

**METODE SPEKTROFOTOMETRI UV DENGAN PENDEKATAN
KEMOMETRIK UNTUK ANALISIS KURKUMIN DAN PIPERIN
SECARA SIMULTAN**

**UV SPECTROPHOTOMETRY METHOD USING A
CHEMOMETRIC APPROACH FOR SIMULTANEOUS
ANALYSIS OF CURCUMIN AND PIPERINE**

DESY AYU LESTARI

N012211021



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**METODE SPEKTROFOTOMETRI UV DENGAN
PENDEKATAN KEMOMETRIK UNTUK ANALISIS
KURKUMIN DAN PIPERIN SECARA SIMULTAN**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

DESY AYU LESTARI

N012211021

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

LEMBAR PENGESAHAN

**METODE SPEKTROFOTOMETRI UV DENGAN PENDEKATAN
KEMOMETRIK UNTUK ANALISIS KURKUMIN DAN PIPERIN
SECARA SIMULTAN**

Disusun dan diajukan oleh

DESY AYU LESTARI

NIM N012211021

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Magister Program Studi Magister Farmasi Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin

Pada tanggal 26 Februari 2024

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama



Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt
NIP. 19800101 20031 2 1004

Pembimbing Pendamping



Sri Astuti Thamrin, S.Si., M.Stud., Ph.D
NIP. 19611111 198703 2 001

Ketua Program Studi Magister
Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi



Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt
NIP. 19800101 20031 2 1004



Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. rer-nat. Marianti A. Manggau, Apt
NIP. 19670319 199203 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Desy Ayu Lestari

Nomor Mahasiswa : N012211021

Program Studi : Farmasi

Jenjang : S2

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Februari 2024



Desy Ayu Lestari

PRAKATA

Alhamdulillah Rabbil'alamiin, puji syukur kepada Allah SWT. karena atas rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagai syarat memperoleh gelar magister di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Tak lupa pula shalawat dan taslim penulis sampaikan kepada Rasulullah Muhammad SAW yang menjadi pemberi cahaya dan ilmu yang bermanfaat.

Penulis menyadari bahwa dalam menyusun tesis ini begitu banyak kendala yang penulis alami. Namun, karena adanya bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, akhirnya penulis mampu merampungkan tesis ini. Banyak kendala yang dihadapi selama penelitian dan penyusunan tesis ini, namun dapat diselesaikan dengan baik berkat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. apt. Muhammad Aswad, M.Si., Ph. D dan Sri Astuti Thamrin, S.Si., M.Stud, Ph.D selaku Komisi Penasihat yang telah banyak memberi masukan, arahan dan bimbingan kepada penulis dalam penyusunan tesis ini.
2. Prof. Dr. apt. Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D, Dr. apt. Risfah Yulianty, M.Si dan apt. Abdul Rahim, M.Si., Ph.D selaku tim Komisi Penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang sangat membantu dalam penyusunan tesis ini.

3. Dekan, Wakil Dekan, Bapak-Ibu dosen, khususnya dosen Penasihat Akademik (PA) apt. Muhammad Aswad, M.Si., Ph. D, serta seluruh staf karyawan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah mendidik, memberikan sarana dan memotivasi penulis dari awal memasuki bangku kuliah hingga saat ini.
4. Orang tua penulis, Hj. Siti Norsyam dan Bapak (Alm) H.Djumadil untuk semua doa, serta kasih sayang tulus yang telah diberikan yang tidak akan mampu penulis balas. Untuk kakak penulis Muhammad Yasir dan Kak raodha Sari selaku istri yang telah memberikan pendanaan penuh kepada penulis selama proses pendidikan ini sehingga penulis bisa menyelesaikan pendidikan magister ini serta ke lima kakak penulis lainnya Ida Rosanti, Nurhwa Kumala Sari, Tarlia, Akhmad dan Abdul Gafur yang turut juga memberikan masukan arahan dan doa kepada penulis
5. Rekan-rekan magister pascasarjana angkatan 2021 yang telah banyak membantu, khususnya Nurul Hidayah Hamzah, Ardiyah Nurul Fitri Marzaman, Nana Novriana, Anwar Sam, Tri Puspita Roska, kanda Fauziyah Sasmita serta adik-adik semoga kesuksesan menyertai kita semua.
6. Semua pihak yang terlibat, yang tidak sempat tersebut namanya.
Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Namun, di dunia tak ada satupun yang sempurna karena kesempurnaan hanya milik-Nya. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat

diharapkan untuk menciptakan karya yang lebih bermutu. Akhir kata, semoga karya kecil ini dapat memberi manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya bidang farmasi, *Aamiin*.

Makassar, Februari 2024

Desy Ayu Lestari

ABSTRAK

DESY AYU LESTARI, Metode Spektrofotometri UV dengan Pendekatan Kemometrik Untuk Analisis Kurkumin dan Piperin Secara Simultan (dibimbing oleh Muhammad Aswad dan Sri Astuti Thamrin)

Piperin diketahui dapat meningkatkan bioavailabilitas kurkumin, sehingga sering dikombinasikan dalam sediaan farmasi. Pengembangan metode Spektrofotometri UV yang dikombinasikan dengan pendekatan kemometrika seperti *Partial Least Square* (PLS) telah diterapkan karena metode tersebut lebih sederhana dan ekonomis untuk analisis senyawa multikomponen tanpa melalui tahap pemisahan. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode Spektrofotometri UV dengan pendekatan kemometrika dalam menganalisis kurkumin dan piperin secara simultan dalam sediaan farmasi. Penentuan model dilakukan dengan membuat rancangan pencampuran sebanyak 144 larutan campuran kurkumin dan piperin dalam kloroform tiap interval 2 nm pada rentang panjang gelombang 200-450 nm, kemudian dianalisis menggunakan PLS. Model pencampuran ini didapatkan hasil panjang gelombang yang terpilih yaitu pada panjang gelombang 328, 334, 382, 392, 424, 442 nm, dengan nilai koefisien determinasi (R^2) yang diperoleh untuk kurkumin 0,985 dan piperin 0,980. Sedangkan untuk nilai *Mean Absolute Error* (MAE) untuk kurkumin 0,164 dan piperin 0,228. Parameter validasi dilakukan berdasarkan pedoman ICH yaitu spesifitas, linearitas, presisi, akurasi, *Limit of Detection* (LOD), and *Limit of Quantitation* (LOQ). Hasil yang didapatkan untuk pengujian linearitas baik untuk kurkumin dan piperin pada rentang konsentrasi 1-8 ppm diperoleh nilai R sebesar 0,997 dan 0,995. Untuk nilai LOD dan LOQ diperoleh 0,089 $\mu\text{L/mL}$ dan 0,271 $\mu\text{L/mL}$ untuk kurkumin sedangkan piperin diperoleh 0,030 $\mu\text{L/mL}$ dan 0,090 $\mu\text{L/mL}$. Untuk pengujian presisi dan akurasi diperoleh hasil pada rentang 90 – 120% dengan nilai RSD 0 – 4% untuk kurkumin dan piperin. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa metode berbasis spektrofotometri UV dengan pendekatan kemometrik dapat diterapkan dalam analisis kurkumin dan piperin dalam sediaan farmasi.

Kata Kunci: Spektrofotometri UV, Kemometrik, *Partial Least Square* (PLS), dan Analisis Validasi.

ABSTRACT

DESY AYU LESTARI, UV Spectrophotometric Method with Chemometric Approach for Simultaneous Analysis of Curcumin and Piperine (dibimbing oleh Muhammad Aswad dan Sri Astuti Thamrin)

Piperine is frequently used with curcumin in medicined preparations since it is believed to enhance curcumin bioavailability. The development of UV Spectrophotometric methods combined with chemometric approaches such as Partial Least Square (PLS) has been applied because the method is simpler and more economical for the analysis of multicomponent compounds without going through the separation stage. This study aims to develop a UV Spectrophotometric method with a chemometric approach in analyzing curcumin and piperine simultaneously in pharmaceutical preparations. The determination of the model was carried out by making a mixing design of 144 mixed solutions of curcumin and piperine in chloroform at every 2 nm interval in the wavelength range of 200-450 nm, then analyzed using PLS. This mixing model obtained the results of the selected wavelengths, namely at wavelengths of 328, 334, 382, 392, 424, 442 nm, with the coefficient of determination (R^2) obtained for curcumin 0.985 and piperine 0.980. As for the Mean Absolute Error (MAE) value for curcumin 0.164 and piperine 0.228. Validation parameters were carried out based on ICH guidelines, namely specificity, linearity, precision, accuracy, Limit of Detection (LOD), and Limit of Quantitation (LOQ). The results obtained for linerity testing for both curcumin and piperine in the concentration range of 1-8 ppm obtained R values of 0.997 and 0.995. For LOD and LOQ values, 0.089 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 0.271 $\mu\text{L}/\text{mL}$ were obtained for curcumin while piperine obtained 0.030 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 0.090 $\mu\text{L}/\text{mL}$. For precision and accuracy testing, results were obtained in the range of 90-120% with RSD values of 0-4% for curcumin and piperine. Thus, it can be concluded that the UV spectrophotometry-based method with a chemometric approach can be applied in the analysis of curcumin and piperine in pharmaceutical preparations.

Keywords: Spectrophotometric UV, Chemometric, *Partial Least Squares* (PLS),) and Validation Analysis.

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Piperin	6
B. Kurkumin	7
C. Spektrofotometri	9
D. Kemometrik	30
E. Validasi	34
F. Hipotesis.....	42
BAB III METODE PENELITIAN	43
A. Waktu dan Tempat Penelitian	43
B. Alat dan Bahan.....	43
C. Cara Kerja	43
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	48
A. Pemilihan Pelarut	48
B. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum	49
C. Pembuatan Kurva Baku	49
D. Pengembangan metode spektrofotometri dengan bantuan kemometrik dan PLS.....	50
E. Evaluasi Model PLS	53
F. Uji asumsi regresi linear	54
G. Validasi Metode analisis.....	56
BAB IV PENUTUP	64
A. Kesimpulan.....	64
B. Saran	64
DAFTAR PUSTAKA	65

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Spektrum Cahaya Tampak dan Warna-Warna Komplementer.....	14
Tabel 2. Perbedaan antara transisi $n \rightarrow \pi^*$ dan transisi $\pi \rightarrow \pi^*$	21
Tabel 3. Data yang dibutuhkan untuk uji validasi (USP 39., 2016).....	35
Tabel 4. Model Regresi PLS untuk Kurkumin (y_1) dan Piperin (y_2)	52
Tabel 5. Nilai R^2 dan Nilai MAE dari model PLS.....	54
Tabel 6. Hasil perhitungan presisi regresi kalibrasi multivariat secara PLS.....	59
Tabel 7. Hasil perhitungan presisi regresi kalibrasi multivariat secara PLS.....	59
Tabel 8. Hasil perhitungan presisi regresi kalibrasi multivariat secara PLS.....	60
Tabel 9. Rentang persen perolehan kembali dan rentang nilai RSD maksimum yang diperbolehkan oleh AOAC Guidelines.....	60
Tabel 10. Hasil perhitungan regresi kalibrasi multivariat secara PLS.....	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur Piperin.....	6
Gambar 2. Struktur Kurkumin.....	8
Gambar 3. Diagram Skematis Spektrofotometri UV-Vis.....	14
Gambar 4. Spektrum absorpsi senyawa X dan Y (tidak tumpang tindih pada dua Panjang gelombang yang digunakan)	22
Gambar 5. Spektrum absorpsi senyawa X dan Y (Spektrum X tumpang tindih pada spektrum Y)	23
Gambar 6. Spektrum absorpsi senyawa X dan Y (Spektrum X saling tumpang tindih pada spektrum Y).....	23
Gambar 7. Panjang gelombang maksimum dari kurkumin (a) dan piperin (b) serapan campuran kurkumin dan piperin (c).....	48
Gambar 8. Overlay dari kurva baku Kurkumin (a)	50
Gambar 9. Overlay dari kurva baku Piperin (b).....	50
Gambar 10. Plot data normalitas kurkumin	55
Gambar 11. Plot data homoskedastisitas	55
Gambar 12. Plot data normalitas piperin	56
Gambar 13. Plot data homoskedastisitas piperin	56

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja	70
Lampiran 2. Seri Konsentrasi serta Hasil Perhitungan Nilai Prediksi.....	79
Lampiran 3. Dokumentasi Kegiatan	88
Lampiran 4. Perhitungan.....	91

BAB I

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Kurkumin merupakan fitokimia kristal oranye-kuning yang diisolasi dari *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*) bersama dengan dua senyawa demetoksi lainnya yaitu, desmethoxycurcumin dan bisdemethoxycurcumin. Kurkumin menunjukkan berbagai aktivitas farmakologi salah satunya anti kanker. Selain itu kurkumin juga memiliki aktivitas anti inflamasi, penyembuhan luka, antimikroba, antivirus, anti jamur, imunomodulator, dan antioksidan. Kurkumin molekul yang sangat baik diantara banyak senyawa bahan alam untuk pengobatan dan pencegahan berbagai macam penyakit. Senyawa ini terbukti aman secara umum diakui oleh *United Stated Food and Drug Administration* (USFDA), bahkan digunakan pada dosis yang sangat tinggi. Namun karena mempunyai bioavailabilitas yang sangat rendah, kurkumin belum dapat disetujui sebagai agen terapeutik (Srinivas., 2021).

Banyak usaha telah dilakukan untuk meningkatkan bioavailabilitas dari kurkumin, diantaranya melalui peningkatan kelarutan, stabilitas, dan permeabilitas dengan menggunakan beberapa teknik. Salah satu senyawa bahan alam yang diperoleh dari tanaman yang dapat meningkatkan bioavailabilitas kurkumin adalah piperin (Jantarat., 2012).

Piperin atau 1-*piperoylpiperidine* merupakan senyawa golongan alkaloid yang bersifat basa lemah yang diisolasi dari tanaman lada (*Piperaceae*). Beberapa hasil penelitian¹ menunjukkan bahwa piperin memiliki aktivitas sebagai inhibitor MAO, antiinflamasi, anti kanker, antidiabetes, insektisida, antikonvulsan, imunomodulator, antidepresan, antioksidan, genotoksik, inhibisi apoptosis, antihipertensi, antitiroid, antitumor dan antiasma (Singh dkk., 2009).

Penetapan kadar zat berkhasiat dalam berbagai sediaan obat merupakan bagian yang penting di instansi yang melakukan penetapan kadar obat seperti Badan Pengawas Obat dan Makanan dan industri obat, oleh karena itu diperlukan metode analisis dengan alat dan biaya operasional yang relatif lebih murah dan lebih mudah dalam pelaksanaannya, namun dapat memberikan hasil dengan akurasi dan presisi yang baik (Lotfy dan Sarah., 2016). Spektrofotometri merupakan metode yang sederhana, cepat dan relatif lebih murah bila dibandingkan dengan metode lainnya (Khoshayand *et al.*, 2010). Analisis kuantitatif secara simultan untuk sediaan farmasi yang mengandung banyak zat aktif sulit dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri yang klasik, dikarenakan adanya spektrum yang saling tumpang tindih (Hajian dan Afshari., 2012).

Penggunaan spektroskopi UV untuk analisis campuran kompleks dimungkinkan dengan bantuan beberapa teknik kemometrik. Kemometrik dalam pengertian yang paling umum adalah seni mengolah data dengan

berbagai teknik numerik untuk mendapatkan informasi yang berguna (Arief., 2017). Metode spektrofotometri UV berbantuan kemometrik seperti *principle component regression* (PCR), *partial least square* (PLS) dan *Genetic Algorithm PLS* (GAPLS) diterapkan. Metode PCR dan PLS adalah model kemometrik yang paling banyak diterapkan untuk estimasi simultan formulasi multi- komponen dan terutama untuk obat dengan tumpang tindih yang luas dalam spektrum penyerapannya (Ahmed., 2021).

Metode spektrofotometri kemometrik dapat diaplikasikan pada campuran sediaan obat yang terdiri dari dua atau tiga komponen obat atau lebih dan mempunyai panjang gelombang berdekatan ketika dilakukan tumpang tindih spektrumnya. Selama dekade terakhir, model kemometrik dikembangkan dan diimplementasikan untuk membantu analisis kuantitatif spektrofotometri senyawa farmasi, sehingga memungkinkan analisis untuk memanipulasi data besar, menafsirkan hasil dan menganalisis data kimia melalui informasi relevan maksimum yang ada (Muchlisyam., 2017).

Penelitian yang dilakukan Tadele et al (2018) menyatakan bahwa metode spektrofotometri UV yang dikembangkan dalam kombinasi dengan PCR dan PLS dapat digunakan untuk penentuan simultan ciprofloxacin dan doxycycline hyalite dalam campuran sintesis atau sediaan farmasi. Pada penelitian yang dilakukan oleh Bassam (2016), empagliflozin dan metformin dianalisis menggunakan metode kemometrik PLS. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa metode spektrofotometri yang dikombinasikan dengan analisis multivariat mampu menentukan

kadar beberapa senyawa dengan spektrum serapan yang tumpang tindih.

Kurkumin dan piperin sering dikombinasikan dalam suatu sediaan, salah satunya adalah tablet Curcuma force sebagai suplemen penambah nafsu makan. Piperine dilaporkan dapat meningkatkan profil farmakokinetik dan farmakodinamik ibuprofen asam ursolat dan kurkumin. Piperine dilaporkan meningkatkan ketersediaan hayati kurkumin oral: 154% dan 2000% peningkatan konsentrasi kurkumin dalam plasma diamati pada tikus dan manusia. Selain itu, piperin mengurangi laju metabolisme kurkumin di hati dengan menghambat hidroksilasi hidrokarbon aril, demetilasi etilmorfin-N, 7-etoksikumarin-Odeetilasi, dan glukuronidasi dan glukuronidasi 3-hidroksi-benzo (a) piren, yang kemudian mengurangi metabolisme kurkumin jalur pertama. Oleh karena itu, pemberian piperin dan kurkumin dapat meningkatkan ketersediaan hayati kurkumin secara oral, sehingga metode analisis spektro sangat penting baik dalam pengujian kualitas dan bahkan dapat diterapkan pada penentuan kadar obat dalam biologis.

Berdasarkan uraian diatas, maka akan dilakukan penelitian pengembangan metode spektrofotometri UV dengan pendekatan kemometrik untuk analisis kurkumin dan piperin secara simultan

A. Rumusan Masalah

1. Apakah metode spektrofotometri UV memenuhi persyaratan validasi untuk analisis kurkumin dan piperin berdasarkan pendekatan kemometrik?

2. Bagaimana aplikasi kemometrik (PLS) untuk analisis kurkumin dan piperin dalam sediaan farmasi?

B. Tujuan Penelitian

1. Menentukan parameter-parameter validasi seperti presisi, linearitas, LOD & LOQ, dan spesifitas dalam metode spektrofotometri UV untuk analisis kurkumin dan piperin secara simultan dengan pendekatan kemometrik.
2. Mengaplikasikan metode spektrofotometri UV dengan pendekatan kemometrik (PLS) untuk analisis kurkumin dan piperin dalam sediaan farmasi.

C. Manfaat Penelitian

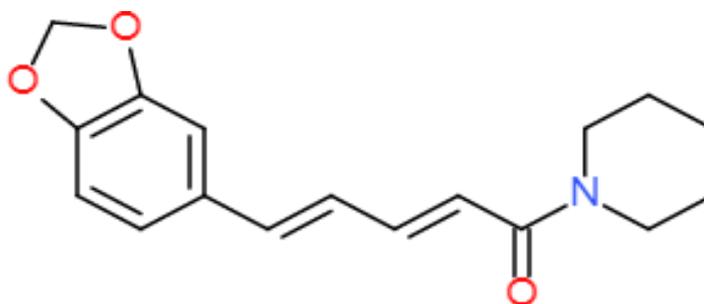
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah terkait analisis kurkumin dan piperin yang dianalisis dengan metode spektrofotometri UV berdasarkan pendekatan kemometrik, serta dapat memberikan alternatif metode dalam menganalisis nilai prediksi kurkumin dan piperin

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Piperin

Piperin merupakan senyawa golongan alkaloid yang pertama kali diisolasi dari tanaman lada (*Piperaceae*) oleh Hans Christian Ørsted pada tahun 1819. Piperin terdapat dalam jumlah sekitar 2-7,4% pada lada hitam. Piperin atau 1-piperoylpiperidine dengan nama IUPAC 1-[5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4-pentadienyl]piperidine memiliki rumus kimia $C_{17}H_{19}O_3N$, massa molar 285,35 g/mol, titik leleh 128-130 °C (2660F) dan kerapatan 1,193 g/cm³. Selain itu, piperin berisifat tidak menguap dan berperan dalam memberikan rasa serta aroma pedas (Gorgani *et al.*, 2017; Ashokkumar *et al.*, 2021; Tiwari *et al.*, 2020).



Gambar 1. Struktur Piperin

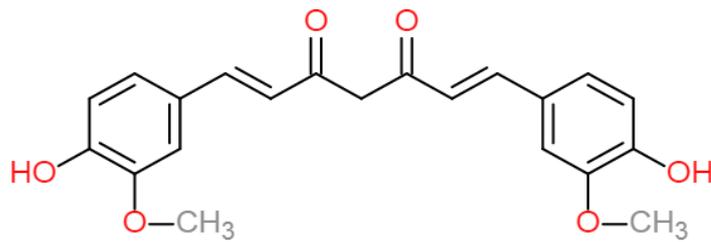
Sintesis piperin pertama kali dilakukan oleh Rugheimer pada tahun 1882 dengan menggunakan metode kondensasi asam piperinik klorida dengan piperidin. Pada tahun 1894, Ladenberg dan Scholtz melaporkan bahwa hasil sintesis piperin berasal dari asam piperinik. Asam

piperinik dapat diperoleh dengan metode kondensasi piperanol dengan asetaldehid, yang juga direaksikan dengan natrium asetat dan asetat anhidrat. Struktur piperin terutama terdiri dari tiga situs akseptor hidrogen, tiga situs hidrofobik dan cincin aromatik. Rantai alifatik terkonjugasi bertindak sebagai struktur penghubung antara piperidin dan bagian 5-(3,4-metilendioksifenil) (Tiwari *et al.*, 2020; de Alencar Filho & Silva., 2017).

Piperin ditemukan dalam 4 isomer struktur yaitu piperin, isopiperin, chavicin dan isochavicin serta analog struktur piperin yang terdiri atas piperanin, piperettin, piperylin A, piperolein B dan piperacin (Gergani dkk., 2016). Secara farmakologi, piperin memiliki beberapa manfaat diantaranya piperin memiliki aktivitas sebagai antidepresan, antioksidan, *bioenhancer*, inhibisi apoptosis, genotoksik, immunosupresan, anti-platelet, antiinflamasi, antihipertensi, hepatoprotektif, anti tiroid, anti tumor dan anti asma (Ashokkumar *et al.*, 2021; Stojanović-Radić *et al.*, 2019).

B. Kurkumin

Kurkumin merupakan senyawa bahan alam yang diisolasi dari *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*) bersama dengan dua senyawa demetoksi lainnya yaitu, *desmethoxycurcumin* dan *bisdemethoxycurcumin* (Sochitra., 2016). Kurkumin atau *Curcuma longa* secara tradisional telah digunakan di negara-negara Asia sebagai ramuan medis untuk beberapa patologi karenasifat antioksidan, anti-inflamasi, antimutagenik, antimikroba dan antikanker. (Lestari ML, Indrayanto G. Curcumin., 2014; Wright LE., 2013).



Gambar 2. Struktur Kurkumin

Kurkumin dengan nama IUPAC (1E,6E)-1,7-bis (4- hydroxy-3-methoxyphenyl)- 1,6- heptadione- 3,5-dione dengan rumus kimia $C_{21}H_{20}O_6$. Kurkumin larut dalam alkali atau pelarut yang sangat asam. Kristal kurkumin berbentuk batang atau prisma dan berwarna kuning jingga sehingga biasanya digunakan sebagai pewarna makanan (Suchitra., 2016; Rao EV, Sudheer P., 2011; Lestari ML, Indrayanto G. Curcumin., 2014).

Kurkumin memiliki senyawa tautomerik keto-enol dengan bentuk keto yang dominan pada larutan asam atau netral dan bentuk enol dominan pada larutan basa dengan sifat yang baik sebagai khelator ion logam. Berbagai aktivitas telah dikaitkan secara langsung menurut bentuk keto atau enol kurkumin (Manolova, Y *et al.*, 2014). Dalam 50 tahun terakhir telah terbukti bahwa sebagian besar efek *Curcuma longa* terutama disebabkan oleh kurkumin, dengan potensi efek terhadap diabetes, alergi, arthritis, penyakit Alzheimer dan penyakit kronis lainnya (Brondino, N *et al.*, 2014; Chin, D *et al.*, 2013). Selain kurkumin, terdapat komponen lain dalam *Curcuma longa* yang disebut golongan kurkuminoid. Kurkumin merupakan kelompok kurkuminoid yang paling melimpah (77% dari total berat) dan kelompok ini mencakup sekitar 5% dari total komponen *Curcuma longa*. Berdasarkan struktur kurkuminoid, telah disimpulkan bahwa gugus metoksi

pada cincin fenil dalam kurkumin penting untuk kesehatan (Naksuriya, O *et al*; 2014).

C. Spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan salah satu teknik analisis yang menggunakan sumber radiasi elektromagnetik sinar ultraviolet dan sinar tampak dengan memakai instrumen spektrofotometer. Spektrofotometer adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan, dan diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang (Gandjar & Rohman., 2007).

Menurut Muchlisyam dan Pardede (2017), spektrofotometri ultraviolet dan sinar tampak pada umumnya digunakan untuk:

- a. Menentukan jenis kromofor, ikatan rangkap yang terkonjugasi dan aoksokrom dari suatu senyawa organik
- b. Menjelaskan informasi dari struktur berdasarkan panjang gelombang maksimum suatu senyawa. Mampu menganalisis senyawa organik secara kuantitatif dengan menggunakan hukum Lambert-Beer.

Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam analisis dengan spektrofotometri ultraviolet yaitu (Gandjar & Rohman., 2007):

- a. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum.

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah Panjang gelombang dimana terjadi absorpsi maksimum. Panjang gelombang serapan maksimum dapat diperoleh dengan membuat kurva hubungan antara absorpsi dengan Panjang gelombang dari suatu larutan baku dengan Panjang gelombang dari suatu larutan baku dengan konsentrasi tertentu.

b. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Dilakukan dengan membuat seri larutan baku dalam berbagai konsentrasi kemudian absorpsi tiap konsentrasinya diukur lalu dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorpsi dengan konsentrasi. Kurva kalibrasi yang lurus menandakan bahwa hukum Lambert-Beer memenuhi.

c. Pembacaan Absorpsi Sampel.

Absorpsi yang terbaca pada spektrofotometri yaitu antara 0,2 sampai 0,8 atau 15% sampai 70% jika dibaca sebagai transmittansi. Hal ini disebabkan karena pada kisaran nilai absorpsi tersebut kesalahan fotometrik yang terjadi adalah paling minimal (Gandjar & Rohman., 2007).

1. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis mengamati interaksi atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik pada daerah panjang gelombang 190-380 nm (UV) atau 380-780 nm (Vis) (Gandjar & Rohman., 2014). Penggunaan utama spektrofotometri ultraviolet-visible adalah dalam analisis kuantitatif, yaitu untuk menentukan kadar senyawa yang mengabsorpsi radiasi ultraviolet-visible dengan membandingkan absorbansi sampel terhadap

absorban senyawa standar yang konsentrasinya diketahui, lalu diukur pada kondisi larutan yang sama (Satiadarma K *et al.*, 2004). Metode spektrofotometri memiliki beberapa keuntungan antara lain kepekaan yang tinggi, ketelitian yang baik, mudah dilakukan, cepat pengerjaannya dan dapat digunakan untuk menentukan senyawa campuran (Gandjar & Rohman., 2007).

Spektrofotometer terdiri dari beberapa jenis berdasarkan sumber cahaya yang digunakan diantaranya adalah sebagai berikut (Gandjar & Rohman., 2014):

a. Spektrofotometer Vis (Visible)

Pada spektrofotometer ini yang digunakan sebagai sumber sinar/energi adalah cahaya tampak (visible). Cahaya visible termasuk spektrum elektromagnetik yang dapat ditangkap oleh mata manusia. Panjang gelombang sinar tampak adalah 380 – 750 nm. Sehingga semua sinar yang dapat dilihat oleh mata manusia, maka sinar tersebut termasuk kedalam sinar tampak (visible).

b. Spektrofotometri UV (Ultra Violet)

Berbeda dengan spektrofotometri Visible, spektrofotometri UV berdasarkan interaksi sampel dengan sinar UV. Sinar UV memiliki panjang gelombang 190-380 nm. Sebagai sumber sinar dapat digunakan lampu deuterium. Deuterium disebut juga heavy hidrogen yang merupakan isotop hidrogen yang stabil yang terdapat berlimpah di laut dan di daratan. Inti atom deuterium mempunyai satu proton dan satu neutron, sementara

hydrogen hanya memiliki satu proton dan tidak 7 memiliki neutron. Nama deuterium diambil dari bahasa Yunani, deuterios, yang berarti “dua”, mengacu pada intinya yang menjadi dua partikel. Karena sinar UV tidak dapat dideteksi oleh mata manusia maka senyawa yang dapat menyerap sinar ini merupakan senyawa yang tidak memiliki warna bening dan transparan.

c. Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri ini merupakan gabungan antara spektrofotometri UV dan Visible yang menggunakan dua buah sumber cahaya berbeda, sumber cahaya UV dan sumber cahaya Visible. Meskipun untuk alat yang lebih canggih sudah menggunakan hanya satu sumber sinar sebagai sumber UV dan Vis, yaitu photodiode yang dilengkapi dengan monokromator. Spektrum absorpsi dalam daerah-daerah ultraviolet dan sinar tampak terdiri dari satu atau beberapa pita absorpsi (Gandjar & Rohman., 2014).

Untuk sistem spektrofotometri, UV-Vis paling banyak tersedia dan paling populer digunakan. Kemudahan metode ini adalah dapat digunakan baik untuk sampel berwarna juga untuk sampel tak berwarna seperti senyawa organik yang berdasarkan transisi atau dan karena itu memerlukan kromofor di dalam molekulnya. Transisi ini terjadi dalam daerah spektrum kira – kira 200-700 nm.

Spektrokopi ultraviolet-visible atau spektrofotometri ultraviolet-visible (UV-Vis atau UV/Vis) melibatkan spektroskopi dari foton dalam daerah UV-terlihat. Ini berarti menggunakan cahaya dalam terlihat dan berdekatan

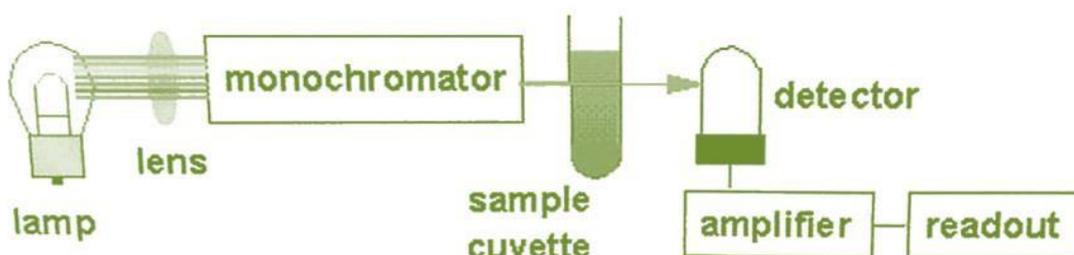
(dekat ultraviolet (UV) dan dekat dengan inframerah (NIR) kisaran. Penyerapan dalam rentang yang terlihat secara langsung mempengaruhi warna bahan kimia yang terlibat. Di wilayah ini dari 8 spektrum elektromagnetik, molekul mengalami transisi elektronik. Teknik ini melengkapi fluoresensi spektroskopi, di fluoresensi berkaitan dengan transisi dari ground state ke eksited state. Semua molekul dapat mengabsorpsi radiasi daerah UV-Vis karena mengandung elektron, baik sekutu maupun menyendiri, yang dapat dieksitasikan ke tingkat energi yang lebih tinggi. Cahaya yang diserap oleh suatu zat berbeda dengan cahaya yang ditangkap oleh mata manusia. Cahaya yang tampak atau cahaya yang dilihat dalam kehidupan sehari-hari disebut warna komplementer. Misalnya suatu zat akan berwarna orange bila menyerap warna biru dari spektrum sinar tampak dan suatu zat akan berwarna hitam bila menyerap semua warna yang terdapat pada spektrum sinar tampak. Untuk lebih jelasnya perhatikan tabel berikut :

Tabel 1. Spektrum Cahaya Tampak dan Warna-Warna Komplementer

Panjang Gelombang (nm)	Warna	Warna Komplementer
400-435	Violet	kuning-hijau
435-480	Biru	Kuning
480-490	Hijau-Biru	Orange
490-500	biru-hijau	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	kuning-hijau	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-610	Orange	Hijau-Biru
610-750	Merah	biru-hijau

(Sumber: Underwood, A.L dan R.A. Day, 1986)

Secara skematis pola kerja suatu spektrofotometri UV-VIS adalah sebagai berikut :



Gambar 3. Diagram Skematis Spektrofotometri UV-Vis (Day R.A. & Underwood A.L.)

Untuk mendapatkan hasil pengukuran yang optimum, setiap komponen dari instrumen yang dipakai harus berfungsi dengan baik. Komponen-komponen spektrofotometri UV-Vis meliputi sumber sinar,

monokromator, sel absorpsi, detektor, penguat, dan layar visual (Khopkar SM., 2008) :

1. Sumber tenaga radiasi, yang banyak digunakan adalah lampu hidrogen dan lampu deuterium. Sedangkan untuk sumber radiasi visible digunakan lampu tungsten.
2. Monokromator. digunakan untuk memperoleh sumber sinar yang monokromatis.
3. Sel absorpsi, pengukuran di daerah visible kuvet kaca dapat digunakan, tetapi untuk pengukuran pada daerah ultraviolet kita harus menggunakan sel kuarsa karena gelas tidak tembus cahaya pada daerah ini. Umumnya tebal kuvetnya adalah 10 mm. Sel yang biasa digunakan berbentuk persegi.
4. Detektor, memberikan respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang.
5. Penguat (Amplifier), berfungsi untuk menguatkan signal elektronik yang ditransfer oleh detektor agar memadai untuk dibaca.
6. Layar Visual/pencatat, berfungsi untuk menampilkan hasil pengamatan, dinyatakan dalam bentuk persen transmittan (%T), maupun absorbansi (A)

Prinsip kerja spektrofotometri UV-Vis berdasarkan interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan atom, ion, atau molekul. Serapan atom menyebabkan peralihan atau transisi elektronik, yaitu peningkatan energi elektron dari keadaan dasar (*ground state*) ke satu atau lebih tingkat energi

yang lebih tinggi atau tereksitasi (*excited state*). Transisi terjadi jika energi yang dihasilkan oleh radiasi sama dengan energi yang diperlukan untuk melakukan transisi (Gandjar & Rohman, 2014).

Bagian molekul yang bertanggung jawab terhadap penyerapan cahaya disebut kromofor yang terdiri atas ikatan rangkap dua atau rangkap tiga, terutama jika ikatan rangkap tersebut terkonjugasi. Semakin panjang ikatan rangkap dua atau rangkap tiga terkonjugasi di dalam molekul, molekul tersebut akan lebih mudah menyerap cahaya (Cairns., 2008).

Spektrofotometri UV-VIS dapat digunakan untuk penentuan terhadap sampel yang berupa larutan, gas, atau uap. Pada umumnya sampel harus diubah menjadi suatu larutan yang jernih dengan beberapa persyaratan yang harus diperhatikan seperti penggunaan pelarut yaitu mampu melarutkan sampel dengan sempurna, pelarut yang dipakai tidak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna (tidak boleh mengabsorpsi sinar yang dipakai oleh sampel), tidak terjadi interaksi dengan molekul senyawa yang dianalisis dan memiliki kemurniannya yang tinggi (Suhartati., 2017).

Absorpsi radiasi ultraviolet meningkatkan energi elektron sebuah molekul. Artinya, energi yang disumbangkan oleh foton-foton memungkinkan elektron untuk mengatasi kekekangan inti dan energi pindah ke luar ke orbital baru yang lebih tinggi energinya. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan bahan yaitu bila cahaya jatuh pada senyawa maka sebagian dari cahaya diserap oleh molekul-molekul sesuai struktur

dari molekul. Setiap senyawa mempunyai tingkatan tenaga yang spesifik. Semua molekul dapat menyerap radiasi elektromagnetik di daerah UV-Vis karena memiliki elektron sekutu maupun menyendiri, yang dapat dieksitasikan ke tingkat energi yang lebih tinggi. Sementara panjang gelombang yang menunjukkan terjadinya serapan tergantung pada kuat lemahnya ikatan elektron dalam molekul (Satiadarma dkk., 2004).

2. Proses Penyerapan Radiasi pada Spektrofotometer UV-Vis

Radiasi di daerah ultraviolet atau visible diserap melalui eksitasi electron yang terlibat dalam ikatan antara atom-atom pembentuk molekul. (Gandjar & Rohman., 2007). Radiasi elektromagnetik, yang mana sinar ultraviolet dan sinar tampak merupakan salah satunya, dapat dianggap sebagai energi yang merambat dalam bentuk gelombang. Beberapa istilah dan hubungan digunakan untuk menggambarkan gelombang ini. Panjang gelombang merupakan jarak linier dari suatu titik pada satu gelombang ke titik yang bersebelahan pada gelombang yang berdekatan (Watson DG., 2007).

Dimensi Panjang gelombang adalah Panjang (L) yang dapat dinyatakan dalam centimeter (cm), atau yang lebih umum adalah dalam unit- unit berikut :

$$1 \text{ angstrom} = 10^{-8} \text{ cm} = 10^{-10} \text{ m}$$

$$1 \text{ nanometer (nm)} = 10^{-7} \text{ cm}$$

$$= 10^{-9} = 1 \text{ milimikron (m)}$$

$$= 10 \text{ (10 angstrom)}$$

1 mikrometer ($m = 10^{-6} = 10^{-4} \text{ cm} = 1 \text{ mikron (mikron)}$)

Satuan nanometer (nm) saat ini dipilih daripada satuan yang pemakaiannya lebih kuno yakni milimikron (Mu). Huruf latin lamda (λ) merupakan simbol yang umum digunakan untuk Panjang gelombang (Gandjar & Rohman, 2007). Dengan mengukur transmitans larutan sampel, dimungkinkan untuk menentukan konsentrasinya dengan menggunakan hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert-Beer dipenuhi beberapa panjang gelombang sinar yang diserap sampel. Panjang gelombang sinar yang diserap oleh sampel bergantung pada struktur molekul sampelnya (Ermer J, Miller JH., 2005).

3. Gugus Kromofor dan Auksokrom

Bagian molekul yang mengabsorpsi dalam daerah UV dan daerah sinar tampak yang dinyatakan sebagai kromofor (Roth dan Blaschke., 1998). Menurut Adam Wiryawan, kromofor merupakan suatu gugus fungsi, tidak terhubung dengan gugus lain, yang menampakkan spektrum absorpsi karakteristik pada daerah sinar UV- sinar tampak ($\lambda > 200 \text{ nm}$). Ada 3 jenis kromofor sederhana yaitu :

- a. Ikatan ganda antara 2 atom yang tidak memiliki pasangan elektron bebas.

Contoh : $C = C$

- b. Ikatan ganda antara 2 atom yang memiliki pasangan elektron bebas.

Contoh : $C = O$

- c. Cincin benzene jika beberapa kromofor berhubungan maka absorpsi

menjadi lebih kuat dan berpindah ke Panjang gelombang yang lebih Panjang (Wiryawan. A., 2008).

Contoh kromofor tunggal, antara lain: asetilen, aldehyd, azo, karbonil, sulfoksida, benzene, etilen, dan lain-lain (Banu KS, *et al.*, 2013).

Dalam suatu molekul mengandung beberapa gugus kromofor. Jika kromofor dipisahkan satu sama lain paling sedikit oleh 2 atom karbon jenuh, maka tidak ada kemungkinan adanya konjugasi antara gugus kromofor (Roth JH and Blaschke., 1998). Kromofor merupakan suatu gugus kovalen tidak jenuh yang bertanggung jawab untuk serapan elektronik. Suatu zat atau senyawa yang bukan kromofor dapat direaksikan dengan zat lain yang menghasilkan suatu kromofor sehingga dapat dianalisis dengan spektrofotometri uv- visible (Widjaja INK dan Laksmiani NPL., 2009). Gugus seperti -OH, -ONH₂, -OCH₃ dan -Cl yang mempunyai electron-elektron valensi bukan ikatan atau electron bebas disebut auksokrom. Bila suatu terikat pada suatu kromofor, maka puncak serapan kromofor akan bergeser ke Panjang gelombang yang lebih Panjang dengan intensitas yang lebih kuat (Setiadarma. K. *et al.*, 2004; Silverstein. RM. *et al.* 1981).

Penyerapan sinar UV dan sinar tampak pada umumnya dihasilkan oleh eksitasi electron-elektron yang berikatan, akibatnya Panjang gelombang yang mengabsorpsi dapat dihubungkan dengan ikatan yang mungkin ada dalam suatu molekul (Gandjar & Rohman, 2007).

Ada tiga macam proses penyerapan energi UV dan sinar tampak yaitu (Gandjar & Rohman, 2007):

- a. Penyerapan oleh transisi electron ikatan dan electron anti ikatan
- b. Penyerapan oleh transisi electron d dan f dari molekul kompleks
- c. Penyerapan oleh perpindahan muatan

Transisi-transisi elektronik yang terjadi di antara tingkat-tingkat energi di dalam suatu molekul ada empat. Berikut akan diuraikan keempat jenis transisi:

1. Transisi sigma-sigma star ($\sigma \rightarrow \sigma^*$)

Energi yang diperlukan untuk transisi ini besarnya sesuai dengan energi sinar yang frekuensinya terletak di antara ultraviolet vakum (kurang dari 180 nm). Jenis transisi ini terjadi pada daerah ultraviolet vakum sehingga kurang begitu bermanfaat untuk analisis dengan cara spektrofotometri ultraviolet- visible. Contoh dari transisi ini adalah alkana.

2. Transisi n- sigma star ($n \rightarrow \sigma^*$)

Jenis transisi ini terjadi pada senyawa organik jenuh yang mengandung atom-atom yang memiliki electron bukan ikatan (electron n). Energi yang diperlukan untuk transisi jenis ini lebih kecil dibandingkan transisi $\sigma \rightarrow \sigma^*$ sehingga sinar yang diserap pun mempunyai panjang gelombang lebih panjang yakni sekitar 150-250 nm. Contoh transisi ini adalah nitrogen, sulfur, oksigen dan halogen.

3. Transisi n-pi star ($n \rightarrow \pi^*$)

Transisi ini sama seperti transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ yaitu sebagian besar mencakup senyawa organik. Energi yang diperlukan untuk transisi ini dalam daerah 200- 700 nm. Dengan bertambahnya kepolaran pelarut, pada

transisi ini bentuk puncak bergeser ke panjang gelombang yang lebih pendek (hipsokromik). Contoh transisi ini adalah nitrogen, sulfur, oksigen dan halogen.

4. Transisi phi-phi star ($\pi \rightarrow \pi^*$)

Bedanya dengan transisi $n \rightarrow \pi^*$ pada efek pelarut, dimana transisi ini bentuk puncak bergeser ke panjang gelombang yang lebih panjang (batokromik) dan merupakan transisi yang paling cocok untuk analisis dengan cara spektrofotometri ultraviolet – visible, sebab memiliki panjang gelombang antara 200-700 nm. Transisi ini terjadi pada electron diorbital π , yaitu pada ikatan rangkap dua atau rangkap tiga perbedaan antara transisi $\rightarrow \pi^*$ dan transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ dapat dilihat pada Tabel 1 (Gandjar IG dan Rohman A., 2007; Khopkar SM., 2008).

Tabel 2. Perbedaan antara transisi $n \rightarrow \pi^*$ dan transisi $\pi \rightarrow \pi^*$

Transisi $n \rightarrow \pi^*$	Transisi $\pi \rightarrow \pi^*$
Absorptivitas molar (ϵ) antara 10-100 $Lcm^{-1}mol^{-1}$	Absorptivitas molar (ϵ) antara 1000-10000 $Lcm^{-1}mol^{-1}$
Biasanya pelarut yang polar menyebabkan pergeseran biru atau <i>hypsochromic shift</i> (pergeseran pita serapan ke arah panjang gelombang yang lebih pendek)	Biasanya pelarut yang polar menyebabkan pergeseran merah atau <i>bathochromic shift</i> (pergeseran pita serapan ke arah panjang gelombang yang lebih panjang)

Sumber : Gandjar IG dan Rohman A. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta. 2007. 220-296.

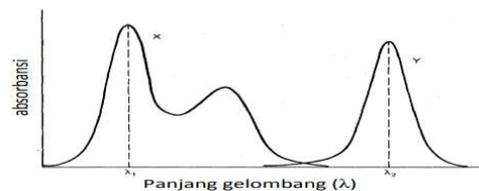
4. Analisis Multikomponen dengan spektrofotometri (Simultan)

Analisis kuantitatif campuran dua komponen merupakan Teknik pengembangan analisis kuantitatif komponen tunggal. Prinsip pelaksanaannya adalah mencari absorban atau beda absorban di tiap-tiap

komponen yang memberikan korelasi yang linier terhadap konsentrasi, sehingga akan dapat dihitung masing-masing kadar campuran zat tersebut secara serentak atau salah satu komponen dalam pencampurannya dengan komponen lainnya (Mulja M. dan Suharman., 1995).

Ada beberapa kemungkinan yang terjadi pada spektrum absorban dua komponen menurut Day dan Underwood (2002) yaitu:

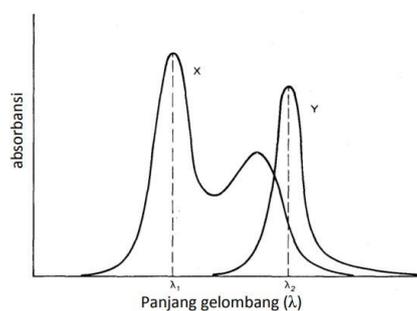
1. Kemungkinan pertama



Gambar 4. Spektrum absorpsi senyawa X dan Y (tidak tumpang tindih pada dua Panjang gelombang yang digunakan)

Pada gambar diatas dapat dilihat bahwa terjadi kemungkinan spektrum yang tidak tumpang tindih pada dua Panjang gelombang yang digunakan.

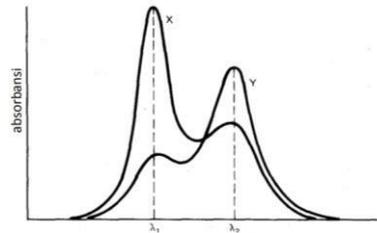
2. Kemungkinan kedua



Gambar 5. Spektrum absorpsi senyawa X dan Y (Spektrum X tumpang tindih pada spektrum Y)

Pada gambar diatas dapat dilihat terjadi tumpang tindih satu arah dimana Y tidak mengganggu pengukuran X pada λ_1 , tetapi X menyerap cukup banyak Bersama-sama Y pada λ_2

3. Kemungkinan ketiga



Gambar 6. Spektrum absorsi senyawa X dan Y (Spektrum X saling tumpang tindih pada spektrum Y)

Pada gambar diatas dapat dilihat pada spektrum X dan Y saling tumpang tindih, namun memiliki absorbansi tersendiri. Spektrum serapan dari campuran X dan Y merupakan jumlah dari dua kurva individu. Penggunaan Teknik persamaan simultan ada beberapa persyaratan yang diperlukan agar diperoleh hasil yang memuaskan, seperti harga rasio serapan jenis antar komponen pada Panjang gelombang maksimum masing- masing komponen harus relative besar (Zainuddin M., 1999). Pada penetapan kadar campuran multikomponen sulit dilakukan, sehingga untuk mengatasi hal tersebut maka digunakan prinsip persamaan regresi berganda melalui perhitungan matriks dengan metode pengamatan beberapa Panjang gelombang berganda (*multiple wavelength*) (Zainuddin. M., 1999).

Panjang gelombang dipilih berdasarkan spektrum tersebut mulai memberikan serapan sampai hamper tidak memberikan serapan, dimana konsentrasi larutan yang dipakai serapannya memenuhi hukum Lambert-Beer yaitu 0,2-0,8. Pada metode ini tidak diperlukan proses pemisahan komponen zat aktif karena kadar komponen kedua zat dapat ditetapkan

secara Bersama- sama (Adrianto. YC., 2009).

Adapun metode yang digunakan untuk analisis multikomponen yaitu:

a. Metode persamaan simultan

Pengukuran secara bersamaan tanpa proses pemisahan terhadap dua komponen, maka pengukuran dapat dilakukan pada dua Panjang gelombang dimana masing-masing komponen tidak saling mengganggu. Pengukuran dilakukan pada masing-masing larutan pada dua Panjang gelombang, sehingga diperoleh dua persamaan hubungan antara absorpsi dengan konsentrasi pada dua Panjang gelombang dan konsentrasi pada masing- masing komponen dapat dihitung. Dasar dari cara ini adalah hukum Lambert- Beer, dimana serapan suatu campuran merupakan jumlah total serapan masing-masing komponen penyusunnya. Untuk penentuan kadar dengan cara simultan, maka syarat utamanya adalah kurva spectra dari masing- masing komponen harus saling tumpang tindih (overlap) satu sama lain dan jarak panjang gelombang maksimum kedua senyawa ± 10 nm. Pada pelaksanaannya dilakukan pada dua Panjang gelombang yaitu Panjang gelombang maksimum dari kedua senyawa (Khopkar. SM., 2008).

b. Penentuan perbandingan serapan

Cara ini merupakan pengembangan dari cara simultan yang berdasarkan atas hubungan antara nilai serapan (*control rasio absorbancy*) dengan kadar suatu zat dalam campuran binner, dimana Panjang gelombang kedua senyawa yang diukur memiliki koefisien absorptifitas

yang sama (Roth. JH and Blaschke. G., 1998). Panjang gelombang pada titik isosbestik merupakan Panjang gelombang dimana kromofornya tidak dipengaruhi oleh PH.

Titik isosbestik adalah titik dimana absorbansi molar yang terukur dari suatu senyawa adalah sama pada satu Panjang gelombang, tidak terpengaruh oleh konsentrasi dan ph larutan. Titik isosbestik ini digunakan untuk mengukur absorbansi suatu senyawa yang absorbansinya berubah-ubah tergantung ph pada titik selain titik isobestik (Widjaja. INK. *et al.*, 2008). Kromofor merupakan suatu gugus kovalen tidak jenuh yang bertanggung jawab untuk serapan elektronik. Kromofor merupakan bagian molekul yang mengabsorpsi dalam daerah ultra violet dan daerah sinar tampak (Roth. JH and Blaschke. G., 1998). Titik isosbestic dapat pula diartikan sebagai Panjang gelombang, bilangan gelombang atau frekuensi dimana total absorbansi dari suatu sampel tidak berubah selama reaksi kimia atau perubahan fisik sampel (Widjaja. INK. *et al.*, 2008).

5. Metode-metode derivatif spektrofotometri UV

Metode spektrofotometri yang bersifat derivatif dapat digunakan untuk analisis kuantitatif zat dalam campuran dimana spektrumnya mungkin tersembunyi dalam suatu bentuk spektrum besar yang saling tumpang tindih dengan mengabaikan proses pemisahan zat terlebih dahulu. Spektrum yang dialih bentuk ini menghasilkan profil yang lebih rinci yang tidak terlihat pada spektrum normal (Nurhidayati, L., 2007).

Jika kita berasumsi bahwa spektrum orde-nol memenuhi Hukum Beer,

maka ada hubungan linear yang sama antara konsentrasi dan amplitude

untuk semua turunan:

Orde nol

$$A = \varepsilon b c$$

Orde pertama $\frac{dA}{d\lambda} = \frac{d\varepsilon}{d\lambda} bc$

Keterangan : λ = Panjang gelombang A = Absorbansi

ε = Absorptivitas

b = Tebal Kuvet

c = Konsentrasi Sampel

Ada empat metode umum yang digunakan untuk evaluasi spectra pada metode derivative yaitu metode *peak-peak*, metode *peak-tangent*, metode *peak-zero (zero crossing)*, metode *peak-peak ratio* (rasio spectra) (Nurhidayati, L., 2007).

Menurut hukum Lambert, serapan berbanding lurus terhadap ketebalan sel yang disinari. Sedangkan menurut Beer, serapan berbanding lurus dengan konsentrasi. Kedua pernyataan ini dapat dijadikan satu dalam hukum Lambert- Beer, sehingga diperoleh bahwa serapan berbanding lurus terhadap konsentrasi dan ketebalan sel, hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi larutan (Gandjar & Rohman, 2014).

Hukum Lambert-Beer dikenal dengan persamaan sebagai berikut :

$$A = a b c \text{ (g / L)}$$

Keterangan :

A = Absorbansi a = absorptivitas

b = tebal kuvel (cm) c = konsentrasi

1.1.5. Hukum Lambert-Beer

Spektrofotometer dapat digunakan untuk mengukur besarnya energi: yang diabsorpsi / diteruskan. Jika radiasi yang monokromatik melewati larutan yang mengandung zat yang dapat menyerap, maka radlasi ini akan dipantulkan, diabsorpsi oleh zatnya dan sisanya ditransmisikan.

$$I_0 = I_r I_a + I_t$$

Pengaruh I_r dapat dihilangkan dengan

menggunakan blanko/control sehingga :

$$I_0 = I_a + I_t \quad (1)$$

Lambert dan Beer telah menurunkan secara empirik hubungan antara intensitas cahaya yang ditransmisikan dengan tebalnya larutan dan hubungan antara intensitas tadi dengan konsentrasi zat (Banu KS *et al.*, 2013). Hukum Lambert, serapan berbanding lurus terhadap ketebalan sel yang disinari. Sedangkan menurut Beer, serapan berbanding lurus dengan konsentrasi. Kedua pernyataan ini dapat dijadikan satu dalam Hukum Lambert Beer. sehingga diperoleh bahwa serapan berbanding lurus terhadap konsentrasi dan ketebalan sel, hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi larutan (Gandjar & Rohman, 2007).

Umumnya zat yang akan dianalisis dibuat absorbansinya mendekati 0,4343, atau dibuat absorbansi berada pada rentang 0,2-0,8. Hal ini dikarenakan jika analit diukur pada rentang tersebut nilai kesalahan fotometrianya kecil atau lebih kecil jika absorbansi analit diukur diluar rentang 0,2-0,8 (Gandjar & Rohman, 2007). Hukum Lambert-Beer menjadi dasar aspek kuantitatif spektrofotometri ultraviolet-visibel. Menurut Hukum Lambert-Beer, yang dapat ditulis dengan persamaan:

$$A = a \cdot b \cdot c \text{ (g/liter) atau } A = \epsilon \cdot b \cdot c \text{ (mol/liter) atau } A = A_{1\%1\text{cm}} \cdot b \cdot c \text{ (g/100ml)}$$

Dimana: A = Serapan

a = absorptivitas

b = ketebalan sel

c = konsentrasi

ϵ = absorptivitas molar

$A_{1\%1\text{cm}}$ = absorptivitas spesifik.

Absorptivitas (ϵ) merupakan suatu konstanta yang tidak tergantung pada konsentrasi, tebal kuvet dan intensitas radiasi yang mengenai larutan sampel. Absorptivitas tergantung pada suhu, pelarut, struktur molekul dan panjang gelombang radiasi. Satuan ϵ ditentukan oleh satuan-satuan b dan c . Jika satuan c dalam molar (M) maka absorptivitas disebut dengan absorptivitas molar (ϵ) dengan satuan $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Jika c dinyatakan dengan persen berat/volume (g/100 mL) maka absorptivitas dapat ditulis dengan $A_{1\%1\text{cm}}$ atau sering kali ditulis dengan $A_{1\%1\text{cm}}$ (Gandjar & Rohman, 2007).

Penyimpangan- penyimpangan Hukum Beer :

Pada konsentrasi rendah, grafik hubungan dari serapan dengan

konsentrasi biasanya merupakan garis lurus. Pada konsentrasi yang lebih tinggi kurva ini dapat membelok ke arah absis atau ordinat. Penyimpangan ini disebabkan oleh kondisi percobaan yang tidak dipenuhi lagi, yaitu :

1. Cahaya tidak cukup monokromatis
2. Cahaya sampingan (stray radiation) mengenai detector
3. Kepekaan detektor berubah
4. Intensitas sumber cahaya dan amplifier dari detector berubah-ubah karena tegangan tidak stabil.
5. Pada desiasi-asosiasi keseimbangan kimia berubah, misalnya pada perubahan pH larutan.
6. Larutan berfluoresensi
7. Suhu larutan berubah selama pengukuran.

Seperti diketahui bahwa Beer hanya berlaku untuk cahaya monokromatis. Dalam praktek hal ini sukar dipenuhi karena derajat kemonokromatisan, ditentukan oleh lebar celah yang digunakan. Makin kecil lebar celah, makin monokromatis cahaya yang diperoleh, akan tetapi intensitas cahaya yang mengenai detektor juga makin kecil sehingga kepekaan berkurang (Harmita., 2004).

6. Kemometrik

Menurut *International Chemometrics Society* kemometrik adalah ilmu pengetahuan yang menghubungkan pengukuran yang dibuat pada suatu proses atau sistem kimiawi melalui penggunaan ilmu matematika dan statistik. Kemometrika diperkenalkan ke dalam spektroskopi untuk

meningkatkan kualitas data yang diperoleh. Meskipun, pada awal penggunaannya hanya untuk mengolah data spectra, akan tetapi saat ini kemometrik memungkinkan untuk memperlakukan sejumlah besar informasi yang berasal dari konsentrasi komponen sampel dalam jangka waktu yang cepat (Rohman., 2014).

Kemometrik adalah cabang utama yang dikembangkan secara luas di berbagai bidang farmasi. Nama kemometrik dapat dibagi menjadi dua istilah yaitu kemo (dari kimia) dan metrik (pengukuran). Singkatnya kemometrik adalah istilah yang berhubungan dengan data kimia dan bagaimana mendapatkan informasi dari data tersebut dengan menggunakan model matematis yang harus selalu divalidasi sebelum diterapkan. Percobaan dan observasi merupakan bagian yang tidak terpisahkan dengan kemometrik, karena harus dilakukan sedemikian rupa, sehingga semua variabel eksperimen bervariasi yang dapat dicapai dan destimasi dengan menggunakan desain eksperimental (Muchlisyam & Pardede., 2017).

Analisis dari suatu observasi mutlak dilakukan dengan matematika, oleh sebab itu pengembangan perangkat lunak tentang pengetahuan teori matematika dengan sistem komputerisasi merupakan bagian yang tidak terpisahkan analisis kimia (Muchlisyam & Pardede., 2017).

Teknik kemometrik yang diaplikasikan dalam pembuatan kurva kalibrasi kuantitatif pada analisis spectral yang berdekatan sangat penting dalam kualiti kontrol kadar komponen obat dalam campuran obat pada

sediaan obat yang terdiri dari 2 atau 3 komponen obat atau lebih, dan mempunyai panjang gelombang berdekatan ketika dilakukan tumpang tindih spektrumnya. Selain itu, teknik ini bisa berhasil diterapkan pada semua metoda analisis dalam spektrofotometri (Muchlisyam & Pardede., 2017).

Kemometrik menggunakan metoda multivariat yang menawarkan banyak keuntungan dalam melakukan analisis spektroskopi kuantitatif berbagai jenis campuran obat. Pada penetapan kadar campuran obat, perlu dilakukan pendekatan analisa data multivariat yang harus diimplementasikan, daripada analisis univariat agar didapatkan informasi yang lebih banyak dan lebih dalam serta akurat (Muchlisyam & Pardede., 2017).

Metode-metode analisis farmasi seperti spektroskopi mampu memberikan sejumlah data beberapa komponen secara simultan dalam satu kali pembacaan sampel. Model kalibrasi multivariat yaitu *principle component regression* (PCR), *partial least square* (PLS) dan *Genetic Algorithm PLS* (GAPLS) (Rohman., 2012).

1. Model *Principle Component Regression* (PCR)

Model PCR merupakan analisis faktor yang mana hanya spektra yang tidak memberi ko-linearitas yang digunakan dalam kalibrasi. PCR mengaplikasikan teknik multivariat analisis komponen utama atau *Principal Component Analysis* (Rohman, A dan Che Man dkk., 2011). Model PCR banyak digunakan untuk data yang memiliki tingkat kovariansi dalam

variabel independent atau bila matriks yang dikondisikan buruk ada (Muchlisyam & Pardede., 2016). Model PCR diterapkan untuk menentukan komponen yang diselidiki bahkan komponen yang tidak diketahui (Abdelazim & Shahin., 2021).

Dasar PCR adalah untuk mereduksi banyaknya variabel prediktor dengan menggunakan beberapa komponen utamanya dibandingkan dengan menggunakan variabel asal. Dengan demikian, pada PCR sebagai prediktor tidak lagi absorbansi tetapi kombinasi absorbansi yang membentuk variabel baru komponen utama. Metode ini bekerja dengan baik ketika antar variabel prediktor (absorbansi) terjadi korelasi, maka metode ini juga mensyaratkan bahwa jumlah sampel kalibrasi harus lebih banyak dibandingkan jumlah variabel prediktor (Rohman., 2014).

2. Model *Partial Least Square* (PLS)

Model PLS merupakan jenis regresi yang dihitung dengan algoritma kuadrat terkecil yang menghubungkan antara dua matriks, data spektra pada matriks X dan nilai referens pada matriks Y. PLS sering digunakan pada spektroskopi untuk mengekstrak informasi dari spektra yang mengandung puncak-puncak tumpang tindih, adanya pengganggu serta adanya derau (noise) dari instrument yang digunakan untuk mengumpulkan data (Syahariza dkk., 2005). Model *partial least square* (PLS) mampu memprediksi secara lebih baik dibandingkan PCR ketika terdapat base linear yang acak dan atau spektra komponen utama yang tumpang tindih (Sohrabi dkk., 2009).

Model PLS memiliki banyak keunggulan dibandingkan model PCR, termasuk kekuatan PLS untuk memanfaatkan seluruh informasi dari data spektral sehingga menjamin akurasi lebih untuk analisis spektral. Selain itu, model PLS memiliki keunggulan dalam memilih variabel yang paling informatif dan mengecualikan variabel yang tidak informatif sehingga meningkatkan kualitas model yang diterapkan. Model PLS diterapkan untuk merancang model kalibrasi antara konsentrasi obat dan variabel laten dari matriks data. Variabel laten dikembangkan dengan menggunakan nilai konsentrasi dengan karakter khusus kombinasi linear dari variabel asli (Abdelazim & Shahin., 2021).

3. Model *Genetic Algorithm PLS* (GAPLS)

Model GAPLS (*Genetic Algorithm PLS*) diterapkan untuk meningkatkan kualitas kalibrasi. Hal ini dapat menghilangkan variabel yang tidak informatif dan pemilihan variabel dapat tercapai. Variabel yang dipilih sering kali sesuai dengan wilayah spektral yang terdefinisi dengan baik dan bukan menjadi variabel tunggal yang tersebar di seluruh spektrum, sehingga memiliki kemampuan prediksi yang lebih baik dibandingkan model spektrum penuh. Algoritme genetika digunakan dalam masalah pemilihan panjang gelombang dalam kasus kalibrasi multivariat yang dilakukan oleh PLS (Abdelazim & Shahin, 2021).

7. Validasi

1. Definisi validasi

Validasi adalah konfrimasi melalui pengujian dan pengadaan bukti

yang objektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu maksud khusus dipenuhi (Riyanto,2002). Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita., 2004).

Laboratorium harus memvalidasi metode tidak baku, metode yang didesain atau dikembangkan laboratorium, metode baku yang digunakan di luar lingkup yang dimaksudkan, dan metode baku yang dimodifikasi dan metode baku untuk menegaskan dan mengkonfirmasi bahwa metode itu sesuai untuk penggunaan yang dimaksudkan (Miles *et al*, 2007).

Metode analisis perlu divalidasi atau validasi ulang (Miles *et al*, 2007):

- a. Sebelum dipakai dalam penggunaan rutin
- b. Ketika terjadi perubahan kondisi pada metode yang telah divalidasi (misalnya instrument dengan karakteristik berbeda atau sampel dengan matriks yang berbeda)
- c. Ketika metode diubah dan perubahan tersebut diluar dari cakupan metodeawal

Organisasi yang mengharuskan validasi metode uji adalah *Internasional Standards Organization (ISO)* yaitu ISO 17025, *AOAC (International Association of Official Analytical Chemists)*, *ASTM Internasional (American Society for Testing and Materials)*, *ILAC* dan *ICH (The International Conference of Harmonization of Technical Requirements forRegistrasion of Pharmaceuticals for Human Use)* (Miles *et al*, 2007).

2. Parameter Validasi

United State Pharmacopeia (USP) 39 telah menerbitkan panduan spesifik untuk evaluasi senyawa. USP mendefinisikan delapan langkah untuk validasi yaitu akurasi, presisi, spesifikasi, batas deteksi (LOD), batas kuantitasi (LOQ), Lineritas dan rentang, dan *robustness* (USP 39., 2016).

USP 39 tahun 2016 menjelaskan kategori prosedur pengujian yang memerlukan skema validasi yang berbeda. Kategori tersebut adalah sebagai berikut (USP 39., 2016) :

- a) Kategori I yaitu prosedur analisis untuk kuantisasi komponen utama obat atau zat aktif (termasuk pengawet) dalam produk farmasetik.
- b) Kategori II yaitu prosedur analisis untuk menentukan cemaran (*impurities*) dalam obat atau senyawa hasil degradasi dalam produk farmasetik. Prosedur ini termasuk uji kuantitatif dan uji batas.
- c) Kategori III yaitu prosedur analisis untuk menentukan karakteristik kinerja seperti disolusi, pelepasan obat dan lain-lain.
- d) Kategori IV yaitu uji identifikasi
 - a. Selektifitas

Selektifitas merupakan kemampuan metode untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen

matriks (USP 39., 2016). Dalam Teknik kromatografi, selektifitas dapat dibuktikan dengan pemisahan yang baik antara analit dengan komponen yang lain. Bukti dari persyaratan ini didapatkan resolusi analit dari komponen lain lebih besar 1.5 – 2.0 (USP 39., 2016).

b. Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relative dari jumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistic (Gandjar dan Rohman., 2014). Penentuan presisi dapat dibagi dalam tiga kategori yaitu ketertiruan (*repeability*), presisi antara (*intermediate precision*), dan ketertiruan (*reproducibility*). *Repeability* adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. *Intermediate precision* menggambarkan variasi laboratorium seperti hari yang berbeda. *Reproducibility* adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analisis yang berbeda pula. Analisis dilakukan terhadap sampel-sampel yang diduga identic yang dicuplik dari batch yang sama.

Presisi dari metode uji ditentukan dengan rumus

$$\% \text{RSD} = \frac{SD}{X} \times 100\%$$

Keterangan

SD	: Standar Deviasi
X	: Nilai Rata-rata
RSD	: <i>Relative Standar Deviation</i>

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan nilai % RSD $\leq 2\%$. Kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang dianalisis, jumlah sampel dan kondisi laboratorium. Nilai RSD atau koefisien variansi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis (Harmita., 2004).

c. Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil Analisa dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan Kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran kesalahan sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai akurasi yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi kesalahan sistematis tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, dan sesuai prosedur (Harmita., 2004).

Akurasi ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recover*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia CRM atau SRM) ditambahkan ke dalam campuran

bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis yang hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen peroleh kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Persen perolehan Kembali dapat ditentukan dengan cara membuat placebo (eksipien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi. Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel placebo karena matriksnya tidak diketahui seperti obat-obatan paten, atau karena analitnya berupa suatu senyawa endogen misalnya metabolit sekunder pada kultur kalus, maka dapat dipakai metode adisi (Harmita., 2004)

d. Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan

metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit. Dalam beberapa kasus, untuk memperoleh hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit, data yang diperoleh diolah melalui transformasi matematik dulu sebelum dibuat analisis regresinya (Riyanto, Ph.D., 2014)

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier, $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (S_y) untuk menentukan nilai V_{x_0} . Dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer, semua perhitungan matematik tersebut dapat diukur (Riyanto, Ph.D., 2014).

e. Batas deteksi

Batas deteksi adalah konsentrasi analit terendah yang dapat dideteksi dan diidentifikasi dengan tingkat kepastian tertentu. Batas deteksi juga didefinisikan sebagai konsentrasi terendah yang dapat dibedakan dari kebisingan (*noise*) dengan tingkat kepercayaan tertentu. Ada beberapa metode untuk memperkirakan batas deteksi, yang semuanya bergantung pada analisis blanko dan pengujian rasio *signal to noise*. Batas deteksi dapat dipengaruhi oleh perubahan kecil pada sistem analisis (misalnya suhu, kemurnian reagen, efek matriks, kondisi instrumen). Oleh karena itu penting bahwa parameter ini selalu diverifikasi oleh laboratorium yang menerapkan metode yang telah divalidasi sebelumnya (Riyanto, Ph.D.,

2014).

f. Batas kuantitasi

Batas kuantitasi adalah karakteristik pengujian kuantitatif untuk pengukuran komponen (analit) dengan konsentrasi rendah dalam matriks sampel, seperti pengotor dalam zat obat dan produk degradasi dalam obat jadi. Batas kuantitasi menunjukkan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan ketepatan dan akurasi yang dapat diterima di bawah kondisi percobaan yang ditentukan. Batas kuantitasi dinyatakan sebagai konsentrasi analit (mis., persen, bagian per juta) dalam sampel (United States Pharmacopeial Convention., 2016).

g. *Ruggedness (robustness)*

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan kecil dan terus menerus terhadap suatu metode dan mengevaluasi respon analitik dan efek presisi dan akurasi. Sebagai contoh, perubahan yang dibutuhkan untuk menunjukkan kekuatan prosedur KCKT dapat mencakup (tapi tidak dibatasi) perubahan komposisi organik fase gerak (1%), pH fase gerak (* 0,2 unit), perubahan temperatur kolom ($\pm 2 - 3$ °C), dan merek kolom yang berbeda. Ketahanan suatu metode analisis adalah ukuran dari kemampuannya untuk tetap tidak terpengaruh oleh variasi kecil, tetapi disengaja dalam parameter metode, dan memberikan indikasi kehandalan selama penggunaan normal. Evaluasi ketahanan harus dipertimbangkan dalam tahap pengembangan metode. Bahkan, proses validasi metode tidak dapat dipisahkan dari perkembangan aktual kondisi metode, karena tidak

mungkin untuk mengetahui apakah kondisi metode dapat diterima sampai studi validasi dilakukan. Evaluasi kekokohan kromatografi metode sering kompleks dan melelahkan, dengan mempertimbangkan jumlah besar parameter analisa yang harus dilakukan. Interpretasi data dilakukan dengan t- test atau uji ANOVA (Riyanto, Ph.D., 2014).

Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu, Spektrofotometri UV dengan pendekatan kemometrik dapat digunakan analisis kurkumin dan piperin secara simultan dalam sediaan farmasi padat.