pompa dengan aliran fase gerak yang konstan sejauh ini lebih umum dibandingkan tipe pompa dengan tekanan konstan (7,13,16).

II.4.2.4.Kolom dan Fase Diam pada KCKT

Ada 2 jenis kolom pada KCKT yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor. Kolom mikrobor mempunyai tiga keuntungan yang utama dibanding dengan kolom konvensional ,yakni:

- a.Konsumsi fase gerak kolom mikrobor hanya 80% atau lebih kecil dibanding dengan kolom konvensional karena pada kolom mikrobor kecepatan alir fase gerak lebih lambat 10-100 ul/menit.
- b.Adanya aliran fase gerak yang lebih lambat membuat kolom mikrobor lebih ideal jika digabung dengan spektrometer massa.

c.Sensitivitas kolom mikrobor ditingkatkan karena solut lebih pekat ,karenanya jenis kolom ini sangat bermanfaat jika jumlah sampel terbatas misal sampel klinis.

II.4.2.5.Detektor KCKT

Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu detektor universal(yang mampu mendeteksi zat secara umum,tidak bersifat spesifik,dan tidak bersifat selektif). Seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometer massa dan golongan detektor yang spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif seperti detektor uv-vis , detektor fluoresensi, dan elektrokimia (7,14,15).

Idealnya, suatu detektor harus mempunyai karakteristik sebagai berikut;

- 1.Mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduibel
- 2.Mempunyai sensitifitas yang tinggi ,yakni mampu mendeteksi solut pada kadar yang sangat kecil.
- 3.Stabil dalam pengoperasiannya
- 4.Mempunyai sel volume yang kecil sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita.
- 5.Signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas.
- 6.Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fasegerak

Jenis detektor yang digunakan pada KCKT

a. Detektor Spektrofotometer UV-Vis

Detektor jenis ini merupakan detektor yang paling banyak digunakan dan sangat berguna untuk analisis di bidang farmasi karena kebanyakan senyawa obat yang mempunyai struktur yang dapat menyerap sinar 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. Sel detektor umumnya berupa tabung dengan diameter 1 nm dan panjang celah optiknya 10 nm, serta diatur sedemikian rupa sehingga mampu menghilangkan pengaruh indeks bias yang dapat mengubah absorbansi yang terukur (7,16,18)

b. Detektor *photodiode-array* (PDA)

Detektor UV-Vis merupakan detektor yang paling banyak dipakai, akan tetapi karena banyak analit yang diukur maka akan ada kecenderungan puncak-puncak kromatogram yang tidak terdeteksi dan juga akan ada detektor UV-Vis dengan berbagai keistimewaan. Detektor ini mampu memberikan kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses (*single run*). Selama proses berjalan, suatu kromatogram pada panjang gelombang yang diinginkan (biasanya antara 190-400) dapat ditampilkan. Dengan demikian PDA memberikan lebih banyak informasi komposisi sampel dibanding dengan detektor UV-Vis. Dengan detektor ini, juga diperoleh

spektrum UV tiap puncak yang terpisah sehingga dapat dijadikan sebagai alat yang penting untuk memilih panjang gelombang maksimal untuk sistem KCKT yang digunakan. Dan akhirnya dengan membandingkan antara spektra analit dengan spektra seyawa yang sudah diketahui.(7,16,18)

c. Detektor fluoresensi

Fluoresensi merupakan fenomena luminisensi yang terjadi ketika suatu seyawa menyerap sinar UV atau visibel lalu mengemisikannya pada gelombang yang lebih besar. Tidak semua senyawa obat mempunyai sifat fluoresen sehingga detektor fluoresensi ini sangat spesifik. Di samping itu, detektor ini juga sangat sensitif dibandingkan dengan detektor UV.(7,16,18)

d. detektor indeks bias

Detektor indeks bias merupakan detektor yang bersifat universal yang mampu memberikan respon (signal) pada setiap zat terlarut. Detektor ini akan merespon setiap perbedaan indeks bias antara analit (zat terlarut) dengan pelarutnya (fase gerak). Kelemahan yang utama detektor ini adalah bahwa indeks bias dipengaruhi oleh suhu, oleh karena itu suhu fase gerak, kolom, dan detektor harus dikendalikan secara seksama.(7,16,18)

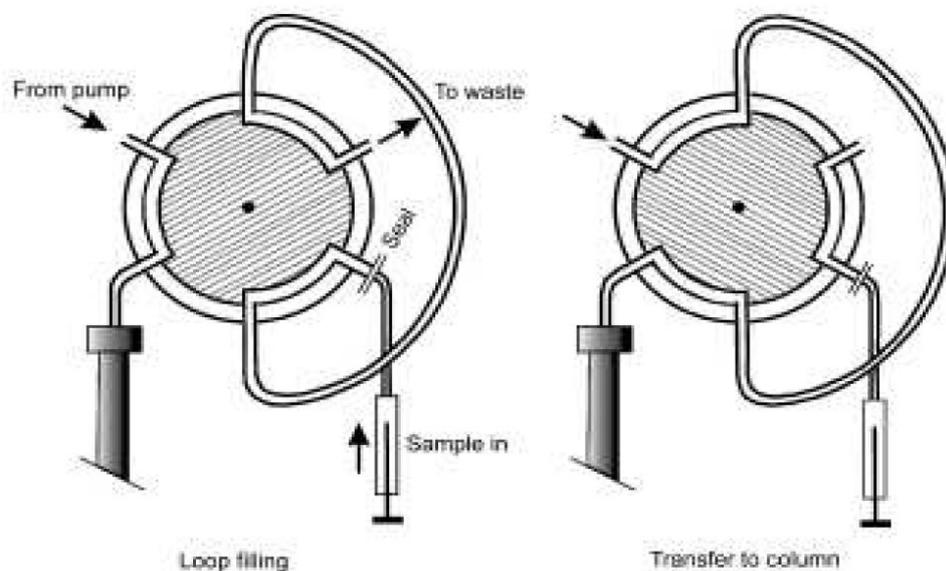
e. detektor elektrokimia

Banyak senyawa organik (termasuk oleh) dapat dioksidasi atau direduksi secara elektrokimia pada elektroda yang cocok. Arus yang

dihasilkan pada proses ini dapat diperkuat hingga memberikan respon yang sesuai. Kepekaan detektor elektrokimia pada umumnya tinggi. Detektor elektrokimia yang paling banyak digunakan adalah detektor konduktivitas dan detektor amperometri.(7,16,18)

II.IV.2.6 Tempat Injeksi Sampel (*Injector*)

Ada 3 jenis macam tempat injeksi sampel atau injektor (*injector*), yakni: tempat injeksi sampel syringe (*syringe injector*), katup sampling (*sampling valve*) dan tempat injeksi sampel otomatis (*automatic injector*). Tempat injeksi sampel syringe (*syringe injector*) merupakan bentuk tempat injeksi sampel atau injektor (*injector*) yang paling sederhana(18)



Gambar 3. Katup sampling (*sampling valve*) atau tempat injeksi sampel manual (*manual injector*)

Katup sampling (*sampling valve*) atau tempat injeksi sampel manual (*manual injector*) mengandung 6 katup saluran dilengkapi dengan rotor, lengkungan sampel (*sample loop*) dan celah jarum suntik (*needle port*).

Larutan sampel akan disuntikkan kedalam lengkungan sampel (*sample loop*) dengan jarum suntik gauge pada posisi “masuk (*load*)” dan larutan sampel yang ada di lengkungan sampel (*sample loop*) kemudian akan dialirkan ke kolom dengan memutar rotor ke posisi “injek (*inject*)”. Ukuran lengkungan sampel (*sample loop*) eksternal bervariasi antara 6 μL hingga 2 mL (Ornaf dan Dong, 2005). Tempat injeksi sampel otomatis (*automatic injector*) atau disebut juga *autosampler* memiliki prinsip yang mirip, hanya saja sistem pemasukkan sampelnya bekerja secara otomatis.

II.4.2.7. Komputer ,Integrator,atau Rekorder

Alat pengumpul data seperti komputer ,integrator atau rekorder,dihubungkan dengan detektor..Alat ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu memplotkannya sebagai suatu kromatogram yang selanjutnya dapat dievaluasi oleh seorang analis(7,19).

II.4.3 Jenis –jenis KCKT

II.4.3.1.Kromatografi Adsorpsi

Pemisahan kromatografi adsorpsi biasanya menggunakan fase diam silika gel dan alumina ,meskipun demikian sekitar 90% kromatografi ini memakai silika sebagai fase diamnya. Pada silika dan alumina terdapat gugus hidroksi yang akan berinteraksi dengan solut. Gugus silanol pada silika mempunyai reaktifitas yang berbeda ,karenanya solut dapat terikat secara kuat sehingga dapat menyebabkan puncak yang berekor atau tailing. Fase gerak yang digunakan untuk fase diam silika

atau alumina berupa pelarut nonpolar yang ditambah dengan pelarut polar yang ditambah dengan pelarut polar untuk meningkatkan kemampuan elusinya sehingga tidak timbul pengekoran puncak, misalnya n heksan ditambah metanol (7,15).

II.4.3.2.Kromatografi Partisi

Kromatografi jenis ini disebut juga dengan kromatografi fase terikat. Kebanyakan fase diam kromatografi ini adalah silika yang dimodifikasi secara kimawi atau fase terikat. Sejauh ini yang digunakan untuk memodifikasi silika adalah hidrokarbo-hidrokarbon non polar seperti fenil. Fase diam yang paling populer digunakan oktadesisilan dan kebanyakan pemisahannya adalah fase terbalik. Sebagai fase gerak adalah campuran metanol atau asetonitril dengan air (15).

II.4.3.3.Kromatografi penukar ion

KCKT penukaran ion menggunakan fase diam yang dapat menukar kation atau anion suatu fase gerak. Ada penukaran ion yang beredar dipasaran, meskipun demikian yang paling luas penggunaannya adalah polistiren resin.. Dalam hal ini, cincin benzen telah tersulfonasi untuk membentuk penukar ion kation asam sulfonat yang kuat.(B) merupakan struktur resin penukaran anion dengan matriks polistiren yang berikat silang satu sama lain yang sama, tetapi dengan gugus tetraalkil amonium (16).

II.4.3.4.Kromatografi pasangan ion

Kromatografi pasangan ion merupakan alternatif kromatografi penukaran ion. Beberapa masalah dapat dipecahkan dengan kedua metode ini akan tetapi penukaran ion tidak sebaik dengan kromatografi pasangan ion untuk pemisahan campuran-campuran yang bersifat asam,basa dan yang bersifat netral dibawah lingkungan tertentu. Keuntungan kromatografi pasangan ion untuk pemisahan senyawa senywa ionik adalah:

- a.sistem fase terbalik dapat digunakan untuk pemisahan
- b.campuran asam,basa ,netral dan juga molekul-molekul amfoterik dapat dipisahkan
- c.kromatografi pasangan ion juga merupakan pilihan yang baik jika nilai pka analit serupa dan
- d.Selektifitas dapat dipengaruhi oleh pemilihan pasangan ion yang bermuatan berlawanan.(16,18)

II.4.3.5.Kromatografi Eksklusi Ukuran

Kromatografi ini disebut juga dengan kromatografi permiasi gel dan dapat digunakan untuk memisahkan atau menganalisis senyawa dengan berat moolekul kurang dari 2000 dalton. Fase diamyang digunakan dapat berupasilika atau poliimer yang bersifat porus sehingga solut dapat melewati porus,atau berdifusi lewat fase diam. Molekul solut yang mempunyai BM yang jauh lebih besar ,akan terelusi terlebih dahulu

,kemudian molekul molekul dengan ukuran medium,dan terakhir adalah molekul yang jauh lebih kecil(7,15).

II.5 Derivatisasi pada KCKT

Derivatisasi melibatkan suatu reaksi kimia antara analit dengan suatu reagen untuk mengubah sifat fisika kimia analit. Tujuan utama penggunaan derivatisasi pada KCKT adalah untuk meningkatkan deteksi,mengubah struktur molekul merubah matriks sehingga diperoleh pemisahan yang lebih baik dan menstabilkan analit yang sensitif (7,19).

II.6 Densitometri

Densitometri adalah metode analisis instrumen berdasarkan radiasi elektromagnetik dengan analit berupa noda pada KLT. Instrument untuk scanning densitometry menggunakan pengukuran absorban atau fluoresensi dalam bentuk penerusan atau pantulan. Pertama kali diperkirakan pertengahan tahun 1960-an (7,17,21).

Instrument densitometri terdiri dari beberapa bagian. Sumber cahaya menggunakan lampu yang berbeda yang dapat menjangkau seluruh daerah sinar UV dan sinar tampak dari 200-800 nm. Untuk daerah sinar tampak digunakan lampu halogen tungsten sedangkan untuk daerah UV digunakan lampu deuterium. Pancaran xenon atau merkuri intensitas tinggi ditunjukkan untuk pengukuran fluoresensi. Untuk memilih panjang gelombang digunakan 15 monokromator atau filter(7,17,21).