

**VALIDASI METODE DENSITOMETRI
PADA PENETAPAN KADAR ZERUMBON
YANG DIPEROLEH DARI LEMPUYANG WANGI
(*Zingiber aromaticum* Vahl.)**

**HELMI NURLIANI
N111 09 286**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**VALIDASI METODE DENSITOMETRI
PADA PENETAPAN KADAR ZERUMBON
YANG DIPEROLEH DARI LEMPUYANG WANGI
(*Zingiber aromaticum* Vahl.)**

SKRIPSI

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



**HELMI NURLIANI
N111 09 286**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERSETUJUAN

**VALIDASI METODE DENSITOMETRI
PADA PENETAPAN KADAR ZERUMBON
YANG DIPEROLEH DARI LEMPUYANG WANGI
(*Zingiber aromaticum* Vahl.)**

HELMI NURLIANI

N111 09 286



Pembimbing Utama,

Pembimbing Pertama,

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

Abdul Rahim, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19771111 200812 1 001

Pada tanggal, 25 Juli 2013

PENGESAHAN

**VALIDASI METODE DENSITOMETRI
PADA PENETAPAN KADAR ZERUMBON
YANG DIPEROLEH DARI LEMPUYANG WANGI
(*Zingiber aromaticum* Vahl.)**

Oleh :
HELMI NURLIANI
N111 09 286

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada Tanggal 25 Juli 2013

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua
Dra. Christiana Lethé, M.Si., Apt. :
2. Sekretaris
Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt. :
3. Anggota
Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. :
4. Ex Officio
Drs. H. Syaharuddin Kasim M.Si., Apt :
5. Ex Officio
Abdul Rahim S.Si., M.Si., Apt :

Mengetahui :
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA, Apt.
NIP. 19560114 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 juga 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 bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 25 Juli 2013

Penyusun,

Helmi Nurliani

UCAPAN TERIMA KASIH



Subhanallahu Wal Hamdulillahu Wa Laa Ilaaha Illallahu Wallahu Akbar. Puji syukur yang tak terhingga penulis haturkan kepada Allah Subhanahu Wa Ta'ala Yang Maha Berkuasa Atas Segalanya, karena hanya dengan ridho, hidayah anugerah dan limpahan rahmat-Nya kepada penulis sehingga skripsi ini bisa terselesaikan. Shalawat serta salam selalu tcurahkan kepada junjungan kita, Nabiullah Muhammad Shallallahu 'alaihi Wasallam.

1. Terima kasih sedalam-dalamnya, serta rasa sayang penulis ucapkan kepada Etta tersayang **Hi. Haikal S.Ag** dan ibunda tersayang **H. Andi Yadawiyah** atas segala pengorbanan selama ini, baik itu pengorbanan moril maupun materil, yang selama ini selalu berusaha demi untuk melihat penulis bisa meraih keberhasilan. Penulis sadar bahwa tidak ada yang dapat penulis lakukan untuk membalas pengorbanan tersebut, selain memanjatkan do'a yang tiada henti kepada Allah SWT untuk ayah dan ibu.
2. Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Bapak Drs, H. Syaharuddin Kasim, M.Si, Apt. selaku pembimbing utama penulis sekaligus penasehat akademik penulis, dan Bapak Abdul Rahim, M.Si., Apt. selaku pembimbing pertama penulis, yang telah penulis anggap sebagai orang tua kedua penulis

yang sudah begitu banyak memberikan bimbingan, motivasi serta pengalaman yang sangat berharga buat penulis kedepannya.

3. Kepada ibu Dekan Fakultas Farmasi, Prof. Dr. Elly Wahyuddin, DEA., Apt; kepada bapak wakil dekan I, Prof.Dr.Gemini Alam, M.Si., Apt; ibu wakil Dekan II, Prof.Dr.rer-nat. Hj. Marianti A. Manggau, Apt; dan bapak wakil dekan III, Drs. Abd. Muzzakkir Rewa, M.Si., Apt; serta bapak/ibu dosen Fakultas Farmasi UNHAS; terima kasih atas ilmu, nasehat, saran serta pengalaman yang telah diberikan selama penulis menjalani perkuliahan ini, serta seluruh Pegawai Akademik dan staff pegawai Fakultas Farmasi UNHAS yang telah banyak membantu penulis.
4. Kepada saudaraku Khairul Haikal, Fakhriyah, S.Kep., Ns. dan Muhammad Hidayat S.H, serta seluruh keluarga yang telah memberiku semangat, dan juga bantuan moril maupun materil untuk menggapai cita demi keberhasilanku dalam dunia perkuliahan, penulis ucapkan terima kasih banyak.
5. Kepada saudariku Mutmainnah S.Si, Halijah dan Resti Anugrah Rizal, saudariku Kuechlers (Faisah S.Si., Desi Rosanti S.Si., Dian Chikita, Lusi capriny) terimakasih yang terdalam penullis ucapkan atas persahabatan, pengorbanan, persaudaraan, semangat, canda dan tawa yang sungguh teramat indah yang telah kalian berikan menjadi pengalaman hidup penulis, termakasih sekali lagi untuk persahabatan yang menyenangkan beberapa tahun ini.

6. Kepada saudariku PB (Fitiriawati S.KM, Puput Januari Amd.Keb, Annisa Sri Aryanti S.E, Dian Savitri S.Kom, Yuli sestianingsih S.E, Sheilla Seruni S.H dan Nuhriza Arfah) terimakasih atas dorongan, semangat, dan persahabatan kalian sejak SMA, yang masih terjalin hingga saat ini.
7. Kepada saudara/iku GINKGO angkatan 2009 Fakultas Farmasi UNHAS;. Khususnya (Satria, Amhy, Ita, Habib, Harold, Kuandi) Terima kasih banyak atas semua persaudaraan yang telah kalian tanamkan, begitu juga canda dan tawa yang telah kalian tuliskan dalam wajah penulis.
8. Kepada teman-teman seperjuangan dalam penelitian zerumbon Lempuyang wangi dan sekaligus teman se penasehat akademik penulis (Risqah Mathar S.Si, Faisah S.Si., Dian Chikita, dan Angela S.Si.,) terimakasih atas kerja sama, semangat, waktu dan perjuangan bersama hingga dapat menyelesaikan penelitian ini.
9. Kepada kanda Ismail, S.Si., Apt, Asril D Hasan, S.Si., Apt, dan Assaad Anshari, S.Si., Apt yang telah memberi pembelajaran, motivasi, saran-saran, nasihat, arahan, dan memberikan insiprasi bagi penulis yang masih penulis ingat hingga detik ini.
10. Kepada pihak yang tidak sempat disebut namanya. Semoga Allah membalas semua kebaikan kita selama ini

Penulis sangat menyadari, dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari kesempurnaan, sehingga saran, dan

kritik yang membangun sangat diharapkan oleh penulis kedepannya. Akhir kata semoga apa yang penulis persembahkan ini dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan kedepannya. Amin ya Rabb.

Makassar, Juli 2013

Penulis,

Helmi Nurliani H.

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian validasi metode densitometri pada penetapan kadar zerumbon yang diperoleh dari Lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* vahl). Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui validitas metode densitometri pada penetapan kadar senyawa zerumbon yang diperoleh dari tanaman lempuyang wangi yang dihasilkan dengan melihat parameter validasi yang meliputi Keterulangan, Linieritas, Batas Deteksi, Batas Kuantitasi, dan Presisi. Berbagai parameter dianalisis dengan menggunakan panjang gelombang maksimum 260 nm. dengan hasil pengujian Linieritas dengan konsentrasi 100, 150, 200, 300, dan 400 dengan nilai 0,994. Hasil Presisi pada konsentrasi tertinggi sebesar 10.4% dan pada konsentrasi terendah 7.2% untuk LOD dengan nilai 0.004 µg/totolan dan nilai LOQ 0.136 µg/totolan serta pada pengujian Keterulangan dengan nilai koefisien variasi sebesar 9.7% pada pembandingan zerumbon dan 4.3% pada sampel isolat zerumbon. Berdasarkan data penelitian dapat disimpulkan bahwa Metode Densitometri dinyatakan valid pada penetapan kadar senyawa zerumbon yang diperoleh dari tanaman lempuyang wangi.

ABSTRACT

Validation studies have been done by densitometry method to determine the concentration of zerumbone which isolated from Lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* Vahl). This study aims to get the validity of densitometry method on determination of concentration zerumbone compound of Lempuyang wangi by obtaine the validation parameter which includes; Repeatability, Linearity, Limit of Detection, Limit of Quantitation, and precision. each parameter analyzed by using the maximum wavelength of 260 nm. the result of linierity in concentration 100, 150, 200, 300, and 400 is 0,994. precision test in highest concentration 10,4 % and lowest concentration 7,2 %. LOD 0,004 µg/totolan dan LOQ 0,136 µg/totolan and repeatability test shows coefisien variation 9,7 % to zerumbon standard and 4,3 % to isolated zerumbon. The study result concluded that the densitometry method on determination of concentration zerumbone compound of Lempuyang wangi is valid.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
ABSTRAK.....	x
ABSTRACT.....	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
II.1 Uraian Tanaman Lempuyang wangi.....	5
II.1.1 Klasifikasi Lempuyang wangi.....	5
II.1.2 Nama Daerah.....	5
II.1.3 Morfologi Lempuyang wangi.....	5
II.1.4 Kandungan Kimia Lempuyang wangi.....	6
II.2 Uraian Tentang Zerumbon.....	6
II.2.1 Terpen	6
II.2.2 Sesquiterpenoid	7

II.2.3 Zerumbon	7
II.3 Validasi Metode Analisis	8
II.4 Densitometri	9
II.4.1 Mode Operasi Densitometri.....	11
II.4.2 Teori Densitometri.....	14
II.4.3 Cara Pengukuran dengan Densitometri.....	15
BAB III. PELAKSANAAN PENELITIAN.....	19
III.1 Alat dan Bahan.....	19
III.2 Metode Kerja.....	19
III.2.1 Penyiapan Sampel.....	19
III.2.1.1 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum.....	19
III.2.1.2 Pembuatan Larutan Baku zerumbon.....	20
III.2.2 Validasi Metode Penetapan Kadar Zerumbon.....	20
III.2.2.1 Keterulangan.....	20
III.2.2.2 Linieritas.....	21
III.2.2.3 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	21
III.2.2.4 Ketelitian (Presisi).....	22
III.2.2.5 Pengukuran Kadar Zerumbon.....	23
III.3 Pengumpulan Data dan Analisis Data.....	23
III.4 Pembahasan dan Hasil Penelitian.....	23
III.5 Pengambilan Kesimpulan.....	23
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	24
IV.1 Hasil Penelitian.....	24

IV.1.1 Hasil Penentuan Panjang Gelombang.....	24
IV.1.2 Validasi Metode Penetapan Kadar.....	25
IV.1.2.1 Hasil Uji Keterulangan.....	25
IV.1.2.2 Hasil Uji Linieritas.....	26
IV.1.2.3 Hasil Uji LOD dan LOQ.....	28
IV.1.2.4 Hasil Uji Ketelitian.....	28
IV.1.2.5 Hasil Pengukuran Kadar isolat Zerumbon.....	29
IV.2 Pembahasan.....	30
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	33
V.1 Kesimpulan.....	33
V.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34
LAMPIRAN.....	36

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil uji keterulangan (repeatability) luas area densitogram pembeding zerumbon.....	26
2. Hasil uji keterulangan (repeatability) luas area densitogram sampel isolat zerumbon.....	26
3. Hasil pengukuran kurva baku pembeding zerumbon	27
4. Hasil uji ketelitian (precision) metode densitometri penetapan kadar zerumbon konsentrasi terendah (0,4 µg/totolan).....	28
5. Hasil uji ketelitian (precision) metode densitometri penetapan kadar zerumbon konsentrasi tertinggi (1,6 µg/totolan)	29
6. Hasil uji ketelitian (precision) metode densitometri penetapan kadar zerumbon konsentrasi terendah (0,4 µg/totolan).....	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Gambar tanaman Lempuyang dan alat Densitometer dengan software yang mengontrol kerja dari TLC scanner	36
2. Skema Kerja Presisi	37
3. Skema kerja linieritas, LOD & LOQ	38
4. Skema kerja keterulangan	39
5. Perhitungan LOD & LOQ	40
6. Grafik Densitometri	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Struktur Zerumbon	8
2. Skema pemindaian spektrodensitometer dengan radiasi tunggal...	12
3. Panjang gelombang hasil scanning panjang gelombang noda zerumbon pembanding dengan konsentrasi 200 µg/mL	24
4. Panjang gelombang hasil <i>scanning</i> panjang gelombang noda sampel isolat zerumbon konsentrasi 200 µg/mL.....	25
5. Kurva baku zerumbon	27
6. Foto tanaman Lempuyang wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Vahl)	36
7. Alat densitometer dengan software yang mengontrol kerja dari TLC scanner	36
8. Grafik kurva baku zerumbon	42
9. Grafik presisi tertinggi	42
10. Grafik presisi terendah	43
11. Grafik keterulangan sampel isolat zerumbon	43
12. Grafik keterulangan pembanding zerumbon	44

BAB I

PENDAHULUAN

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional adalah Lempuyang Wangi (*Zingiber aromaticum* Vahl). Tanaman yang termasuk suku *Zingiberaceae* ini banyak ditanam pada pekarangan rumah sebagai obat (1). Salah satu bagian tanaman yang sering digunakan untuk obat adalah rimpang (1). Kandungan senyawa dalam Lempuyang wangi antara lain minyak atsiri (limonen) dan Zerumbon (1).

Zerumbon merupakan Sesquiterpenoid monosiklik yang dapat ditemukan banyak pada rimpang terutama dari Lempuyang Wangi (*Zingiber aromaticum* Vahl). dan tanaman Lempuyang Gajah (*Zingiber zerumbet* (L.) J. E. Smith.). Zerumbon memiliki rumus molekul $C_{15}H_{22}O$. Zerumbon merupakan salah satu bahan fitokimia yang berpotensi besar untuk penggunaan kemopreventif dan kemoterapi dalam melawan penyakit kanker (2).

Telah dilaporkan bahwa chiral Sesquiterpenoid Zerumbon, yang terdapat pada bagian ginger, memiliki kemampuan khas dan reaktif yang mana membuatnya mampu memulai untuk konversi suatu bahan menjadi senyawa yang berguna seperti paclitaxel (3).

Informasi mengenai metode penetapan kadar dalam penentuan kadar Zerumbon masih sangat minim. Beberapa diantaranya adalah

dengan menggunakan MAE (Microwave-Assisted Extraction) pada rimpang Lempuyang Wangi. Dimana diperoleh hasil Zerumbon dari metode analisis menggunakan Kromatografi Gas dan Spektrofotometer Massa adalah 17,2 %. Kemudian juga diperlukan suatu tindakan pembuktian dengan cara yang sesuai bahwa tiap bahan, proses, prosedur, kegiatan, sistem, perlengkapan, atau mekanisme yang digunakan dalam produksi dan pengawasan akan senantiasa mencapai hasil yang diinginkan secara terus menerus (konsisten).(3,4)

Salah satu metode analisis yang dapat digunakan dalam penentuan kadar zerumbon adalah KLT (kromatografi Lapis Tipis) Densitometri. Metode ini dimanfaatkan untuk tujuan analisis kuantitatif dan kualitatif, selain itu metode ini memiliki kepekaan dan ketelitian yang tinggi, pengerjaan yang relatif sederhana dan cepat serta biaya yang relatif murah.

Densitometri merupakan metode analisis instrumen berdasarkan radiasi elektromagnetik dengan analit berupa noda pada KLT. Instrumen untuk scanning densitometri menggunakan pengukuran absorban atau fluoresensi dalam bentuk penerusan atau pantulan (5).

Suatu pengembangan metode analisis membutuhkan tahap validasi metode sebagai jaminan bahwa data yang dihasilkan adalah valid. Dalam penelitian ini dilakukan validasi metode densitometri untuk penetapan kadar zerumbon yang merupakan senyawa dari Lempuyang

wangi (*Zingiber aromaticum* Vahl), dengan menggunakan beberapa parameter untuk analisis kuantitatif berdasarkan ICH (*International Conference on Harmonization*) yaitu keterulangan, Linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, dan presisi.

Validasi metode analisis merupakan proses yang dilakukan melalui penelitian laboratorium untuk membuktikan, bahwa karakteristik kinerja prosedur itu memenuhi persyaratan aplikasi analitik yang dimaksudkan. Dengan menggunakan sampel yang telah diketahui (atau setidaknya telah diketahui sebelumnya) nilai parameter suatu produk, validasi dapat memberikan informasi yang berguna mengenai presisi, linieritas, dan karakteristik lainnya dari kinerja suatu metode yang sehari-hari digunakan pada sampel yang tidak diketahui. Sebagai tambahan, validasi dapat digunakan untuk mengidentifikasi sumber variabilitas yang tidak diinginkan.(6)

Berdasarkan uraian tersebut diatas, maka timbul permasalahan apakah metode Densitometri dapat memenuhi persyaratan validitas untuk digunakan sebagai metode analisis penetapan kadar Zerumbon yang diperoleh dari tanaman lempuyang wangi.

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah melakukan validasi terhadap metode pada penentuan kadar zerumbon yang diperoleh pada rimpang Lempuyang Wangi dengan menentukan nilai dari beberapa parameter validasi seperti Keterulangan, Linieritas, Batas Deteksi, Batas Kuantitasi,

dan Presisi menggunakan alat Densitometer. Manfaat penelitian ini adalah menghasilkan *standard operation procedure* (SOP) yang kemudian dapat menentukan kadar zerumbon yang diperoleh dari rimpang Lempuyang wangi.

Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai salah satu metode yang valid dalam penentuan kadar zerumbon yang diperoleh dari tanaman rimpang Lempuyang wangi sehingga dapat memudahkan pihak lain dalam melakukan proses identifikasi tanaman khususnya dalam standardisasi dan identifikasi simplisia atau bahan baku obat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman Lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* Vahl)

II.1.1 Klasifikasi

Dunia	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Bangsa	: Zingiberales
Suku	: Zingiberaceae
Marga	: Zingiber
Jenis	: <i>Zingiber aromaticum</i> vahl (7)

II.1.2 Nama Daerah

Sumatera	: Lampuyang
Jakarta	: Lempuyang wangi
Sunda	: Lampuyang rum, Lampuyang wangi
Jawa	: Lempuyang rum, Lempuyang room
Madura	: Lempojang room
Bugis	: Lampujang mawangi (7)

II.1.3 Morfologi Tumbuhan

Lempuyang wangi memiliki batang semu, berupa kumpulan pelepah daun yang berseling, terletak diatas tanah, beberapa batang

berkoloni, berwarna hijau, tinggi lebih kurang 1 m. Daun tunggal, berbentuk lanset, panjang 14-40 cm, lebar 3-8,5 cm, bagian pangkal bundar atau tajam, sangat tajam atau runcing, berpelelah, letak berseling, pelelah membentuk batang semu dan permukaan daun bagian atas berambut; tangkai daun berambut, panjang 4-5 mm; daun berlidah tegak, berselaput, berambut, panjang lidah 1,5-3 cm. Bunga majemuk, berbentuk bulat telur, muncul diatas tanah, tegak dan berambut halus. Rimpang merayap dan memiliki bau aromatik (7,8).

II.1.4 Kandungan Kimia

Lempuyang Wangi kaya kandungan kimia, antara lain : zerumbone, limonen, minyak atsiri, resin, pati, saponin, flavonoid, tannin, dan gula. Komposisi kimia utama lempuyang diantaranya adalah sesquiterpenoid (zerumbon) dan flavonol glycosides (kaempferol) (8).

II.2 Uraian Tentang Zerumbon

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 Isopren $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ 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 :

hemiterpen (C5), monoterpen (C10), sesquiterpen (C15), diterpen (C20), sesterpen (C25) dan triterpen (C30) (9,10)

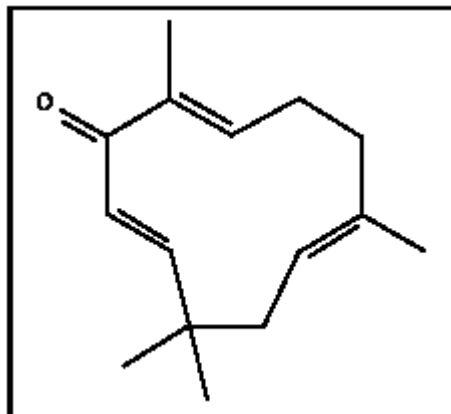
II.2.2 Sesquiterpenoid

Sesquiterpenoid adalah senyawa C15, biasanya dianggap berasal dari tiga satuan isopren. Seperti Monoterpenoid, Sesquiterpenoid terdapat sebagai komponen minyak atsiri yang tersuling uap, dan berperan penting dalam memberi aroma kepada buah dan bunga yang kita kenal (11).

II.2.3 Zerumbon

Zerumbon adalah komponen utama dari minyak essential yang terdapat pada rimpang lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* Val.). merupakan sesquiterpen monosiklik tidak biasa yang mempunyai system lintasan konjugasi dienone. Banyak dari para ilmuwan kimia yang menyelidiki golongannya untuk memanfaatkan ketersediaan dari senyawa ini sebagai bahan serbaguna untuk memulai perubahan menjadi bahan yang berguna. Telah dilaporkan bahwa chiral Sesquiterpenoid Zerumbon, yang terdapat pada bagian Ginger, memiliki kemampuan khas dan reaktif yang mana membuatnya mampu memulai untuk konversi suatu bahan menjadi senyawa yang berguna. (12)

Zerumbon memiliki rumus molekul $C_{15}H_{22}O$, serta titik didih $321^{\circ}C$ - $322^{\circ}C$. sinonim dari Zerumbon berdasarkan data IUPAC adalah 2,6,9,9-tetrametilsikloundeka-2,6,10-trien-1-on. (12)



Gambar 1. Struktur Zerumbon (C₁₅H₂₂O). (12)

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. Sementara itu menurut ISO/IEC:17025 (2005), validasi metode analisis ditujukan untuk menjamin bahwa metode analisis memenuhi spesifikasi yang dapat diterima sesuai dengan tujuan yang diharapkan.(13)

Tujuan akhir validai metode adalah untuk menjamin bahwa tiap pengukuran di masa yang akan datang dalam suatu analisis rutin harus cukup dekat dengan nilai kandungan analit sebenarnya, yang terkandung dalam suatu sampel. Dengan demikian, tujuan suatu metode analisis adalah tidak hanya disederhanakan dengan menentukan estimasi kebenaran (nilai sebebnarnya) atau bias dan presisi, akan tetapi juga

mengevaluasi resiko-resiko yang dapat diekspresikan dengan ketidakpastian pengukuran yang terkait dengan hasil analisis.(13)

Menurut ICH (1996), suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis, karenanya suatu metode harus divalidasi, ketika:

- (1) Metode baru dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu.
- (2) Metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karena munculnya suatu problem yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi.
- (3) Adanya data hasil penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu
- (4) Metode baku digunakan dilaboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analisis berbeda, atau dikerjakan dengan alat yang berbeda,
- (5) Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku.(13)

II.4 Densitometri

Densitometri merupakan metode analisis instrumental pengukuran konsentrasi zona kromatografi pada lapisan KLT/HPTLC tanpa merusak senyawa-senyawa yang telah terpisah. Meskipun pada awalnya instrumen ini berdiri sendiri, namun sekarang telah terintegrasikan dengan komputer

yang mengontrol instrumen ini sehingga membuat instrumen ini makin reproduktif dan akurat (standar deviasi ~1%).

Prinsip dasar dari teknik densitometri ini adalah radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang yang telah ditetapkan (biasanya, UV/Visible dari panjang gelombang 190 – 800 nm) yang bergerak sepanjang zona kromatografi yang sebelumnya telah ditentukan atau sementara radiasi dilakukan lapisan KLT/HPTLC digerakkan oleh motor yang mengatur gerakan lempeng.

Untuk alasan ini, teknik pemindaian lempeng pada kondisi ini disebut spektrodensitometri. Proses pemindaian atau *scanning* relatif cepat (hingga kecepatan 100 mm/detik) dengan dengan resolusi spasial pertahapnya 25 – 200 mm. Instrumen ini dapat diprogram lebih dahulu secara otomatis untuk memindai semua trek pada lempeng KLT dan dapat diprogram untuk memindai di berbagai panjang gelombang yang diinginkan.(14)

Trek yang dipindai akan ditampilkan sebagai kromatogram-kromatogram yang menyerupai profil kromatogram pada HPLC, normalnya ditampilkan dalam beberapa seri puncak dengan resolusi dasar tiap-tiap zona yang terpisah secara baik. Spektra UV/visible dapat terekam pada kecepatan tinggi, disimpan dan dibandingkan dengan data spektra yang telah ada untuk diidentifikasi. Kemurnian zona kromatografi juga dapat dicek melalui permulaan, ujung dan akhir dari puncak

kromatogram. Jika spektra-spektra yang diperoleh identik maka puncak yang ada dapat dianggap memiliki kemurnian yang tinggi.

Spektrodensitometer mampu mengukur reflektansi, fluoresensi yang dipadamkan ataupun fluoresensi yang telah diinduksi oleh radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang yang lebih pendek. Dari ketiga teknik pengukuran yang digunakan, reflektansi jauh lebih sering digunakan. Namun untuk senyawa-senyawa yang berfluoresensi atau senyawa yang dapat diinduksi dengan perlakuan kimia sehingga berfluoresensi memiliki sensitivitas deteksi yang jauh lebih besar (kadang-kadang sebesar 10 atau 100 kali). Untuk mencapai fleksibilitas pengukuran digunakan tiga jenis sumber cahaya, lampu deuterium (190 – 400 nm), lampu tungsten (350 – 800 nm), dan lampu merkuri bertekanan tinggi untuk spektrum garis yang intens (254 – 578 nm). Lampu yang terakhir adalah lampu yang digunakan untuk menentukan fluoresensi. (14)

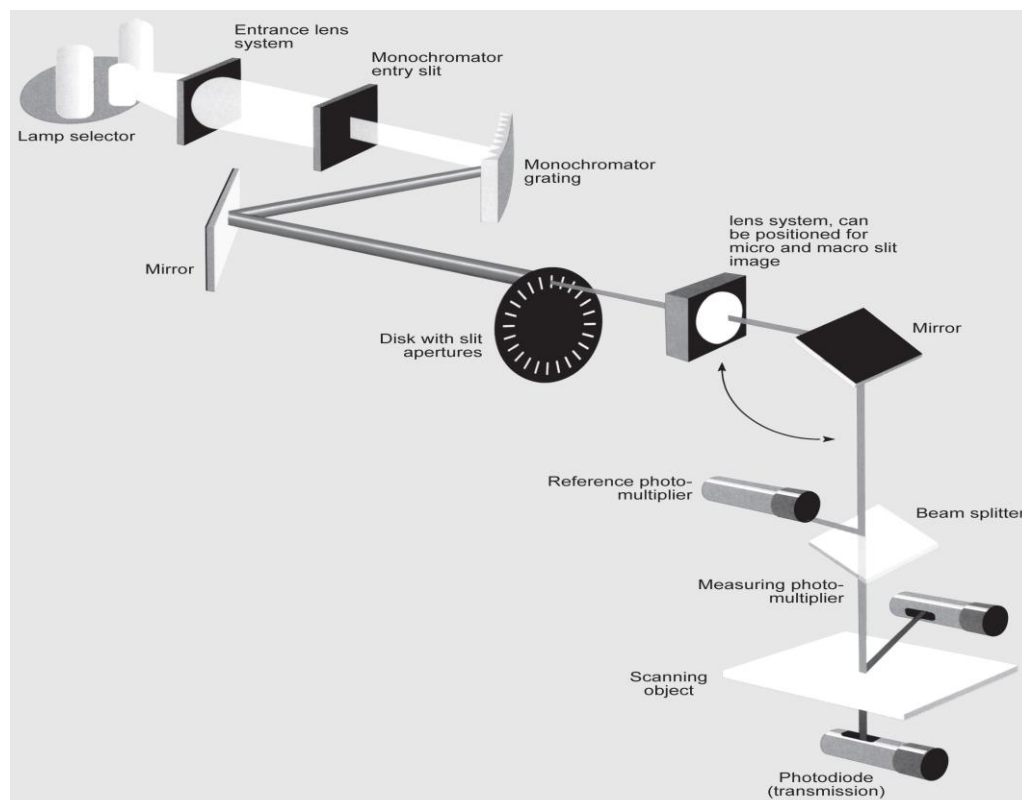
II.4.1 Mode Operasi Spektrodensitometer

Ada tiga kemungkinan mode pemindaian yang dapat digunakan pada spektrodensitometer yaitu, radiasi tunggal, panjang gelombang tunggal, radiasi ganda menggunakan *splitter* radiasi, dan panjang gelombang dual, yaitu radiasi ganda yang dikombinasikan ke dalam radiasi tunggal.

Format radiasi tunggal tidak diragukan lagi sebagai skema yang paling populer, sebagaimana yang ditunjukkan pada Gambar 1. Radiasi elektromagnetik yang ditembakkan ke permukaan lempeng, ada yang

diteruskan (*transmitted radiation*) melewati lapisan lempeng dan ada juga dipantulkan kembali dari permukaan.

Reflektansi terjadi pada lapisan yang kabur. Radiasi yang dipantulkan ini dikuantifikasi dan ditampilkan oleh unit photomultiplier atau sel fotoelektrik yang terdapat pada instrumet. Ketika radiasi yang ditembakkan melwati zona kromatografi maka perbedaan dalam respon optik terjadi karena beberapa radiasi diserap dan karena itu lebih sedikit radiasi yang dipantulkan. Perbedaan ini adalah cara yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur substansi yang terdapat dalam zona kromatografi.(14)



Gambar 2. Skema pemindaian spektrodensitometer dengan radiasi tunggal. Sumber cahaya, lampu deuterium, mercury, halogen tungsten diposisikan pada jalur cahaya oleh motor pengatur. Untuk reflektansi dideteksi oleh photomultiplier dengan posisi 30°. (10)

Sebagai contoh scanner spektrodensitometrik tersedia untuk kepentingan komersial ditunjukkan pada gambar 2. Sebagai proses pemindaian jalur-jalur yang terpisah dan panjang gelombang yang menghasilkan sejumlah besar data, pengaturan dan manipulasi hasil oleh komputer menjadi hal yang dianggap sangat penting. Data yang diperoleh mencakup tinggi puncak, luas daerah dan posisi dari zona awal. Gambar 1. Secara skematik menunjukkan cara kerja pemindaian spektrodensitometer menggunakan radiasi tunggal. Sumber cahaya lampu deuterium, merkuri atau halogen tungsten diposisikan dalam jalur untuk lewatnya cahaya oleh motor penggerak yang mengatur posisi dari cahaya yang akan melewati celah. Untuk pemindaian reflektansi, fotomultiplier diposisikan pada sudut 30° dari posisi normal.

Beberapa pelat KLT/HPTLC akan memberikan beberapa nilai reflektansi, namun hal ini dapat diukur dan dikontrol melalui perangkat lunak dan nilai tersebut akan dihilangkan dari kromatogram. Penyesuaian dilakukan pada dasar dari puncak-puncak kromatogram yang terbentuk, sehingga semua puncak dapat diintegrasikan secara akurat sehingga dapat dilakukan kuantifikasi.

Sebagian besar kromatogram yang diperoleh merupakan hasil dari elusi menaik dari dasar lempeng hingga ke batas akhir elusi sehingga memberikan hasil kromatogram yang linier meskipun alat spektrodensitometer ini mampu memindai secara radial. Penggunaan mikropipet dan jarum suntik dapat diganti dengan aplikator sampel yang

lebih akurat dalam segi konsentrasi di sepanjang zona KLT yang ditotolkan hal ini sangat penting untuk keakuratan hasil kuantitatif (14).

II.4.2 Teori Densitometri

Pada spektrofotometri terdapat hubungan langsung antara absorbansi dan konsentrasi dari analit dalam larutan (Hukum Beer). Absorbansi merupakan hasil dari radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang tertentu yang diserap oleh larutan sampel. Radiasi yang diserap oleh larutan yang secara langsung menunjukkan konsentrasi dari sampel (15).

KLT – densitometri adalah metode analisis instrumental yang berdasarkan pengukuran interaksi REM (Radiasi Elektro Magnetik) dengan noda kromatogram pada lempeng KLT. Pada KLT – Densitometri yang diukur adalah intensitas REM setelah diteraksikan dengan noda analit sebagai :

- a) Absorpsi relatif (*Absorbance unit = AU*) atau % Transmisi relatif (*Transmittance = %T*).
- b) Refleksi (R) dengan rentang lebar penentuan panjang gelombang lebih lebar.
- c) Intensitas flouresensi (*Flouresence Intensity*) atau pemadaman flouresensi (*Quenching Flouresence*).

Yang perlu diperhatikan pada metode KLT – Densitometri adalah adanya radiasi hamburan (*Scattering Radiation*) yang disebabkan oleh partikel atau butiran fase diam dari radiasi hamburan ini akan memberikan

korelasi garis lengkung yang merupakan hubungan antara tanggap detektor (terukur sebagai $A = \text{area}$) terhadap kadar analit pada noda kromatogram yang ditentukan. Kalau dibandingkan dengan spektrofotometer UV – Vis kelihatannya kurva korelasi pada KLT – Densitometri mengikuti penyimpangan negatif terhadap hukum Lambert – Beer. Persamaan kurva korelasi pada KLT – Densitometri antara area terhadap kadar analit merupakan kurva garis lengkung mendekati parabola yang dinyatakan dengan hukum Kubelka – Munk yang dinyatakan dengan persamaan:

$$(1 - R)^2 / 2R = \epsilon \cdot C / S$$

dimana S adalah faktor hamburan dan ϵ absorptansi molar dan R adalah intensitas refleksi dari REM. Dari persamaan Kubelka – Munk tersebut di atas didapat hubungan antara A (area) noda kromatogram analit terhadap konsentrasi / kadar analit pada noda kromatogram yang dinyatakan sebagai: $A^2 = f(C)$

selanjutnya dinyatakan $A = -\log R / R_0$, dimana R_0 adalah reflektan REM terhadap fase diam tanpa noda sedangkan R adalah reflektan noda analit (kromatogram) (15)

II.4.3 Cara Pengukuran dengan Densitometri

Pengukuran kromatografi lapis tipis dapat dilakukan dengan cara melewatkan kromatogram pada densitometer atau TLC Scanner, dimana ukuran relatif dan kerapatan bercak dapat diukur. Data yang diperoleh dari densitometer diplot pada kertas pencatat. Luas kurva pada kertas

pencatat sebanding dengan jumlah zat yang terdapat pada bercak yang diukur tersebut (16).

a. Sistem optik

Pengukuran dengan densitometer pada prinsipnya dilakukan secara pantulan (reflektans), transmisi (transmitans), atau fluoresensi.

1. Cara Pantulan, yaitu pada cara ini yang diukur adalah sinar yang dipantulkan oleh bercak bahan dan bercak pembanding.
2. Cara Transmisi, yaitu dilakukan dengan menyinari bercak dari satu sisi dan mengukur sinar lain yang diteruskan pada sisi lain, dalam hal ini hanya dapat digunakan pada metode sinar tampak, pengukurannya dengan cara membandingkan transmittan sinar tampak yang melewati bercak zat dan bercak pembanding. Cara ini hanya untuk bercak yang berwarna atau yang diwarnai, lapisan tipis dibuat pada lempeng kaca yang dapat tembus cahaya.
3. Cara fluoresensi, yaitu pengukuran serapan fluoresensi sinar yang dipantulkan oleh bercak bahan dan bercak pembanding (khusus untuk bahan yang berfluoresensi). Hasil pengukuran dari detektor diteruskan pada alat pencatat, sehingga didapat hasil berupa puncak-puncak. Luas puncak bercak bahan dan bercak pembanding yang tercatat dibandingkan.

Rancangan peralatan densitometer pertama kali digambarkan oleh latner dan kawan-kawan.

a. Beberapa hal yang perlu diperhatikan pada penggunaan instrumen ini adalah :

1. Sumber cahaya yang digunakan adalah lampu dengan sumber radiasi yang stabil
2. Instrumen dapat dioperasikan untuk pengukuran contoh dan baku pembanding secara bersamaan (double beam)
3. Secara paralel sinar dapat dipusatkan sesuai diameter sudut peristiwa yaitu 90°
4. Detektor yang digunakan adalah fotomultiplier yang sangat sensitif
5. Pengukuran OD secara langsung adalah dicapai dengan rekomendasi pada suatu OD wedge.
6. Pengukuran refleksi cahaya yang disebar pada sudut 45° dilakukan setelah cahaya dilewatkan melalui cermin menuju fotomultiplier
7. Pengukuran transmisi dipisahkan oleh fotomultiplier pada berbagai situasi contoh yang digunakan. Cahaya yang disebar tidak dapat diterima lagi.

b. Langkah-langkah pengukuran kadar pada metode densitometri

1. Penyiapan contoh

Penyiapan contoh dilakukan dengan cara penimbangan seksama contoh, kemudian dilarutkan dengan pelarut yang sesuai sampai volume tertentu.

2. Penyiapan baku pembanding

Penyiapan baku pembanding dilakukan dengan cara penimbangan baku dengan seksama, dilarutkan dalam labu takar dengan volume tertentu, kemudian diencerkan sampai variasi kadar antara 5 – 100 mikrogram.

3. Pengembangan

Sebelum dilakukan pengembangan terlebih dahulu larutkan contoh dan baku pembanding ditotolkan pada suatu lempeng yang sama secara kuantitatif dengan menggunakan mikropipet atau microsyringe. Lempeng yang digunakan sebagai pendukung terbuat dari kaca, ukuran 20 x 20 cm yang dilapisi dengan silika gel GF 254 dengan ketebalan 250 mikrometer . selanjutnya lempeng dikembangkan dengan sistem pelarut yang sesuai.

4. Pengukuran kadar secara langsung pada kromatogram

Kromatogram yang diperoleh diamati dibawah sinar ultraviolet, dan ditandai dengan menggunakan pensil 2 B, setelah itu kromatogram dimasukkan pada alat densitometer untuk menentukan panjang gelombang maksimum dan serapan maksimum dari bercak contoh dan baku pembanding (16).

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan yang Digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah chamber (camag) corong pisah, labu Erlenmeyer (pyrex) 25,50 mL, gelas ukur 10,100 mL, labu tentukur (pyrex) 5,10,50,100 mL, lampu UV 254nm dan 366nm, mikropipet (Memmert) 0,1-10 μ L, neraca analitik (Sartorius), Densitometri (Camag TLC Scanner 3). dan WinCATS[®] Software.

Bahan-bahan yang digunakan adalah air suling, etil asetat, lempeng KLT G-60 F₂₅₄ (Merck Index), metanol p.a, sampel isolat zerumbon yang diperoleh dari rimpang Lempuyang wangi (*Zingiber Aromaticum* Vahl), dan Zerumbon pembanding yang diperoleh dari laboratorium biofarmaka.

III.2 Metode Kerja

III.2.1 Penyiapan Sampel

Sampel isolat zerumbon yang digunakan diperoleh dari hasil isolasi zerumbon dari tanaman Lempuyang wangi menggunakan alat KCV (Kromatografi Cair Vakum)

III.2.1.1 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum zerumbon pada metode densitometri dilakukan dengan cara scanning kromatogram larutan baku zerumbon. Sampel isolat zerumbon dan zerumbon pembanding ditimbang