

HPLC FINGERPRINT ANALYSIS EKSTRAK DAN PRODUK RIMPANG TEMU PUTIH (*Curcuma zedoaria* (Christin) Roscoe)

Ana Kholifatunnisa Khaqqul Qirom¹, Lia Marliani¹, R.Herni Kusriani¹

¹Sekolah Tinggi Farmasi Bandung

Email: anakholifatunnisa@gmail.com

Abstrak

Rimpang temu putih telah banyak digunakan untuk pengobatan di Indonesia salah satunya adalah untuk mencegah dan mengobati kanker. Metode untuk menjamin kualitas sediaan herbal salah satunya adalah *Chromatography fingerprint analysis* dengan KCKT. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui profil kromatografi fingerprint dari ekstrak rimpang temu putih sehingga dapat digunakan untuk mengetahui kualitas mutu produk rimpang temu putih. Rimpang temu putih diperoleh dari tiga daerah berbeda yaitu Subang, Sumedang, dan Lembang. Ekstraksi dilakukan dengan metoda reflux menggunakan pelarut etanol 96%. Analisa sidik jari kromatografi menggunakan KCKT, dengan elusi gradien (asam asetat : asetonitril), menggunakan detektor UV/VIS pada λ 425 nm. Analisis kromatogram secara kemometrik menggunakan *Principal Component Analysis* (PCA) dengan menentukan nilai *loadings* dan *scores*. Pada kromatogram ekstrak rimpang temu putih dari ketiga daerah menunjukkan adanya kemiripan *peak* dan memiliki karakteristik yang sama yang dibuktikan dari nilai *scores* ekstrak dari ketiga daerah berada pada kuadran yang sama. Sedangkan nilai *scores* produk temu putih P1 berada pada kuadran yang berbeda hal tersebut menunjukkan bahwa P1 bukan ekstrak temu putih. Sedangkan hasil *loadings* waktu retensi dari sampel ekstrak rimpang temu putih yang dapat digunakan sebagai fingerprint yaitu pada menit ke 1,5; 2,5; 3,2; 6,6; 7,6; dan 10,4.

Kata kunci: Temu Putih (*Curcuma zedoaria*), Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), Kemometrik, *Principal Component Analysis* (PCA).

ANALYSIS CHROMATOGRAPHY FINGERPRINT EXTRACTS AND PRODUCT OF *Curcuma zedoaria* (Christin) Roscoe WITH HPLC

Ana Kholifatunnisa Khaqqul Qirom¹, Lia Marliani¹, R.Herni Kusriani¹

¹Sekolah Tinggi Farmasi Bandung

ABSTRACT

Curcuma zedoaria are widely used in herbal medicine in Indonesia for therapy and preventive medicine of cancer. The method to ensure the quality of *curcuma zedoaria* extracts is chromatographic fingerprint analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). This study was conducted to determine the profile of chromatographic fingerprint of *Curcuma zedoaria* extract so it can be used to determine the quality of *Curcuma zedoaria*. *Curcuma zedoaria* obtained from three different regions, namely Subang, Sumedang, and Lembang. Extraction was done by reflux method using ethanol 96%. Analysis fingerprint by HPLC with gradient elution (acetic acid: acetonitrile), and detected with UV / VIS at λ 425 nm. Analysis of the chromatogram with Chemometric using *Principal Component Analysis* (PCA) to determine the value of *loadings* and *scores*. In the chromatogram of rhizome extract from three regions showed a similarity peak and have the same characteristics which proved that value scores extract from the three regions were in the same quadrant. While the value of the product scores P1 were in different quadrants, it shows that P1 is not extract from *Curcuma zedoaria*. The *loadings* value, heading of the retention time of the *Curcuma zedoaria* extract that can be used as a fingerprint were on to 1.5; 2.5; 3.2; 6.6; 7.6; and 10.4 minutes.

Keyword: *Curcuma zedoaria*, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Chemometrics, *Principal Component Analysis* (PCA).

PENDAHULUAN

Chromatography fingerprint analysis merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk identifikasi, penetapan kadar, menyatakan informasi kimia dari produk botani. Penggunaan metoda *Chromatography fingerprint analysis* potensial untuk karakterisasi komponen marker dari bahan herbal dan senyawa kompleks yang belum diketahui aktivitas biologisnya. *Food and Drugs Administration* (FDA), *European Medicines Agency* (EMA) dan *State Food and Drugs* menyarankan bahwa produk herbal sebelum digunakan harus terstandarisasi dengan menggunakan *Chromatography fingerprint* (Xiaoye He, 2015).

Suatu ekstrak dapat diidentifikasi secara *Chromatography fingerprint* menggunakan KCKT sehingga dapat diketahui puncak spesifik kandungan kimia suatu ekstrak. Data yang didapat pada pengujian ekstrak dengan KCKT yaitu profil kromatogram, waktu retensi, dan luas area. Fingerprint dapat dibandingkan dengan ekstrak standar untuk membuktikan keaslian dan identifikasi untuk kontrol kualitas sediaan herbal. Teknologi ini dapat digunakan untuk uji kepalsuan sediaan herbal karena *Chromatography fingerprint* dapat digunakan sebagai profil kemurnian dari sediaan herbal. Selain itu *Chromatografi fingerprint analysis* dapat digunakan untuk membedakan spesies yang berbeda dari keluarga yang sama (Dejaegher, B, 2010).

Curcuma zedoaria termasuk kedalam keluarga *zingiberaceae* yang secara tradisional telah banyak digunakan sebagai pengobatan diantaranya untuk obat nyeri haid, dispepsia, mual muntah, karminativ, ekspektoran, dan diuretik. Berdasarkan hasil penelitian ekstrak etanol rimpang temu putih memiliki aktifitas hepatoprotektif, serta kandungan kurkuminoid yang merupakan senyawa marker pada rimpang temu putih berkhasiat sebagai anti kanker (Pramasivam. M, 2008).

Pada penelitian ini ekstrak rimpang temu putih diperoleh dari tiga daerah yang berbeda diantaranya daerah Subang, Sumedang, dan Lembang. Ekstrak yang diperoleh dari ketiga daerah tersebut dianalisis dengan KCKT kemudian data yang didapat diidentifikasi dan dianalisis secara kemometrik. Kemometrik merupakan suatu disiplin ilmu kimia yang menggunakan metoda matematika dan statistika yang digunakan untuk memilih desain analisis atau untuk memilih prosedur dan hasil eksperimen yang paling baik serta untuk memberikan informasi yang relevan menggunakan *Analyzing Chemical Data* (Otto, 2007).

Untuk memudahkan dalam interpretasi data dengan kemometrik menggunakan software komputer sehingga didapat hasil analisis yang tepat, mudah dan cepat. Software yang digunakan untuk analisis data kemometrik ini adalah *Unscrambler 10.3*. Pada percobaan *Chromatography fingerprint analysis* ini sampel rimpang temu putih diperoleh dari tiga daerah berbeda, untuk mengetahui adanya kesamaan (*similarity*) karakteristik ekstrak dari tiga tempat tumbuh yang berbedadan maka metoda *Principal Component Analysis* (PCA) dapat digunakan untuk analisis (Yi-Zeng Liang, 2010).

PCA merupakan interpretasi data yang dilakukan dengan pereduksi data, dimana jumlah variabel dalam suatu matriks dikurangi untuk menghasilkan variabel baru dengan tetap mempertahankan informasi yang dimiliki oleh data. Variabel baru yang dihasilkan berupa skor atau komponen utama (Rohman., 2012).

METODE PENELITIAN

Bahan

Etanol 96% (teknis), dikolorometan (Pro Analysis), metanol (Pro Analysis), asam asetat anhidrid (Pro

Analysis), metanol (HPLC grade), acetonitril (HPLC grade), aqua bidestillata, etanol 96% (Pro Analisis), standar kurkuminoid (Curcumin for Synthesis dari Merck KgaA, 64271 Darmstadt Germany).

Alat dan Kondisi Kromatografi

Alat reflux, rotary evaporator, silika gel GF 254, sonikator, membran filter 0,45 µl, alat KCKT (Shimadzu), kolom C18 (150 x 3,90 mm; 10 micron; Phenomenex), running time 20 menit, laju alir 1 ml/menit, volume injeksi 10 µl, detektor UV/VIS λ425 nm, fase gerak 0,25% asam asetat dan asetonitril, elusi gradien yaitu: 0-5 menit (50-50%), 6-10 menit (40-60%), 11-20 menit (50-50%). Total running time 20 menit dan laju alir 0,8 ml/menit, volume injeksi 10 µl, panjang gelombang UV 425 nm., larutan fase gerak dibuat segar sebelum digunakan yang telah disaring dengan penyaring membran dan disonikator.

Preparasi Sampel

Sampel rimpang temu putih diperoleh dari tiga daerah berbeda yaitu daerah Manoko (Lembang), daerah Congeang (Sumedang), dan Sagala Herang (Subang). Rimpang segar yang diperoleh dibuat simplisia (sortasi basah, dirajang, dikeringkan, sortasi kering, dihaluskan), simplisia kering diekstraksi menggunakan metode reflux dengan etanol 96%, filtrat yang didapat kemudian dipekatkan. Ekstrak pekat yang diperoleh dilakukan penapisan ekstrak, standardisasi ekstrak meliputi parameter nonspesifik (kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, susut pengeringan, BJ, dan kadar air) dan parameter spesifik (identitas ekstrak, pemantauan KLT, senyawa terlarut dalam air dan etanol). Pada analisis *Chromatography fingerprint* 10 mg ekstrak kental dan sampel masing-masing

dilarutkan dalam 10 ml etanol 96% (PA), kemudian disaring menggunakan membran filter 0,45µl, lalu disonikator untuk kemudian di injeksikan.

Metode Validasi *Chromatography fingerprint analysis*

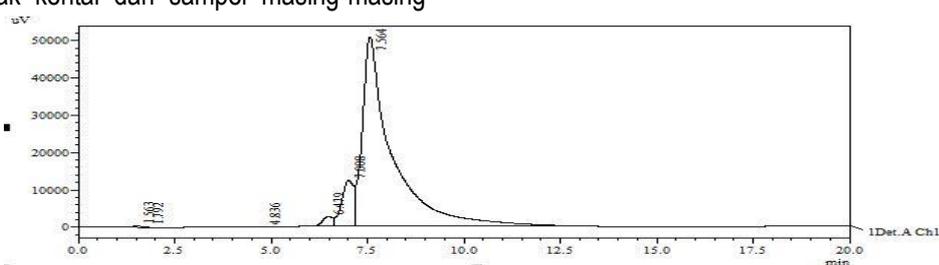
Metode validasi *Chromatography fingerprint analysis* meliputi uji stabilitas dan *repeatability*. Untuk uji stabilitas ditimbang 10 mg ekstrak kental kemudian dilarutkan dengan 10 ml etanol 96% (PA) Pengujian dilakukan pada menit ke 0, 24, dan 48 jam. Untuk uji *repeatability* dibuat tiga larutan dengan konsentrasi yang sama yaitu 10 mg ekstrak yang dilarutkan dalam 10 ml etanol 96 %.

Analisis Kemometrik dengan PCA

Untuk memudahkan dalam analisis kemometrik maka menggunakan software *Unscrambler 10.3*. Data yang didapat dari analisis menggunakan KCKT adalah waktu retensi dan area. Pengujian kemometrik menggunakan *Principal Component Analysis* (PCA) dengan kategori variabel yang digunakan adalah perbedaan tempat tumbuh (daerah) serta variabel set yang digunakan adalah *repeatability* dan *stability*. Hasil dari analisis PCA ini berupa *scores*, dan *loading*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak rimpang temu putih yang diperoleh dari tiga daerah yaitu Subang, Sumedang dan Lembang kemudian dilakukan analisis *Chromatography fingerprint* menggunakan KCKT. Langkah pertama yang dilakukan yaitu optimasi kondisi kromatografi untuk mendapatkan sistem kromatogram yang baik. Hasil optimasi dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 1: Profil Kromatogram Uji Kesesuaian Sistem Standar Curcuminoid, kolom C18 (150 x 3,90 mm; 10 micron; Phenomenex), fase gerak 0,25% asam asetat dan asetonitril, elusi gradien yaitu: 0-5 menit (50-50%), 8-

15 menit (60-40%), 16-20 menit (50-50%). Total running time 20 menit dan laju alir 0,8 ml/menit, volume injeksi 10 µl, panjang gelombang UV 425 nm.

Setelah didapat sistem KCKT yang baik pengujian dilanjutkan dengan validasi *Chromatography fingerprint*. Hasil validasi berupa *repeatability* dan *stability* yang dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 1 Hasil *Repeatability* dari ketiga daerah

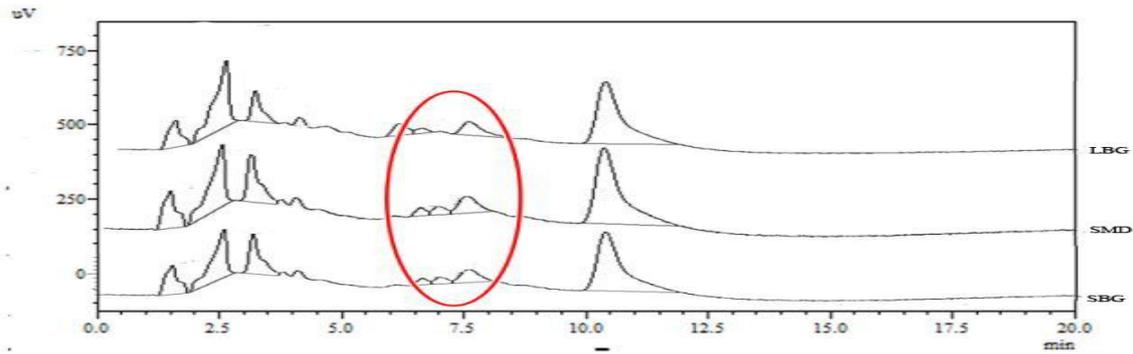
Peak	Daerah					
	Subang		Sumedang		Lembang	
	%RSD dari %RRT	%RSD dari %RPA	%RSD dari %RRT	%RSD dari %RPA	%RSD dari %RRT	%RSD dari %RPA
1	0,193	20,791	0,06	29,381	0,156	9,232
2	0,091	5,333	0,144	4,793	0,999	2,123
3	0,1	32,505	0,293	6,425	0,04	39,273
4	0,024	52,956	0,076	11,831	0,163	17,834
5	0,234	22,798	0,515	24,105	0,211	21,147
6	1,388	31,562	0,219	51,087	0,155	7,583
7	0,101	11,056	0,015	10,243	0,099	19,966

Tabel 2 Hasil Uji Stabilitas dari ketiga daerah

Peak	Daerah					
	Subang		Sumedang		Lembang	
	%RSD dari %RRT	%RSD dari %RPA	%RSD dari %RRT	%RSD dari %RPA	%RSD dari %RRT	%RSD dari %RPA
1	0,193	20,791	0,445	7,236	0,433	19,423
2	0,091	5,333	0,02	2,635	1,172	3,477
3	0,1	32,505	0,324	8,627	0,066	10,705
4	0,024	52,956	0,136	6,79	0,219	8,35
5	0,234	22,798	0,557	3,539	0,108	7,589
6	1,388	31,562	0,124	23,476	0,194	13,713
7	0,101	11,056	0,078	5,036	0,133	2,644

Hasil *repeatability* persen RSD dari nilai RRT ketiga daerah berada pada rentang 0,015-1,388 %. Sedangkan persen RSD dari nilai RPA ketiga daerah berada pada rentang 2,123- 52,956%. Sedangkan hasil uji stabilitas persen RSD dari nilai RRT dari ketiga daerah berada pada rentang 0,02-1,388 % dan RPA dari ketiga daerah berada pada rentang 2,635%- 52,956%. Hasil uji stabilitas tersebut menunjukkan bahwa sampel stabil selama

48 jam. Dari hasil uji *repeatability* dan stabilitas nilai persen RSD dari nilai RPA cenderung tinggi hal tersebut terjadi karena nilai peak area dari setiap senyawa berbeda yang disebabkan oleh perbedaan kandungan senyawa. Perbedaan kandungan senyawa dapat disebabkan dari perbedaan tempat tumbuh dan waktu panen simplisia. Sehingga untuk analisa kemometri menggunakan data persen RSD dari nilai RRT.

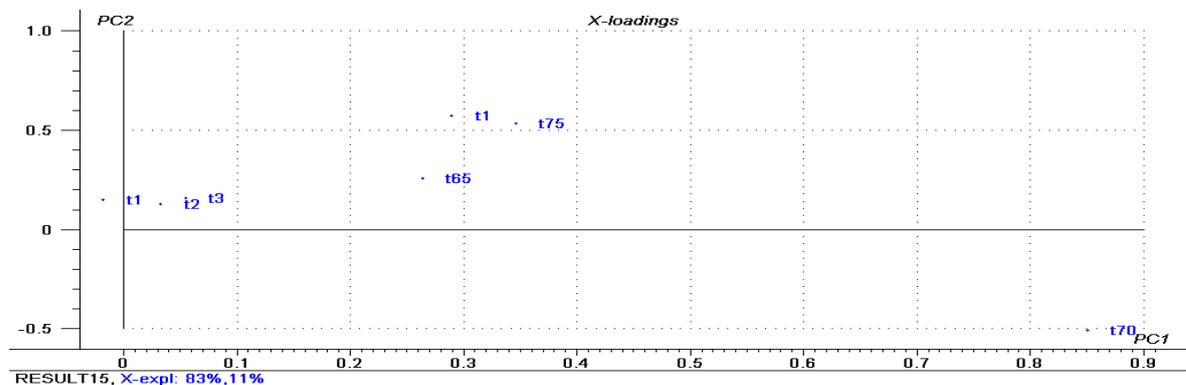


Gambar 2: Profil *Chromatography fingerprint* Ekstrak Rimpang Temu Putih dari tiga daerah (SMD = Sumedang, SBG= Subang, LBG=Lembang).

Dari hasil fingerprint diatas dapat dilihat bahwa perbandingan profiling dari ekstrak rimpang temu putih dari daerah Subang, Sumedang, dan Lembang menunjukkan persamaan waktu retensi dengan intensitas yang berbeda antar sampel ekstrak. Peak yang sering muncul dari masing-masing sampel ekstrak mempunyai kemiripan waktu retensi dengan kadar relatif yang berbeda. Kurkuminoid yang merupakan senyawa marker dari genus kurkuma meliputi bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin dan kurkumin berturut-turut muncul pada waktu retensi ke 6,5, 6,9, dan 7,5.

Analisis Data Kemometrik Menggunakan *Principal Component Analysis* (PCA)

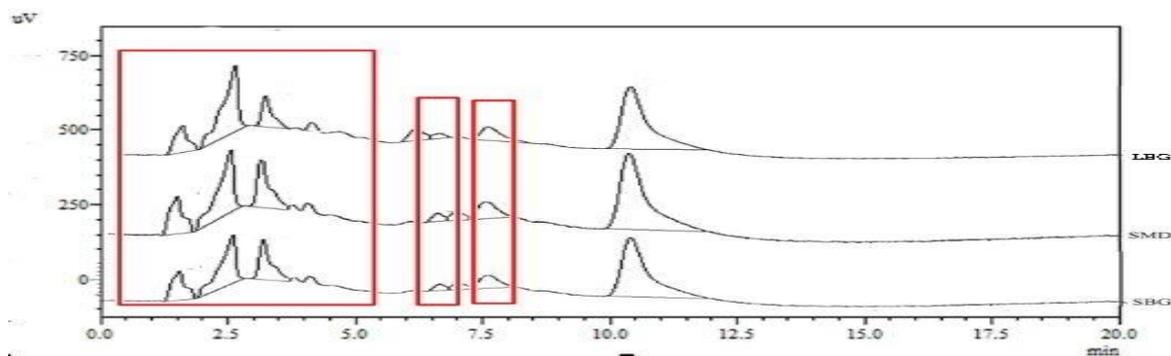
Hasil kromatogram selanjutnya dianalisis lebih lanjut menggunakan kemometri PCA (*Principal Component Analysis*) pada waktu retensi 1,5 menit sampai dengan waktu retensi 10 menit, untuk meminimalisir terjadinya kesalahan akibat jumlah data KCKT yang cukup banyak dan bervariasi. Hasil dari analisis PCA berupa *scores* dan *loading*.



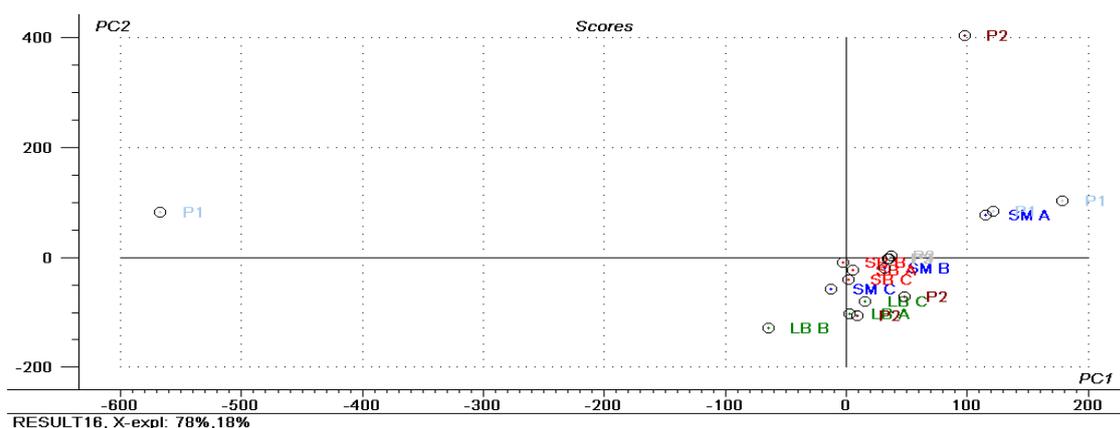
Gambar 3: *Loadings* PCA ekstrak rimpang temu putih dari tiga daerah

Nilai waktu retensi digambarkan sebagai titik biru yang tersebar disekitar garis tengah. Semakin titik biru berkumpul digaris tengah maka waktu retensi

tersebut yang selalu muncul dalam kromatogram dan dapat dijadikan ciri khas dari kromatogram ekstrak tersebut.



Gambar 4: Kromatogram khas pada rimpang temu putih



Gambar 5: Gabungan PCA ekstrak dari tiga daerah (SBG = Subang, SMD= Sumedang, LBG= Lembang) dengan sampel produk (P1= Temu Putih UD. Rachma Sari , P2= Zedoa Riplus CV. Herba Prima, P3= Curzema Herbaltama Persada).

Dari gambar diatas menunjukkan adanya pengelompokan antara ekstrak dari tiga daerah dengan produk rimpang temu putih. Ekstrak dari Subang, Sumedang, Lembang, P2, dan P3 berada pada kuadran yang sama hal ini menunjukkan adanya kesamaan karakteristik dari ekstrak. Sedangkan pada produk P1 berada pada kuadran yang berbeda hal ini menunjukkan bahwa P1 bukan ekstrak rimpang temu putih. Dan pada P2 pada *repeatability* ketiga (P2C) berbeda kuadran hal ini dikarenakan perbedaan waktu retensi yang disebabkan karena kurang ketelitian dalam preparasi sampel.

KESIMPULAN

Waktu retensi pada KCKT dari sampel ekstrak rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*) yang dapat digunakan sebagai fingerprint yaitu pada menit ke

1,5; 2,5; 3,2; 6,6; 7,6; dan 10,4. Dari analisis PCA dapat mengelompokkan ekstrak rimpang temu putih berdasarkan kesamaan karakteristik ekstrak dari data waktu retensi sehingga analisis *Chromatography fingerprint* dengan KCKT dan analisis menggunakan PCA mampu mengetahui kesamaan karakteristik ekstrak dari daerah yang berbeda. Hasil analisis PCA menunjukkan bahwa ekstrak dari Subang, Sumedang dan Lembang memiliki karakteristik yang sama. Serta sampel produk rimpang temu putih yang memiliki karakteristik yang sama dengan ekstrak yaitu produk P2 dan P3.

DAFTAR PUSTAKA

Dejaegher.B, A. M. (2010). Methodology to Develop Liquid Chromatographic Fingerprints for the Quality Control of Herbal Medicine. *Acta Chromatographica*, 237-258.

- Otto, M. (2007). *Chemometrics*. Weinheim: Wiley.
- Pramasivam, M, A. w. (2008). Occurrence of curcuminoids in *Curcuma longa* A quality standardization by HPLC. *Bangladesh J Pharmacol*, 3.
- Rohman., A. T. (2012). Differentiation of lard and other animal fats based on triacylglycerols composition and principal component analysis. *International Food Research Journal*, 475-479.
- Voigt, T. (1994). Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi V. In S. Noerono, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi V* (p. 564). Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press.
- Xiaoye He, J. L. (2015). Chemical fingerprint analysis for quality control and identification of Ziyang green tea by HPLC. *Elsevier*, 405-411.
- Yi-Zeng Liang, P.-S. X. (2010). Chromatographic Fingerprinting and Metabolomics for Quality Control of TCM. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, Vol 13, 943-953.