

**SKRIPSI**

**VALIDASI METODE ANALISIS SENYAWA  
TIOPIPERIN DALAM PLASMA TIKUS  
MENGUNAKAN HPLC**

**ANALYTICAL METHOD VALIDATION OF  
THIOPIPERINE IN RAT PLASMA USING HPLC**

Disusun dan diajukan oleh

**AISYAH ANDIANI**

**N011 17 1007**



**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**VALIDASI METODE ANALISIS SENYAWA TIOPIPERIN DALAM  
PLASMA TIKUS MENGGUNAKAN HPLC**

**ANALYTICAL METHOD VALIDATION OF THIOPIPERINE IN RAT  
PLASMA USING HPLC**

**SKRIPSI**

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi  
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**AISYAH ANDIANI**

**N011 17 13007**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**VALIDASI METODE ANALISIS SENYAWA TIOPIPERIN DALAM  
PLASMA TIKUS MENGGUNAKAN HPLC**

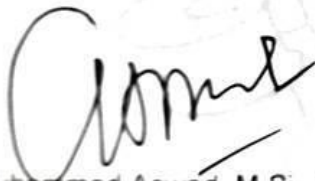
**AISYAH ANDIANI**

**N011 17 1007**

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt.

Andi Dian Permana, M.Si., Ph.D., Apt.

NIP. 1980101 200312 1 004

NIP. 19890205 201212 1 002

Pada Tanggal, 16 Juni 2021

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**  
**VALIDASI METODE ANALISIS SENYAWA TIOPIPERIN DALAM PLASMA**  
**TIKUS MENGGUNAKAN HPLC**  
**ANALYTICAL METHOD VALIDATION OF THIOPIPERINE IN RAT**  
**PLASMA USING HPLC**

Disusun dan diajukan oleh:

**AISYAH ANDIANI**  
**N011 17 1007**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi  
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin  
pada tanggal 16 Juni 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt.  
NIP. 1980101 200312 1 004

Pembimbing Pendamping,



Andi Dian Permana, M.Si., Ph.D., Apt.  
NIP. 19890205 201212 1 002



Plt. Ketua Program Studi S1 Farmasi,  
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

Fitri Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.  
NIP. 19820610 200801 1 012

## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini ;

Nama : Aisyah Andiani  
Nim : N011 17 1007  
Program Studi : Farmasi  
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

Validasi Metode Analisis Senyawa Tiopiperin dalam Plasma Tikus  
Menggunakan HPLC

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis benar benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 16 Juli 2021

Yang menyatakan,

  
Aisyah Andiani

## UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur penulis ucapkan bagi Allah *subhanahu wa ta'ala* yang telah memberikan rahmat, hidayah dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi dan memperoleh gelar sarjana di Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini banyak kekurangan dan masih jauh dari kesempurnaan, hal ini dikarenakan keterbatasan kemampuan yang penulis miliki. Dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dukungan dari berbagai pihak. Peneliti banyak menerima bimbingan, petunjuk dan bantuan serta dorongan dari berbagai pihak baik yang bersifat moral maupun material. Rasa syukur, ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya dan penghargaan setinggi - tingginya kepada:

1. Bapak Muhammad Aswad S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama dan Bapak Andi Dian Permana S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah berkenan meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan arahan serta bantuan bagi penulis dalam melaksanakan penelitian dan melatih penulis untuk berpikir kritis dan logis dalam menyelesaikan suatu permasalahan.
2. Bapak Nur Amir, S.Si, M.Si., Apt dan Bapak Ismail S.Si., M.Si., Apt. selaku penguji yang telah meluangkan waktunya dan memberikan

masukan dan saran terkait penelitian ini dan dalam proses menyelesaikan skripsi ini.

3. Bapak Abdul Rahim, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. selaku pembimbing akademik penulis yang telah berkenan dalam membimbing penulis dan memberikan masukan selama menempuh masa studi S1.
4. Seluruh Bapak/ Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmunya dan membimbing penulis selama masa studi S1 juga seluruh staf akademik dan segala fasilitas dan pelayanan yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh studi.
5. Orang tua penulis yaitu Bapak Syatir Suaib dan Ibu A. Chairiani, saudara penulis yaitu Chyntia Destiani dan Muhammad Ishak serta keluarga penulis yang selalu memberikan dukungan baik moril maupun materil, motivasi, kasih sayang, ridhonya serta doa yang tulus yang selalu mengiringi langkah penulis.
6. Shafa Haura Suharto sebagai rekan penelitian penulis yang senantiasa membantu dan membersamai penulis dalam menyelesaikan proses penelitian dan penulisan skripsi.
7. Sahabat-sahabat penulis Muhammad Isbar Putera, Nur Novita Putri, Nabil Hamdini, Taufiqurrahman, Nurul Wahyuningsi, Mey Nindy, Andi Nur Aulia El Firman, Asma Aris, Andi Dalauleng, Rusmainnah, Adelia Dwi Dayanti, Aprilia Holi Ta'bi, Sri Mailani, Elma Pebryna Putri, Geoni Malesso

Todingan untuk setiap dukungan, doa, dan semangat yang diberikan kepada penulis.

8. Rekan rekan Korps. Asisten Kimia Farmasi yang senantiasa membantu dan memberikan dukungan kepada penulis.
9. Teman-teman angkatan "CLOSTRIDIUM" atas kebersamaan yang kalian berikan selama penulis berada di bangku perkuliahan, melewati suka dan duka dalam perkuliahan dan berjuang untuk meraih mimpi masing masing.
10. Saudari – saudari ku dari "FUM" atas kebersamaan dalam mengerjakan amanah dakwah bersama penulis serta memberikan nasehat agama kepada penulis.

Penulis mengharapkan segala bentuk saran serta masukan bahkan kritik yang membangun dari berbagai pihak. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan semua pihak khususnya dalam bidang analisis farmasi.

Makassar, 16 Juni 2021



Aisyah Andiani



## ABSTRAK

**AISYAH ANDIANI.** Validasi Metode Analisis Senyawa Tiopiperin dalam Plasma Tikus Menggunakan HPLC (Dibimbing oleh Muhammad Aswad dan Andi Dian Permana).

Tiopiperin merupakan senyawa derivat piperin yang mengalami modifikasi struktur dan memiliki potensi sebagai kandidat obat karena memiliki aktivitas sebagai antikanker dan antiinflamasi. Sebelum dilakukan uji farmakokinetik, dibutuhkan suatu metode analisis yang tervalidasi untuk menganalisis senyawa tiopiperin dalam plasma darah menggunakan HPLC. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi optimal, metode ekstraksi serta parameter validasi dari senyawa tiopiperin dalam plasma darah. Adapun pengujian yang dilakukan meliputi Penetapan Metode Ekstraksi, Uji Linearitas, Batas Deteksi (LOD), Batas Kuantifikasi (LOQ), Selektifitas, Akurasi dan Presisi. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan kolom Xselect CSH™ C18 (Waters, 3.0 x 150 mm, 3.5 µm) dengan fase gerak Asetonitril : Air (60:40 v/v) dengan laju alir 0,5 mL/menit, Detektor PDA pada panjang gelombang 340 nm dan volume penyuntikan 20 µL. Hasil yang diperoleh pada penetapan metode ekstraksi yaitu pelarut yang memiliki hasil optimum adalah metanol dengan perbandingan volume plasma (1:3). Pada uji linearitas didapatkan persamaan kurva kalibrasi  $y = 128924x + 4413,5$  dengan nilai ( $r^2$ ) = 0,9991 dan  $V_{xo} = 2,28\%$  yang telah memenuhi syarat  $\leq 2\%$ . Nilai LOD dan LOQ masing – masing 0,261 dan 0,791 µg/ml. Peak sampel pada plasma dan sampel dibandingkan dengan peak blanko memiliki selektifitas yang baik. Nilai %RE dari konsentrasi rendah, sedang dan tinggi pada *intraday* dan *interday* masing masing sebesar 9,64; 7,06; 7,74 dan 6,20; 7,34; 9,07. Pada semua pengujian didapatkan nilai %RE yang memenuhi persyaratan yaitu  $\pm 15\%$ . Dapat disimpulkan bahwa metode yang telah dikembangkan di atas telah valid berdasarkan petunjuk validasi metode analisis resmi berdasarkan parameter kesesuaian sistem, linearitas, presisi, dan akurasi.

Kata Kunci : HPLC, Plasma Tikus, Tiopiperin, Validasi

## ABSTRACT

**AISYAH ANDIANI.** ANALYTICAL METHOD VALIDATION OF THIOPIPERIN IN RAT PLASMA USING HPLC (Supervised by Muhammad Aswad and Andi Dian Permana).

Thiopiperine is a derivative of piperine that has been chemically modified and potentially to be developed as a new drug due to its activity as anticancer and anti-inflammation. Before pharmacokinetics study a validated analytical method is required to analyze thiopiperine in plasma using HPLC. The purpose of this study was to determine the optimal column condition, extraction method, and parameter validation of thiopiperine in plasma. The test carried out include determination of extraction method, linearity test, Limit of Detection (LOD), Limit Of Quantification (LOQ), selectivity, accuracy and precision. Chromatography analysis was achieved using Xselect CSH™ C18 column (Waters, 3.0 x 150 mm, 3.5  $\mu$ m) with a mobile phase of Acetonitrile: Water (60:40 v / v) with a flow rate of 0.5 mL / minute, PDA Detector at a wavelength of 340 nm and an injection volume of 20  $\mu$ L. The results obtained of the extraction method and extraction, the best solvent to extracted sample is methanol with ratio (1:3). In linearity test a calibration curve obtained  $y=128924x + 4413.5$ , with  $(r^2)=0.9991$  and  $V_{xo} = 2.28\%$  with specification  $\leq 5\%$ . LOD result 0.261 and LOQ 0.791  $\mu$ g/ml peak sample in plasma compared with blanko plasma have a good selectivity. %RE results from low, medium and high quality control on intraday and interday for each are 9.64; 7.06; 7.74 and 6.20; 7.34; 9.07. In conclusion, the developed method was validated according to official guideline of analytical validation with respect to system suitability, linearity, precision and accuracy.

Keywords: HPLC, Rat Plasma, Stability, Thiopiperine

## DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	4
I.3 Tujuan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Tiopiperin	5
II.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	6
II.2 Plasma	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.3 Bioanalisis	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.4 Validasi Metode Analisis	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

BAB III METODE KERJA	8
III.1 Waktu dan lokasi penelitian	8
III.2 Alat dan bahan	8
III.3 Metode penelitian	8
III.3.1 Penyiapan Plasma Tikus	8
III.3.1 Pembuatan larutan induk, Kurva kalibrasi, dan Quality Control	Err
<b>or! Bookmark not defined.</b>	
III.3.2 Uji kesesuaian sistem	Err
<b>or! Bookmark not defined.</b>	
III.3.3 Penetapan metode Ekstraksi	Err
<b>or! Bookmark not defined.</b>	
III.3.4 Validasi Metode Analisis	Err
<b>or! Bookmark not defined.</b>	
III.4 Pengumpulan dan Analisis Data	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	9
IV.1 Uji kesesuaian sistem	9
IV.2 Penetapan Metode Ekstraksi	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

IV.3 Validasi Metode Analisis	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
IV.3.1 Uji Linearitas	<b>Err</b>
<b>or! Bookmark not defined.</b>	
IV.3.2 Pengukuran LOD dan LOQ	<b>Err</b>
<b>or! Bookmark not defined.</b> IV.3.3 Uji Selektivitas	<b>Err</b>
<b>or! Bookmark not defined.</b>	
IV.3.3 Akurasi dan Presisi	<b>Err</b>
<b>or! Bookmark not defined.</b>	
BAB V PENUTUP	
<b>Error! Bookmark not defined.</b>	
V.1 Kesimpulan	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
V.2 Saran	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	
<b>Error! Bookmark not defined.</b>	

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbedaan Antara Serum dengan Plasma	13
2. Parameter Uji Kesesuaian Sistem	29

3. Hasil Pengujian Metode Ekstraksi	31
4. Hasil Pengujian Kurva Kalibrasi	32
5. Data Pengukuran Akurasi dan Presisi <i>Intraday</i>	37
6. Data Pengukuran Akurasi dan Presisi <i>Interday</i>	38
7. Data Pengukuran LOD dan LOQ	52
1. Data Pengukuran Hasil Pengujian Akurasi dan Presisi	53
2. Data Distribusi Kolmogrov Smirnov pada Uji Metode Ekstraksi	55
3. Data Statistik Homogenitas Uji Metode Ekstraksi	55
4. Data Statistik Uji Metode Ekstraksi dengan One Way Anova	56
5. Data Statistik Uji Metode Ekstraksi dengan Tukey HSD	56

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Stuktur Senyawa Tiopiperin	3
2. Ilustrasi Instrumen HPLC	7

3. Jenis – Jenis Kolom	10
4. Metode Pengendapan Protein	15
5. Skema Sederhana Metode Ekstraksi Cair-cair	16
6. Skema Ekstraksi Fase Padat	17
7. Skema Sederhana Metode Ekstraksi Cair Padat	18
8. Kurva Kalibrasi Tiopiperin	32
9. Blanko, Tiopiperin, Tiopiperin dalam Plasma	35
10. Sampel Tiopiperin	46
11. Larutan Kerja Tiopiperin	46
12. Tiopiperin dalam Plasma	46
13. Tiopiperin dalam Plasma setelah disentrifugasi	46
14. Larutan Quality Control	46
15. Vortex	46
16. Alat Sentrifugasi	47
17. Sonikator	47
18. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>	48

## DAFTAR SINGKATAN

C = Karbon

%RE = %Relative Error

HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*



HETP = *Height Equivalent to a Theoretical Plate*  
mm = millimeter  
nm = nanometer  
O = Oksigen  
PDA = *Photo Diode Array*  
RSD = *Relative Standar Deviation*  
SPE = *Solid Phase Extraction*  
UV = Ultra Violet  
Vis = *Visible*

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema kerja	43
2. Dokumentasi Penelitian	47

3. Alat HPLC	49
4. Perhitungan	50
5. Analisis Statistik SPSS 20	53
6. Data Kromatogram HPLC	58
7. Rekomendasi Persetujuan Etik	62

# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

Piperin merupakan senyawa alkaloid terbesar yang terkandung dalam lada hitam (*Piper nigrum* L.), famili piperaceae. Senyawa piperin memiliki peran yang besar terhadap aktivitas farmakologi dari lada hitam (Aziz *et al.*, 2015). Sampai saat ini, beberapa studi telah membuktikan bahwa piperin memiliki aktivitas farmakologi seperti anti mikroba (Umadevi *et al.*, 2013) , anti inflamasi (Sabina *et al.*, 2010), anti mutagenik (Wongpa *et al.*, 2007), immunodulator, anti tumor (Bezerra *et al.*, 2007), *anti ulcer* (Bai and Xu, 2000) anti kanker (Do *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014) dll. Namun, piperin memiliki kelarutan dalam air yang rendah dan berdampak pada bioavailabilitasnya yang rendah pula. Sehingga, untuk meningkatkan bioavailabilitas dari piperin ini, dikembangkan turunan – turunan senyawa piperin yang memiliki sifat dan bioavailabilitas yang lebih baik (Gorgani *et al.*, 2017). Salah satu turunan piperin yang berhasil disintesis menggunakan pereaksi lawesson adalah senyawa tiopiperin. Tiopiperin merupakan senyawa derivat piperin yang mengalami modifikasi struktur yaitu penggantian gugus karbonil (C=O) menjadi gugus tiokarbonil (C=S). Senyawa ini memiliki aktivitas sebagai anti-inflamasi setelah dilakukan uji prediksi *in-silico* (Sukmana,2018). Dari penelitian yang dilakukan oleh

(Aswad *et al*, 2019) menunjukkan tiopiperin berpotensi menghambat faktor transkripsi pada sel kanker payudara. Sehingga, dari data tersebut tiopiperin menjadi senyawa yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi obat. Dalam tahapan awal pengembangan kandidat obat, maka perlu dilakukan uji *in vitro* dan *in vivo*. Namun, sebelum pengujian *in vivo* perlu dikembangkan suatu metode bioanalisis yang tervalidasi untuk analisis senyawa tiopiperin pada sampel biologis.

Analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa (obat) atau metabolitnya dalam cairan biologis (terutama darah, plasma, serum, urin atau ekstrak jaringan) biasa disebut dengan bioanalisis. Dalam penemuan dan pengembangan obat baru, data yang didapatkan dari bioanalisis menjadi informasi yang sangat penting dalam uji stabilitas maupun farmakokinetik dari kandidat obat (Evans, 2004). Data stabilitas, farmakokinetik dan farmakologi dari senyawa tiopiperin yang belum dilaporkan menjadikan pengembangan metode bioanalisis dari senyawa tiopiperin menggunakan darah penting untuk dilakukan. Sehingga, dari data metode analisis, akan berguna untuk digunakan sebagai acuan dalam analisis stabilitas senyawa tiopiperin ini.

Pengembangan metode analisis merupakan prosedur analisis baru menggunakan instrumen dan metode yang disesuaikan berdasarkan tujuan dari analisis. Sehingga, menjadi hal yang penting untuk menggunakan metode analisis yang telah tervalidasi agar peneliti mendapatkan hasil yang dapat dipercaya dan dapat diinterpretasikan (Shah *et al.*, 1992). Sampai saat ini,

belum terdapat penelitian yang dilaporkan terkait metode analisis yang tervalidasi untuk senyawa tiopiperin dalam plasma darah. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengembangan dan validasi metode analisis senyawa tiopiperin dalam plasma yang dapat digunakan sebagai acuan dalam analisis stabilitas maupun uji farmakokinetik. Parameter yang dievaluasi dalam pengembangan metode analisis ini adalah akurasi, presisi, spesifitas, linearitas, *limit of detection* (LOD), *limit of quantitation* (LOQ) (European Medicines Agency, 1995)

Dalam melakukan metode bioanalisis obat dalam plasma digunakan instrumen HPLC. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah metode kromatografi cair yang menggunakan fase gerak dan fase diam untuk melakukan pemisahan suatu jenis senyawa berdasarkan kepolarannya. HPLC menggunakan bantuan pompa, dimana fase gerak akan dialirkan melalui kolom dan senyawa akan terpisah berdasarkan afinitasnya terhadap fase gerak (Stevenson, 1991). HPLC memiliki beberapa keunggulan yaitu dapat menangani senyawa – senyawa yang tidak stabil pada suhu panas; memisahkan senyawa dengan resolusi yang baik; waktu pemisahan yang singkat; dapat digunakan untuk analisis kuantitatif karena memiliki presisi yang tinggi (Khopkar,2003).

Dari uraian tersebut diatas maka dilakukanlah penelitian mengenai validasi metode analisis senyawa Tiopiperine dalam sampel plasma darah tikus dengan metode HPLC.

## **I.2 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana kondisi optimal dari analisis senyawa tiopiperin menggunakan HPLC?
2. Bagaimana metode ekstraksi untuk analisis senyawa tiopiperin dalam plasma menggunakan HPLC?
3. Bagaimana parameter validasi dari analisis senyawa tiopiperin menggunakan HPLC?

## **I.3 Tujuan Penelitian**

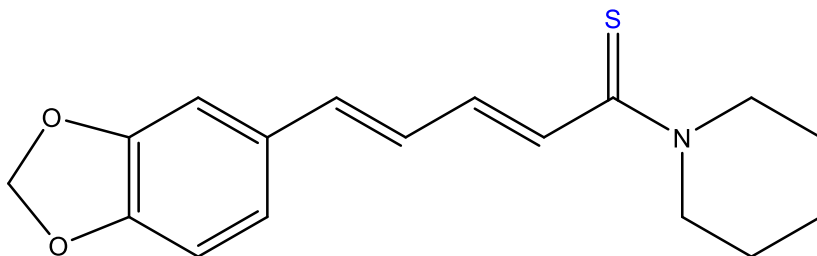
1. Mendapatkan kondisi optimal dari analisis senyawa tiopiperin menggunakan HPLC.
2. Mendapatkan metode ekstraksi untuk analisis senyawa tiopiperin dalam plasma menggunakan HPLC.
3. Menentukan parameter validasi analisis dari senyawa tiopiperin dalam plasma darah tikus seperti akurasi, presisi, spesifitas, linearitas, *limit of detection* (LOD), *limit of quantitation* (LOQ) dengan metode HPLC.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Tiopiperin

Tiopiperin merupakan senyawa derivat piperin yang disintesis dari senyawa piperin berdasarkan reaksi tionasi oleh pereaksi lawesson dan pelarut tetrahidrofuran. Tiopiperin mengalami modifikasi struktur dari senyawa piperin berupa penggantian gugus karbonil (C=O) menjadi gugus tiokarbonil (C=S) Tiopiperin memiliki struktur  $C_{17}H_{19}NO_2S$  memiliki pemerian berupa serbuk berwarna oranye dan memiliki bau khas sulfur (Sukmana, 2018).



**Gambar 1. Senyawa Tiopiperin (Aswad *et al*, 2020)**

Senyawa ini memiliki aktivitas sebagai anti inflamasi setelah dilakukan uji prediksi in-silico, dimana dilakukan pengujian energi ikatan antara enzim siklooksigenase-2 sebagai agen inflamasi terhadap senyawa tiopiperin dan didapatkan nilai energi ikatan yang lebih besar dari senyawa tiopiperin dibandingkan asam arakidonat dan senyawa piperin. Tiopiperin juga memiliki potensi sebagai anti kanker dengan mekanisme sebagai inhibitor dalam proses

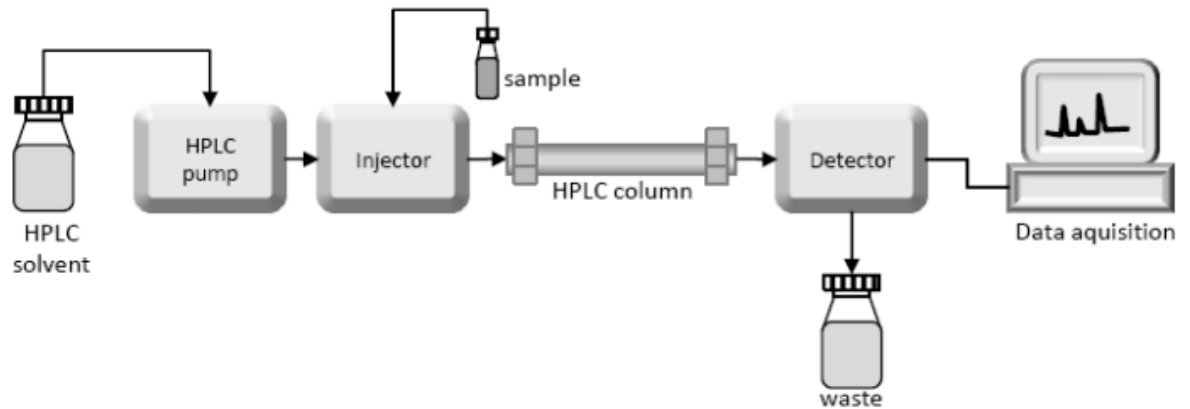
aktivasi dari faktor transkripsi NF-kB pada sel kanker payudara (Sukmana, 2018; Aswad *et al*, 2020).

## **II.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) pertama kali diperkenalkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. HPLC merupakan metode pemisahan senyawa yang digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel. Adapun keunggulan dari HPLC, yaitu : ketepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, cocok untuk memisahkan senyawa – senyawa *nonvolatile* yang tidak tahan pada pemanasan, cepat, pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi, pengukuran sampel dengan kadar yang rendah, penggunaan kolom yang dapat berulang, cocok untuk sampel yang memiliki ukuran molekul yang besar, menghindari terjadinya dekomposisi sampel yang dapat terjadi selama analisis dan memiliki resolusi yang baik (Johnson & Steveson., 1991; Gritter., 1991; Susanti & Dachriyanus, 2011).

Instrumentasi HPLC terdiri atas delapan komponen pokok yaitu: wadah fase gerak, alat untuk memasukkan sampel, kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, tabung penghubung, dan suatu komputer atau integrator atau perekam (Gandjar & Rohman., 2007).





**Gambar 2. Ilustrasi Instrumen HPLC (Dean M, 2013)**

a. Wadah Fase Gerak (Reservoir) dan Fase Gerak

Wadah fase gerak digunakan untuk menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Wadah ini harus bersih dan bersifat *inert*. Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang mempengaruhi daya elusi dan resolusi dari proses analisis sampel. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas dari fase gerak dan fase diam serta sifat dari komponen sampel (Settle, F., 1997).

Fase gerak sebelum digunakan harus disaring terlebih dahulu untuk menghindari partikel – partikel yang dapat mengganggu proses elusi, selain itu adanya gas dalam fase gerak juga perlu untuk dihilangkan sebab gas akan berkumpul dengan komponen lain pada pompa dan detektor sehingga mengacaukan analisis sampel (Meyer RF., 2004).