

## **Pengembangan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang Sederhana untuk Analisis Kurkumin dalam Plasma Manusia *In-Vitro***

### **(Development of Simple High Performance Liquid Chromatography for Analysis of Curcumin in Human Plasma *In-Vitro*)**

NOVI YANTIH\*, ENDAH GIYAH WAHYUNINGSIH, DENI RAHMAT, YUNAHARA FARIDA

Faculty of Pharmacy, University of Pancasila  
Jl. Srengseng Sawah Jagakarsa, Pasar Minggu, South Jakarta 12640.

Diterima 21 Februari 2019, Disetujui 22 Oktober 2020

**Abstrak:** Kurkumin memiliki efek antioksidan, antiinflamasi, antitumor, meningkatkan apoptosis, dan antiangiogenesis. Untuk mempelajari farmakokinetika kurkumin, diperlukan metode analisis kadar kurkumin dalam plasma. Tujuan dari penelitian ini adalah mengembangkan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang sederhana untuk analisis kurkumin dalam plasma manusia secara *in-vitro*. Sistem KCKT menggunakan teknik isokratik pada fase terbalik kolom C18 (kolom Reliant® RP-18e (4,6x250mm; 5 µm)) dan fase gerak asetoneitril-asam asetat-akuabides (60:1:39) pada laju alir 1,0 mL/menit. Irbesartan digunakan sebagai standar internal. Detektor dilakukan pada panjang gelombang 428 nm untuk kurkumin dan 270 nm untuk irbesartan. Uji linearitas menunjukkan hasil linear dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9970. Nilai LLOQ adalah 0,0196 µg/mL dengan nilai diferensiasi 10,48-18,09%. Akurasi dan presisi metode ini memenuhi persyaratan dengan nilai diferensiasi dan standar deviasi relatif masing-masing antara -5,51-3,04% dan 1,04-1,86%. *Recovery* metode ini adalah 94,74-103,12%. Metode ini memberikan selektivitas yang baik untuk analisis kurkumin dalam plasma manusia. Metode KCKT yang dikembangkan sederhana dan valid untuk analisis kurkumin dalam plasma manusia.

**Kata kunci:** kurkumin, irbesartan, KCKT, plasma manusia.

**Abstract:** Curcumin has antioxidant, antiinflammatory, antitumor, apoptotic-inducing, and antiangiogenesis effects. In order to study the pharmacokinetics of curcumin, a method for analysis of curcumin in plasma levels is required. The aim of this study was developing of a simple High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for analysis curcumin in human plasma *in-vitro*. The HPLC system was using isocratic technique in column reversed phase of C18 (Reliant® RP-18e column (4.6x250 mm; 5 µm)) and mobile phase of acetonitrile-acetic acid-aquabidest (60:1:39) at flow rate of 1.0 mL/min. Irbesartan was used as an internal standard. Detector was performed at a wavelength of 428 nm for curcumin and 270 nm for irbesartan. Linearity test shown linear results with a correlation coefficient (r) of 0.9970. LLOQ value was 0.0196 µg/mL with a differentiation value of 10.48-18.09%. The accuracy and precision of this method met requirement with a differentiation value and relative standard deviation of between -5.51-3.04 % and 1.04-1.86 %, respectively. Recovery of this method was 94.74-103.12%. This method provides good selectivity for the analysis curcumin in human plasma. The developed of HPLC was a simple and valid method for analysis curcumin in human plasma.

**Keywords:** curcumin, irbesartan, HPLC, human plasma.

---

\*Penulis korespondensi

Email: yantih.novi@univpancasila.ac.id

## PENDAHULUAN

RIMPANG kunyit (*Curcuma longa* L.) mengandung senyawa fenol berupa kurkuminoid yang terdiri dari kurkumin ( $\pm 77\%$ ), demetoksikurkumin ( $\pm 17\%$ ), dan bisdemetoksikurkumin ( $\pm 3\%$ ). Kurkumin adalah senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas terapeutik yang dihasilkan rimpang kunyit<sup>(1)</sup>. Kurkumin dilaporkan memiliki bioavailabilitas yang kurang baik. Kadar serum dan jaringan kurkumin yang lebih rendah dilihat dari adsorpsi, distribusi dan metabolisme cepat serta eliminasi adalah faktor utama yang membatasi bioavailabilitas kurkumin<sup>(2)</sup>.

Strategi utama yang sedang dieksplorasi dalam upaya meningkatkan bioavailabilitas kurkumin adalah modulasi rute dan media kurkumin, pemblokiran jalur metabolisme dan modifikasi struktural. Namun, strategi baru termasuk nanopartikel, liposom dan kompleks fosfolipid menawarkan hasil yang signifikan dan dapat dieksplorasi lebih lanjut dalam upaya meningkatkan bioavailabilitas, nilai obat dan aplikasi<sup>(3)</sup>. Dalam rangka studi bioavailabilitas kurkumin diperlukan metode analisis. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu teknis analisis obat yang ideal untuk analisis beragam obat dalam sediaan dan cairan biologis karena selektif, sederhana dan kepekaannya tinggi<sup>(4)</sup>.

Analisis dapat dilakukan apabila metode yang digunakan telah divalidasi. Validasi perlu dilakukan agar hasil analisis yang diperoleh terpercaya, cermat, handal dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kerjanya cukup mampu untuk mengatasi masalah analisis<sup>(5)</sup>. Validasi metode menurut *United States Pharmacopoeia* (USP) digunakan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduksibel, dan sesuai pada kisaran kadar analit yang akan dianalisis<sup>(5)</sup>. Metode analisis tersebut harus mengacu pada *European Medicine Agency* (EMA)<sup>(6)</sup> dan *Food and Drug Administration* (FDA)<sup>(7)</sup>.

Analisis kurkumin dalam plasma manusia secara KCKT dengan fase gerak asetonitril-metanol-akuabides-asam asetat (33:20:46:1) menggunakan baku internal etinil estradiol, irbesartan dan kalium losartan dengan laju alir 1,0 mL/menit didapatkan hasil LLOQ sebesar 20,60 ng/mL pada rentang konsentrasi 20,60-4120,00 ng/mL dalam waktu lebih dari 10 menit<sup>(8)</sup>. Penelitian analisis kurkuminoid dengan KCKT dengan fase gerak asetonitril-asam asetat-akuabides (50:1:49) diperoleh waktu retensi 14,01 menit pada laju alir 1,3 mL/menit<sup>(9)</sup>. Berdasarkan hal tersebut, metode perlu ditingkatkan efisiensinya agar dapat diperoleh waktu retensi yang lebih singkat

(kurang dari 10 menit). Analisis kurkumin dalam plasma dengan fase gerak asetonitril-aquabidest (8:2) dalam suasana asam asetat 1% pada laju alir 1,0 mL/menit dan deteksi pada 425 nm menggunakan dimetilkurkumin sebagai baku internal menghasilkan sensitivitas yang masih lebih besar dari 100 ng/mL<sup>(10)</sup>. Nilai sensitivitas metode harus lebih kecil dari 1/20 kali C<sub>max</sub> kurkumin<sup>(6)</sup>. Kurkumin memberikan C<sub>max</sub> sebesar 410,2  $\pm$  70,4 ng/mL<sup>(11)</sup>.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode KCKT yang sederhana untuk analisis kurkumin dalam plasma manusia secara efektif dan efisien. Metode analisis yang telah ada masih perlu ditingkatkan efektivitas dan efisiensinya. Efektivitas metode ditingkatkan dengan menurunkan batas deteksi terendahnya, sedangkan efisiensi metode ditingkatkan dengan memperpendek *running time*. Penelitian dilakukan secara *in-vitro* untuk memvalidasi metode dengan *spike placebo method*<sup>(6,7)</sup>.

Kondisi KCKT yang digunakan adalah fase terbalik yaitu fase gerak bersifat polar dan fase diam bersifat non polar. Penyiapan sampel plasma dilakukan dengan larutan pengendap protein menggunakan metanol. Detektor yang digunakan adalah UV-Vis karena terdapat gugus kromofor pada struktur kimia kurkumin sehingga dapat dideteksi oleh detektor tersebut. Baku dalam yang digunakan adalah irbesartan. Irbesartan dipilih karena memberikan respon dan tidak mengganggu pada waktu retensi kurkumin<sup>(6,7)</sup>.

Baku dalam bertujuan untuk mengurangi kesalahan selama proses analisis, khususnya kesalahan pada saat melakukan ekstraksi obat dari plasma dan kesalahan dalam volume suntikan, yang akan mempengaruhi luas puncak yang dihasilkan. Penyimpangan kecil selama proses analisis dapat berdampak besar bagi kesalahan hasil analisis, sehingga penambahan baku dalam dapat membantu mengurangi penyimpangan-penyimpangan tersebut<sup>(6,7)</sup>.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu baku pembanding kurkuminoid (Merck, Darmstadt, Germany), irbesartan (Sun Pharma, Gujarat, India), asetonitril untuk KCKT (Mallinckrodt, Philipsburg, USA), metanol untuk KCKT (Mallinckrodt, Philipsburg, USA), asam asetat untuk analisis, akuabides (Ikapharmindo Putramas Pharmaceutical Laboratories, Jakarta, Indonesia), plasma manusia (PMI).

**Alat.** Peralatan yang digunakan yaitu Kromatograf Cair Kinerja Tinggi LC 20 AD (Shimadzu, Kyoto, Jepang) dengan Detektor Visibel (Shimadzu SPD-

20A(DETA), Kyoto, Jepang), vortex mixer (Bionex, Daejeon-Si, Korea), timbangan digital (Denver, New York, Amerika), sentrifus (Gemmy Industrial, Taipei, Taiwan), lemari pendingin -40 °C (Meiling, Hefei City), sonikator (Soltec), penyaring fase gerak dilengkapi vakum (Welch, Skokie, USA), mikropipet (Trefflab, Degersheim, Jerman), erlenmeyer, *beaker glass*, pipet volume (Iwaki, Shizouka, Jepang), filter millipore (0,2 µm dan 0,45 µm), tabung Effendrof, dan pH meter (Hanna Instrument, Woonsocket, USA).

**METODE. Pembuatan Larutan Baku Kurkumin.** Ditimbang saksama lebih kurang 10 mg kurkumin dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, dilarutkan dengan metanol pH 4. Kemudian ditambahkan metanol pH 4 sampai batas labu ukur lalu larutan dikocok hingga homogen, didapat konsentrasi 1000 µg/mL. Sejumlah 1,0 mL larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL dan diencerkan dengan metanol pH 4 sampai dipindahkan ke dalam labu tentukur 10 mL dan diencerkan dengan metanol pH 4 hingga tanda sehingga diperoleh konsentrasi 100 µg/mL. Sejumlah 400 µL larutan tersebut ke dalam labu tentukur 10 mL dan diencerkan dengan metanol pH 4 sampai tanda sehingga diperoleh konsentrasi 4 µg/mL.

**Pembuatan Larutan Irbesartan.** Ditimbang saksama lebih kurang 10 mg irbesartan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, dilarutkan dengan metanol pH 4. Kemudian ditambahkan metanol pH 4 sampai batas labu tentukur dan didapat konsentrasi 1000 µg/mL. Sejumlah 1,0 mL larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL dan diencerkan dengan metanol pH 4 sampai tanda sehingga diperoleh konsentrasi 10 µg/mL.

**Penyiapan Sampel.** Sebanyak 200 µL plasma yang mengandung kurkumin dengan konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Selanjutnya, ditambahkan 40 µL baku dalam (10 µg/mL) dan dikocok menggunakan vortex selama 30 detik. Lalu dilakukan penambahan pengendap protein yaitu metanol sebanyak 600 µL dan dikocok dengan vortex kembali selama 1 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Setelah itu, lapisan organik diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sebanyak 20 µL aliquot disuntikkan ke dalam KCKT dengan kondisi analisis.

**Optimasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.** Penentuan panjang gelombang deteksi dengan cara, sebanyak 40, 100 dan 160 µL larutan baku kurkumin 100 µg/mL diencerkan dengan metanol pH 4 dalam labu tentukur 10 mL sampai tanda sehingga diperoleh konsentrasi 0,4; 1,0 dan 1,6 µg/mL. Larutan selanjutnya diukur pada panjang gelombang 300-

500 nm. Spektrum serapan dibuat dan ditentukan panjang gelombang serapan maksimumnya. Panjang gelombang serapan maksimum dijadikan panjang gelombang deteksi pada detektor kromatograf.

Pemilihan komposisi fase gerak, komposisi fase gerak yang dioptimasi adalah: metanol-asam asetat glasial 2% (90:10) dan asetonitril-asam asetat-aquabidest (60:1:39).

Pemilihan laju alir dengan cara, larutan sampel yang telah disaring dengan kertas penyaring berpori dan disonikasi, selanjutnya disuntikkan ke dalam alat KCKT sebanyak 20 µL aliquot menggunakan fase gerak terpilih. Laju alir yang digunakan adalah 0,8 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 1,0 mL/menit dan 1,2 mL/menit.

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk mengetahui apakah alat, metode, dan kondisi optimum yang telah ditetapkan dapat membentuk satu sistem analisis tunggal. Sejumlah 20 µL larutan baku kurkumin dan baku dalam. Kemudian dicatat waktu retensi (tR), dihitung faktor ikutan (Tf), jumlah lempeng teoritis (N), HETP, dan presisi pada enam kali penyuntikan<sup>(12)</sup>.

**Validasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Linearitas.** Larutan plasma blangko, *zero* sampel dan 7 seri konsentrasi *spike* analit sebagai larutan uji (0,0020; 0,0250; 0,0500; 0,1000; 0,1500; 0,2500; 0,5000 µg/mL) dipreparasi sesuai dengan cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 µL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih Setelah itu regresi perbandingan luas puncak (y) terhadap konsentrasi analit dalam plasma (x) dengan persamaan ( $y = a + bx$ ) dari masing-masing konsentrasi dianalisis dan disiapkan kurva kalibrasinya.

**Batas Kuantitasi Terendah (Lower Limit Of Quantification).** Berdasarkan penelitian yang dilakukan,<sup>(8)</sup> kurkumin memberikan Cmax sebesar  $410,2 \pm 70,4$  ng/mL. Selanjutnya, larutan kurkumin dalam plasma dibuat dengan konsentrasi seperdua puluh dari nilai Cmax literatur tersebut. Sebanyak 20,0 µL aliquot disuntikkan ke kromatograf, dari data pengukuran kemudian dihitung nilai % differensiasi (% diff) dan koefisien variasinya (KV). Batas kuantitasi terendah/Lower Limit Of Quantification (LLOQ) adalah kondisi terendah yang menunjukkan akurasi (nilai % diff) tidak lebih dari 20%, serta presisi (koefisien variasi) tidak lebih dari 20%<sup>(6,7)</sup>.

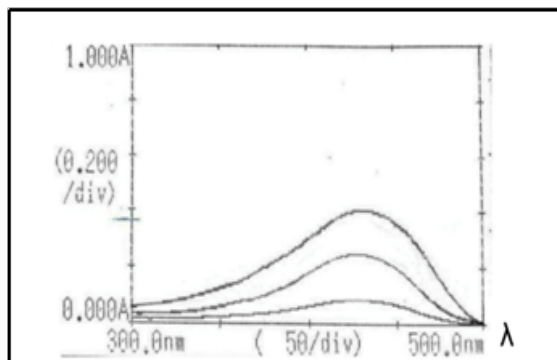
**Uji Akurasi, Presisi dan Perolehan Kembali.** Larutan uji dengan konsentrasi *spike* analit konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dipreparasi sesuai cara penyiapan sampel. Penetapan presisi, akurasi dan perolehan kembali sebanyak 20,0 µL aliquot disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Prosedur tersebut diulang sebanyak lima kali

untuk masing-masing konsentrasi. Presisi dihitung sebagai nilai SBR dari masing-masing konsentrasi. Akurasi dihitung sebagai nilai % kesalahan dan dihitung nilai perolehan kembali<sup>(6,7)</sup>.

**Uji Selektivitas.** Plasma yang mengandung kurkumin pada konsentrasi LLOQ disiapkan menggunakan enam plasma dari sumber yang berbeda. Selanjutnya dilakukan seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu$ L disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Ada atau tidaknya gangguan (interferensi) ekstrak plasma di sekitar waktu retensi kurkumin dan baku dalam diamati, kemudian dihitung nilai presisi (koefisien variasi) dan akurasinya (% diff)<sup>(6,7)</sup>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Penentuan Panjang Gelombang Deteksi.** Penetapan panjang gelombang dilakukan pada 3 konsentrasi yaitu 0,4; 1,0; 1,6  $\mu$ g/mL. Pengaruh konsentrasi dengan serapan maksimum berbanding lurus sesuai Hukum Lambert Beer<sup>(12)</sup>. Pada kondisi pengukuran yang sama peningkatan konsentrasi berbanding lurus dengan serapan maksimum<sup>(12)</sup>, terbukti dengan profil panjang gelombang serapan maksimum dapat dilihat pada Gambar 1.

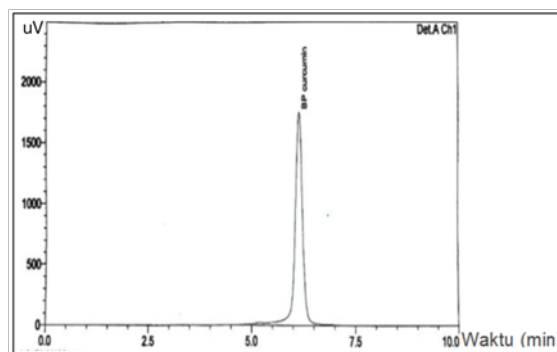


Gambar 1. Panjang gelombang serapan maksimum larutan kurkumin 0,4; 1,0 dan 1,6  $\mu$ g/mL.

Hasil yang didapatkan yaitu serapan maksimum pada panjang gelombang 428 nm dengan mengacu panjang gelombang teoritis 430 nm<sup>(1)</sup>, panjang gelombang hasil pengukuran tidak lebih dari  $\pm 2$  nm terhadap panjang gelombang teoritis<sup>(12)</sup>. Panjang gelombang deteksi untuk baku dalam yaitu irbesartan pada panjang gelombang 270 nm<sup>(13)</sup>. Dilakukan gradien panjang gelombang pada menit ke-5 untuk menganalisis kurkumin secara optimal agar diperoleh

nilai LLOQ yang sekecil mungkin. Nilai LLOQ yang kecil menunjukkan semakin sensitifnya suatu metode analisis.

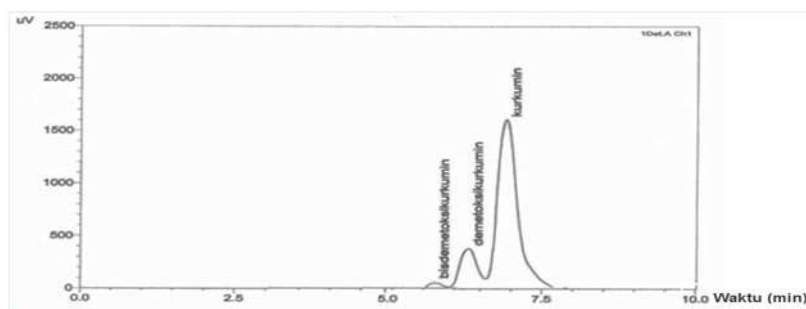
**Optimasi Kondisi KCKT. Pemilihan Komposisi Fase Gerak.** Senyawa kurkuminoid yang terdiri atas bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin dan kurkumin. Pada komposisi fase gerak metanol-asam asetat glasial 2% (90:10) didapatkan satu puncak pada waktu retensi sekitar  $\pm 6$  menit dengan beberapa laju alir, yaitu 0,8; 1,0; dan 1,2 mL/menit (Gambar 2). Hasil kromatogram menunjukkan bahwa kondisi kromatograf belum dapat memisahkan senyawa kurkuminoid karena tingkat kepolaran dari fase gerak sehingga dilakukan variasi komposisi fase gerak.



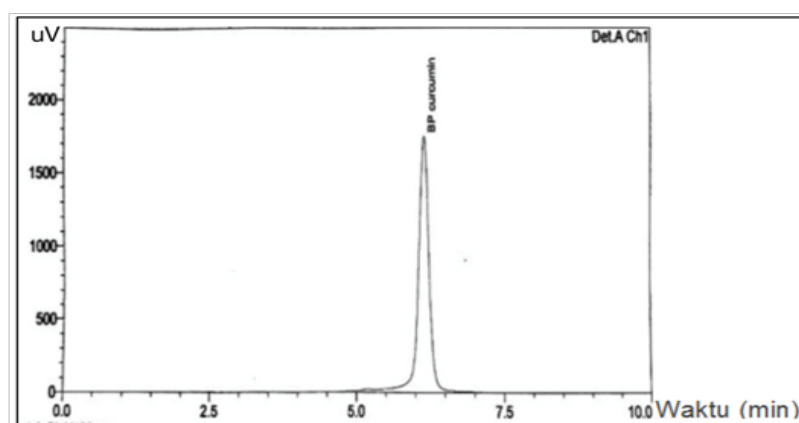
Gambar 2. Kromatogram larutan kurkumin dengan fase gerak methanol-asam asetat glasial 2% (90:10).

Pada penggunaan fase gerak asetonitril-asam asetat-aquabidest (60:1:39) pH 4,01 dengan laju alir 0,8; 1,0; 1,2 mL/menit terdapat tiga puncak turunan senyawa kurkuminoid yaitu bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin dan kurkumin (Gambar 3). Perubahan variasi konsentrasi fase gerak menjadi asetonitril-asam asetat-aquabidest (60:1:39) karena senyawa kurkumin yang bersifat non polar maka perbandingan asetonitril yang bersifat semi polar ditingkatkan dan air yang bersifat polar diturunkan..

Hasil ini menunjukkan bahwa dalam waktu sepuluh menit telah dapat dipisahkan ke-3 kurkuminoid. Pada penggunaan fase gerak asetonitril-asam asetat-aquabides (50:1:49) dengan laju alir 1,0 mL/menit, tiga puncak senyawa kurkuminoid yang muncul yaitu bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin dan kurkumin dalam waktu 16 menit<sup>(7)</sup>. Kromatogram hasil verifikasi metode dengan fase gerak asetonitril-asam asetat-aquabides (50:1:49) dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 3. Kromatogram BP kurkumin dengan fase gerak asetonitril-asam asetat-aquabides (60:1:39) dengan laju alir 1,0 mL/menit.



Gambar 4. Kromatogram BP kurkumin dengan fase gerak asetonitril-asam asetat-aquabides (50:1:49) dengan laju alir 1,0 mL/menit.

Pada penggunaan fase gerak asetonitril-asam asetat-aquabides (60:1:39) efisiensi kolom meningkat yang ditunjukkan dengan nilai jumlah pelat teoritis yang meningkat (*Number of theoretical plate/N*) dan *High Equivalence Theoretical Plate* (HETP)

yang menurun<sup>(12)</sup>. *Tailing factor* (Tf) dari puncak juga menjadi lebih baik dengan resolusi (R) yang masih memadai (>1,5)<sup>(12)</sup>. Hasil-hasil tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Waktu retensi, resolusi, faktor ikutan, efisiensi kolom dan jumlah lempeng terhadap perubahan komposisi fase gerak.

Fase gerak	Waktu retensi (menit)	Resolusi	<i>Tailing factor</i>	HETP	N
Metanol-asam asetat glasial 2% (90:10)	6,805	0,000	0,943	0,1215	2058,13
Asetonitril-asam asetat-aquabides (50:1:49)	14,525	2,158	1,251	0,1666	1500,27
Asetonitril-asam asetat-aquabides (60:1:39)	6,975	1,652	1,143	0,1085	2304,64

**Pemilihan Laju Alir.** Pada pemilihan komposisi fase gerak yang terpilih asetonitril-asam asetat-aquabides (60:1:39), laju alir yang digunakan semula adalah 1,0 mL/menit lalu divariasikan menjadi 0,8 mL/

menit dan 1,2 mL/menit. Laju alir yang terpilih adalah 1,0 mL/menit karena memberikan nilai R, Tf, N dan HETP yang baik<sup>(12)</sup>. Hasil dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Waktu retensi, resolusi, faktor ikutan, efisiensi kolom dan jumlah lempeng terhadap perubahan laju alir.

Laju alir (mL/menit)	Waktu retensi kurkumin (menit)	Waktu retensi irbesartan (menit)	Resolusi	Tailing factor	HETP	N
0,8	9,194	4,768	10,81	1,142	0,090	2760,151
1,0	6,956	3,672	4,49	1,117	0,158	1579,948
1,2	5,504	2,800	16,60	1,213	0,253	989,192

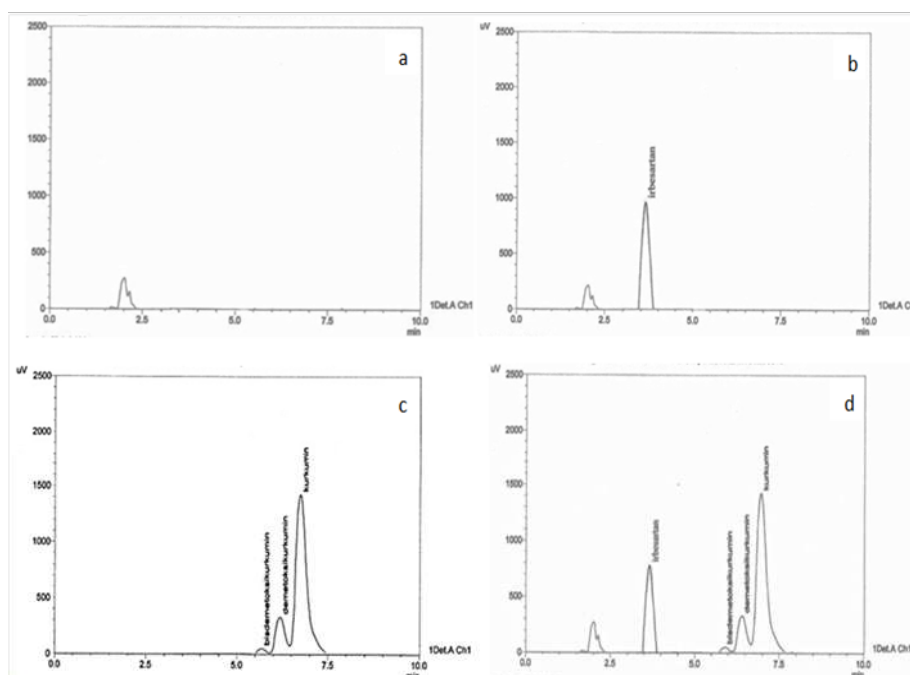
**Pemilihan Baku Dalam.** Penggunaan irbesartan sebagai baku dalam dapat diterima karena memberikan respon pada daerah panjang gelombang yang berbeda dengan kurkumin dan tidak mengganggu waktu retensi kurkumin sehingga selektivitas metode meningkat. Namun, kelemahan baku dalam irbesartan adalah instrumen yang digunakan harus mempunyai kemampuan deteksi pada dua panjang gelombang, karena perbedaan panjang gelombang deteksi irbesartan di daerah UV (270 nm), sedangkan analit di daerah cahaya tampak (Gambar 5).

Dari pemilihan panjang gelombang, fase gerak dan laju alir diperoleh kondisi yang menghasilkan kromatogram baik. Kromatogram tersebut berarti apabila resolusi  $\geq 1,5$  menandakan bahwa pemisahan lebih bagus sehingga tidak *overlap*, *tailing factor* apabila  $< 1,2$  berarti puncak nya lebih bagus yaitu simetris, jika  $N > 1500$  berarti efisiensi kolomnya lebih bagus sehingga waktu retensi lebih cepat<sup>(12)</sup>.

Berdasarkan hasil tersebut untuk percobaan selanjutnya digunakan kondisi KCKT seperti pada Tabel 3.

**Preparasi Sampel.** Preparasi sampel yang dilakukan pada penelitian menggunakan metanol sebagai pengendap protein. Metanol merupakan pelarut organik dimana akan menurunkan solubilitas protein sehingga protein akan mengendap, sedangkan peneliti sebelumnya mengendapkan protein dengan cara ekstraksi dan pengeringan selama beberapa menit.

Pembuatan larutan baku pembandingan dalam suasana asam dikarenakan kurkumin dapat terdegradasi pada kondisi pH netral hingga basa karena proton akan dipindahkan dari grup fenolik, sehingga menyebabkan struktur kurkumin mengalami destruksi. Hasil kromatogram menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh matriks plasma dalam analisis kurkumin, karena waktu retensi dari matriks plasma tidak mengganggu waktu retensi analit Gambar 5.



Gambar 5. Kromatogram hasil optimasi (a) plasma blanko, (b) plasma blanko dan baku internal, (c) plasma blanko dan baku pembandingan, (d) plasma blanko, baku internal, dan baku pembandingan.

Tabel 3. Kondisi optimum yang terpilih.

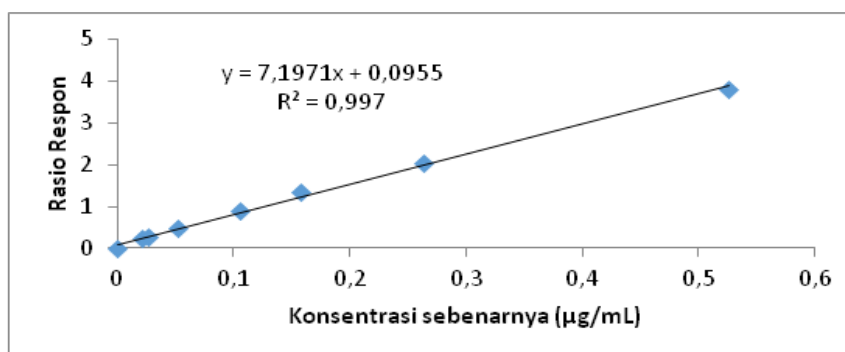
Parameter KCKT	Kondisi KCKT terpilih
Volume injeksi	20 $\mu$ L
Fase diam	Kolom Reliant® RP-18e (4,6x250mm; 5 $\mu$ m)
Fase gerak	asetonitril-asam asetat-aquabides (60:1:39)
Laju alir	1,0 mL/menit
Detektor	UV panjang gelombang 270 nm dengan gradien panjang gelombang menjadi 428 nm pada menit ke-5

**Uji Kesesuaian Sitem.** Pada metode ini dilakukan 6 kali penyuntikan campuran kurkumin dan irbesartan. Kondisi yang digunakan yaitu sistem KCKT fase diam C18, fase gerak asetonitril-asam asetat-aquabidest (60:1:39), dan laju alir 1,0 mL/menit. Hasil dari penyuntikan sebanyak 6 kali memberikan simpangan baku rata-rata (SBR) untuk luas puncak dan waktu retensi yang kurang dari 2,0% baik untuk analit maupun baku internal<sup>(12)</sup>. Nilai resolusi diatas 1,5 menunjukkan hasil pemisahan yang baik. Hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa kondisi dari KCKT untuk menganalisis kurkumin sudah membentuk suatu kesatuan sistem yang efektif untuk dapat

memberikan hasil yang baik.

**Hasil Validasi Metode Bioanalisis. Hasil Uji Linearitas.** Uji linearitas menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan konsentrasi analit yang diketahui di dalam matriks plasma, dalam penelitian ini kurkumin sebagai analit dan irbesartan sebagai baku dalam agar diperoleh hasil yang lebih presisi.

Dari Gambar 6, dapat dilihat persamaan garis regresi  $y = 7,1971X + 0,0955$  dan koefisien determinasi ( $R^2$ ) 0,9970. Nilai  $R^2$  yang mendekati satu menunjukkan adanya hubungan linear antara respon instrumen dengan konsentrasi di dalam matriks plasma<sup>(6,7,12)</sup>.



Gambar 6. Hubungan antara konsentrasi sebenarnya dengan rasio respon.

**Hasil Batas Kuantitasi Terendah / Lower Limit Of Quantification (LLOQ).** Dalam penelitian ini, untuk mendapatkan nilai LLOQ dalam plasma diuji dengan 2 konsentrasi yaitu konsentrasi 0,0210 dan 0,0526  $\mu$ g/mL. Konsentrasi terukur ( $\mu$ g/mL) Berdasarkan hubungan konsentrasi sebenarnya (x) dengan rasio respon (y) diperoleh persamaan garis regresi,  $y = 7,1971x + 0,0955$ . Perhitungan konsentrasi terukur dari persamaan regresi. Konsentrasi yang dipilih adalah konsentrasi yang memberikan nilai persen kesalahan  $\pm 20\%$ <sup>(10)</sup>. Dari hasil perhitungan diperoleh konsentrasi LLOQ sebesar 0,0196  $\mu$ g/mL atau 19,6 ng/mL, dengan nilai akurasi berkisar 10,48-18,09%. Nilai LLOQ metode lebih kecil dari 1/20  $C_{max}$  kurkumin, sehingga metode dapat diaplikasikan

untuk studi bioanalisis<sup>(6)</sup>.

**Hasil Uji Akurasi dan Presisi.** Kesalahan sistemik menghasilkan pengukuran lebih besar atau lebih kecil dari sebenarnya sehingga menghasilkan akurasi dengan nilai persen kesalahan minus atau tidak yang masih dapat diterima sesuai syarat akurasi yaitu nilai persen kesalahan  $\pm 15\%$ , dan presisi dengan nilai SBR  $\pm 15\%$ <sup>(10,11)</sup>, yaitu berturut-turut -5,51-3,04% dan 1,04-1,86%<sup>(6,7)</sup>.

**Uji Perolehan Kembali.** Nilai perolehan kembali pada konsentrasi uji rendah, sedang, dan tinggi berkisar antara 94,74-103,12% dengan nilai presisi berturut-turut yaitu 1,86; 1,27; dan 1,04%. Pada bioanalisis perolehan kembali (% Recovery) tidak disyaratkan 100 % tetapi nilai perolehan kembali harus

memiliki presisi yang memenuhi syarat<sup>(6,7)</sup>.

**Uji Selektivitas.** Pada uji selektivitas digunakan plasma dari enam sumber yang berbeda pada konsentrasi LLOQ. Terdapat 12 perlakuan yang sama dari 6 sumber plasma yang berbeda. Presisi metode dilihat dari nilai SBR dari seluruh perlakuan. Hasil penelitian sebesar 8,38% dengan syarat presisi yaitu nilai SBR  $\pm 20\%$ . Semua plasma yang berasal dari sumber berbeda menunjukkan persen kesalahan  $<15\%$  dengan syarat presisi yaitu nilai persen kesalahan  $\pm 20\%$ <sup>(10,11)</sup>. Uji selektivitas memenuhi syarat secara presisi dan akurasi metode<sup>(6,7)</sup>.

### SIMPULAN

Metode KCKT menggunakan Kolom C18 dengan panjang kolom 250 mm X 4,6  $\mu\text{m}$  ukuran partikel 5  $\mu\text{m}$  dan fase gerak asetonitril- asam asetat-akuabides (60:1:39) dengan laju alir 1,0 mL/menit menggunakan irbesartan sebagai baku dalam dengan detektor pada panjang gelombang 428 nm untuk kurkumin dan 270 nm untuk irbesartan adalah metode yang simpel untuk penetapan kadar kurkumin dalam plasma manusia. Metode yang dikembangkan telah memenuhi validitas untuk parameter analitik linearitas, akurasi, presisi, perolehan kembali, dan selektivitas dengan batas kuantitasi terendah sebesar 19,6 ng/mL. .

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Kemenristek-BRIN atas hibah dana penelitian melalui skim penelitian *World Class Research*.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Aggarwal BB. Curcumin-biological and medicinal properties dalam turmeric the genus curcuma. USA : CRC Press; 2007.
2. Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ. Pharmacokinetics pharmacokinetics pharmacodynamics of curcumin. In The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease 2007:453-470. SpringerSpringer, Boston, MA.
3. Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin nanoformulations a future nanomedicine for cancer. Drug Discov Today; 2012.
4. Parwa B. Analisis farmasi metode modern. Surabaya: Airlangga University Press; 1991.
5. United States Pharmacopeial Convention. The united states pharmacopeial 32. The National Formulary 27. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2009.
6. Committee For Medicinal Product For Human Use. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. London; 2011.
7. Food and Drug Administration. Guidance for industry on bioanalytical method validation, U.S. Department of Health and Human Services. May 2018. Diambil dari <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.pdf> Diakses pada 24 November 2018.
8. Adawiyah L. Validasi metode analisis kurkumin dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi (skripsi), Depok: Fakultas Farmasi Universitas Indonesia; 2011.
9. Cahyono B, Muhammad D, Leenawaty L. Pengaruh proses pengeringan rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) terhadap kandungan dan komposisi kurkuminoid. 2011.
10. Duhania CE. Optimasi dan validasi metode penetapan kadar kurkumin dalam plasma manusia (*in vitro*) secara kromatografi cair kinerja tinggi (tesis). Yogyakarta: Univeristas Gadjah Mada, 2012.
11. Ghalandaraki N, Alizadeh AM, Ashkani-Esfahani S. Nanotechnology applied curcumin for different disease therapy. Biomed Research International; 2014. 1-23.
12. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope indonesia. Edisi V. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan; 2014.
13. Widjaja M. Validasi metode penetapan kadar kurkumin dalam sediaan cair obat herbal terstandar merk kiranti® secara kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik (skripsi), Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma; 2011.