

## The Comparison of Analytical Methods for Determination of Eugenol Content in Water Soluble Base from Clove Flower (*Syzygium aromaticum*) Essential Oil Ointment using UV-Vis Spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography

Puput Herawati Said Hasan<sup>1\*</sup>, Nining Sugihartini<sup>2</sup>, Hari Susanti<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Magister Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia;

<sup>2</sup>Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia;

<sup>3</sup>Laboratorium Kimia Analisis, Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia;

### Article History

Received : December 19<sup>th</sup>, 2022

Revised : January 27<sup>th</sup>, 2023

Accepted : March 16<sup>th</sup>, 2023

\*Corresponding Author: **Puput Herawati Said Hasan**, Program Magister Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia; Email: [puputherawatisaid@gmail.com](mailto:puputherawatisaid@gmail.com)

**Abstract:** The eugenol content in clove essential oil can be used as a parameter to determine the chemical stability of clove essential oil ointment. Both UV-Vis and HPLC spectrophotometry methods can be used to determine eugenol levels. However, no studies have compared the two methods. This study aims to find out which analytical method is more valid in determining the eugenol content of clove flower essential oil (*Syzygium aromaticum*) in water-sea based ointments, between the UV-Vis spectrophotometric method and the HPLC method. The parameters in the validation of the analytical method carried out include parameters of linearity, selectivity, precision, accuracy, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). The results of method validation using UV spectrophotometry showed linearity ( $R = 0.9998$ ), precision ( $CV = 0.137\%$ ), LOD  $0.190 \mu\text{g/mL}$ , LOQ  $0.632 \mu\text{g/mL}$ , accuracy (recovery =  $100.05\%$ ). Method validation using HPLC produced parameters of linearity ( $R = 0.998$ ), precision ( $CV = 0.533\%$ ), LOD  $0.28 \mu\text{g/mL}$ , LOQ  $0.93 \mu\text{g/mL}$ , accuracy (recovery =  $106.43$ ). Average levels of eugenol in water-soluble base MABC ointment using UV spectrophotometry (% concentration =  $2.201 \pm 0.037$ ) while using HPLC (% concentration =  $3.191 \pm 0.023$ ). Both methods met the validation requirements. The assay results using both methods met the requirements according to the Indonesian Pharmacopoeia Edition VI. The two methods did not have a significant difference based on the student test, both in the validation parameters and the results of determining the levels of eugenol.

**Keywords:** eugenol, HPLC, method validation, UV spectrophotometry.

### Pendahuluan

Minyak atsiri dari tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum*) mengandung senyawa eugenol, sifat farmakologi, hipotermia, antioksidan, anestesi lokal dan antiinflamasi (Rapp, 2007). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa eugenol mampu menekan sinyal TNF  $\alpha$  dan ekspresi COX-2, sebagai agen antiinflamasi (Fitriyah *et al.*, 2017; Neibaho, 2013). Salep merupakan salah satu sediaan farmasi yang dapat memudahkan dalam

penggunaannya (Astuti, 2010). Sediaan salep merupakan sediaan yang praktis, mudah dibawa, dipakai, cepat pengabsorpsiannya dan mempunyai tampilan yang menarik (Susilowati & Saptuti, 2014). Salep dengan basis larut air memiliki kelebihan mudah dicuci, memiliki daya lekat yang baik dan nyaman saat digunakan (Sari, 2015).

Manfaat dari uji stabilitas yaitu untuk menjamin sediaan masih memenuhi parameter kriteria selama penyimpanan. Kestabilan suatu zat merupakan sesuatu yang harus diperhatikan

dalam membuat formulasi suatu sediaan farmasi (Dewi, 2018). Pada uji stabilitas terdapat bagian penting yaitu penetapan kadar zat aktif yang memerlukan metode analisa yang sudah tervalidasi sebagai landasan dalam perhitungan berikutnya (Sugihartini *et al.*, 2014).

Metode Spektrofotometri UV-Vis memiliki Keuntungan utama dapat menyederhanakan dalam penetapan kuantitas zat yang sangat kecil dan hasil yang diperoleh cukup akurat, karena angka yang terbaca langsung dicatat oleh detector dan tercetak dalam bentuk angka digital ataupun grafik yang sudah diregresikan (Wenzel, 2021). Metode KCKT memiliki banyak keuntungan yaitu mampu memisahkan molekul dari suatu campuran, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi. Metode spektro UV VIS dan KCKT keduanya memiliki keuntungan yang relatif lebih mudah dan murah dibandingkan dengan metode lainnya, seperti metode GCMS (Putra, 2004).

Beberapa penelitian terdahulu melaporkan penetapan kadar eugenol menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis (Salunke *et al.*, 2017). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode analisis yang lebih valid dalam menentukan kadar eugenol minyak atsiri bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dalam salep basis larut air, antara metode spektrofotometri UV-Vis dan metode.

## Bahan dan Metode

### Alat dan bahan

Alat dalam penelitian ini terdiri dari: alat gelas, KCKT detektor UV Shimadzu LC-2030C (-48) Serial number L21445480026 ML, Spektrofotometri UV-1900 Serial number A12425680620 ML, Mikropipet 200 µL dan 1000 µL (Acura), nylon filter 0,45 µm (Filstar), sonikator Elmasonic P120H Serial number S1000009145, climatic chamber (CLIMACELL®).

Bahan dalam penelitian ini terdiri dari: standar eugenol (Sigma-Aldrich E51791-100G ReagentPlus®, 99% C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>HAl<sub>2</sub>) USA, minyak atsiri bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) mengandung eugenol dari Pusat Studi Minyak Atsiri/Center of Essential Oil (CEOS) Universitas Islam Indonesia, Sleman, Yogyakarta, asetonitril for HPLC (Merck), metanol p.a (Merck), akuades, nylon filter 0,45

µm (Filstar), bahan-bahan untuk membuat salep basis larut air dengan kualitas farmasetis meliputi : PEG 4000(Brataco) dan PEG 400 (Brataco). Analisis KCKT dilakukan dengan menggunakan pelarut asetonitril, kolom C18 dan fase gerak berupa asetonitril: aquades (60:40 v/v) (KCKT grade). Analisis spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan pelarut etanol p.a.

### Prosedur penelitian Spesifikasi MABC

Spesifikasi salep basis larut air dilakukan berdasarkan kadar kandungan eugenol dengan menggunakan sistem kromatografi gas (Rohman *et al.*, 2009).

### Pembuatan dan pengemasan salep MABC basis larut air

Dosis MABC yang digunakan dalam pembuatan salep basis larut air yaitu sebesar 5%, dosis ini adalah dosis optimum yang digunakan pada penelitian sebelumnya. pembuatan salep dibuat dengan cara memanaskan PEG 4000 dan PEG 400. Minyak atsiri ditambahkan kemudian dicampur hingga homogen (Pratimasari *et al.*, 2015). Setelah itu dimasukkan ke dalam pengemas gelas.

### Validasi metode spektrofotometri UV-Vis Penentuan spesifisitas

Larutan standar eugenol sebanyak 1 mg/mL dibuat menjadi konsentrasi 18 µg/mL dalam metanol p.a dan discan pada panjang gelombang 200 – 400 nm. Kemudian larutan sampel hasil preparasi salep MABC basis larut air discan pada panjang gelombang 200 – 400 nm. Setelah itu hasil dari kedua sampel tersebut dibandingkan kesesuaian profil spektra dan absorbansinya.

### Linieritas

Larutan baku standar eugenol dengan rentang 5 – 35 µg/mL yang dibuat dari larutan standar 1 mg/mL dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 281 nm, data hasil absorbansi yang diperoleh untuk menentukan nilai regresi (R) liniernya. Nilai r yang memenuhi syarat yaitu sebesar 0,997 (Nugraheni *et al.*, 2016).

### Presisi

Tiga variasi konsentrasi larutan standar eugenol dibuat dengan konsentrasi masing-masing sebesar 10, 20, dan 30 µg/mL dari larutan standar 1 mg/mL dan ditambahkan metanol p.a pada labu takar 10 mL sampai tanda batas yang dibuat masing-masing 3 replikasi. Setelah itu dibaca absorbansi larutan sampel pada spektrofotometri UV-Vis.

### LOD dan LOQ

Cara menentukan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dengan standar deviasi dari respon dengan rumus dilakukan dengan pendekatan simpangan baku (SD) respon terkecil yang masih memberikan respon yang masih dapat diukur. Dengan menggunakan rumus:

$$\text{Batas Deteksi} = 3,3 \times \text{SD/S}$$

$$\text{Batas Kuantifikasi} = 10 \times \text{SD/S}$$

Dimana:

SD : simpangan baku respon terkecil

S : slope kurva regresi linier (Rohman, 2014).

LOD dan LOQ dihitung dengan cara mengukur absorbansi pada konsentrasi 5-35 µg/mL ke dalam spektrofotometri UV-Vis sampai diperoleh persamaan kurva baku untuk menghitung nilai LOD dan LOQ.

### Akurasi

Pengujian dilakukan dengan menggunakan sejumlah analit murni (eugenol) ke dalam matriks blanko (salep dengan kandungan semua bahan tambahan kecuali senyawa obat). Setelah itu campuran dianalisis, kemudian hasilnya dibandingkan dengan kadar analit (eugenol) yang sebenarnya. Pengujian dilakukan pada larutan spike 80%, 100% dan 120% dari penetapan kadar yang diperoleh. dilakukan 3 kali replikasi pada masing-masing larutan spike, lalu diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 281 nm. Nilai akurasi dinyatakan sebagai persen *recovery*.

### Validasi metode analisis KCKT

#### Kondisi KCKT

Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini adalah campuran asetonitril : akuades dengan rasio 60:40 (v/v). Kondisi yang digunakan pada KCKT adalah fase diam C-18 dengan laju alir 1 ml/menit pada suhu ruang dan *running time* 10 menit (Inam *et al.*, 2014). Penentuan panjang

gelombang maksimum larutan standar eugenol menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

### Uji kesesuaian sistem

1 mg/mL larutan standar eugenol dipipet sebanyak 180 µL lalu ditambahkan fase gerak asetonitril dalam labu takar 10 mL sampai didapatkan konsentrasi 18 µg/mL (ppm). Setelah itu disaring menggunakan milipore (*nylon filter*) 0,45 µm lalu diinjeksikan ke dalam KCKT sebanyak 6 kali dengan fase gerak dan kondisi KCKT yang telah ditetapkan. Selanjutnya dicatat dan dihitung nilai RSD Parameter lempeng teoritis, *tailing factor*, faktor kapasitas, waktu retensi, resolusi dan luas area.

### Penentuan spesifisitas

Larutan standar eugenol 18 µg/mL dalam asetonitril dan larutan sampel hasil preparasi salep MABC basis larut air diinjeksikan pada sistem KCKT pada panjang gelombang 281 nm. Setelah itu hasil dari kedua sampel tersebut dibandingkan kesesuaian profil spektra dan waktu retensi yang dihasilkan.

### Linieritas

Larutan baku standar eugenol dengan rentang 5 – 35 µg/mL yang dibuat dari larutan standar 1 mg/mL setelah itu disaring menggunakan milipore (*nylon filter*) 0,45 µm lalu diinjeksikan ke dalam KCKT pada panjang gelombang UV 281 nm. dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 281 nm. Kemudian dicatat dan dihitung data hasil absorbansi yang diperoleh untuk menentukan nilai regresi (R) liniernya. Nilai r yang memenuhi syarat yaitu sebesar  $\geq 0,997$  (Nugraheni *et al.*, 2016).

### Presisi

Konsentrasi larutan standar eugenol dibuat 3 variasi masing-masing sebesar 10, 20, dan 30 µg/mL dari larutan standar 1 mg/mL dan ditambahkan asetonitril pada labu takar 10 mL sampai tanda batas. Kemudian dibuat masing-masing 3 replikasi. Setelah itu larutan sampel disaring menggunakan milipore (*nylon filter*) 0,45 µm lalu diinjeksikan ke dalam KCKT pada panjang gelombang UV 281 nm. kemudian dibaca absorbansi larutan sampel pada spektrofotometri UV-Vis. Selanjutnya dicatat dan dihitung rata-rata, simpangan baku dan simpangan baku relatif (RSD) dari data

absorbansi yang diperoleh. Suatu metode dinyatakan presisi jika memiliki nilai %RSD <2% (Snyder *et al.*, 1997; Miller & Crowther, 2000; Harmita, 2004).

### LOD dan LOQ

Cara menentukan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dengan standar deviasi dari respon dengan rumus dilakukan dengan pendekatan simpangan baku (SD) respon terkecil yang masih memberikan respon yang masih dapat diukur (Ahuja dan Dong, 2005). Dengan menggunakan rumus:

$$\begin{aligned} \text{Batas Deteksi} &= 3,3 \times \text{SD/S} \\ \text{Batas Kuantifikasi} &= 10 \times \text{SD/S} \end{aligned}$$

Dimana:

SD : simpangan baku respon terkecil  
S : slope kurva regresi linier (Rohman, 2014).

Penelitian ini LOD dan LOQ dihitung dengan cara mengukur absorbansi pada konsentrasi 5-35  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam sistem KCKT sampai didapatkan persamaan kurva baku untuk menghitung nilai LOD dan LOQ.

### Akurasi

Pengujian dilakukan dengan metode pengukuran akurasi sebelumnya. Nilai akurasi dinyatakan sebagai persen *recovery*. Kriteria akurasi diberikan jika hasil analisis memberikan nilai perolehan kembali (*recovery*) antara 98-102% (AOAC, 2002).

### Penetapan kadar salep MABC basis larut air

Pelarut asetonitril digunakan untuk Preparasi sampel pada KCKT. Sedangkan pelarut metanol p.a. digunakan untuk preparasi sampel pada spektrofotometri UV-Vis. Metode preparasi yang dilakukan terhadap salep MABC basis larut air sama dengan sampel plasebo. Metode spektrofotometri UV-Vis: Sebanyak satu gram sampel dilarutkan dengan 6 mL asetonitril, diultrasonikasi selama 15 menit. Suspensi disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan residu dan filtrat.

Residu dilarutkan kembali dengan 6 mL asetonitril untuk kemudian diultrasonikasi kembali. Perlakuan tersebut diulangi hingga tiga kali, kemudian keseluruhan filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL dan

ditambahkan asetonitril hingga tanda batas. Selanjutnya dibuat larutan sampel dengan faktor pengenceran 100x dalam labu ukur 10 mL. Kemudian larutan sampel dibaca absorbansi pada panjang gelombang 281 nm sehingga diperoleh penetapan kadarnya.

Metode KCKT: Sebanyak satu gram sampel dilarutkan dengan 6 mL asetonitril, diultrasonikasi selama 15 menit. Suspensi disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan residu dan filtrat. Residu dilarutkan kembali dengan 6 mL asetonitril untuk kemudian diultrasonikasi kembali. Perlakuan tersebut diulangi hingga tiga kali, kemudian keseluruhan filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL dan ditambahkan asetonitril hingga tanda batas. Selanjutnya dibuat larutan sampel dengan faktor pengenceran 100x dalam labu ukur 10 mL. Larutan sampel disaring terlebih dahulu menggunakan milipore (*nylon filter* 0,45  $\mu\text{m}$ ) sebelum diinjeksikan ke dalam sistem KCKT untuk penetapan kadarnya.

### Analisis data

Uji statistic t student untuk data recovery dan kadar eugenol digunakan untuk menentukan metode mana yang paling valid sebagai penentuan kadar eugenol dalam salep MABC M/A antara metode spektro UV vis dan KCKT, maka dilakukan

### Hasil dan Pembahasan

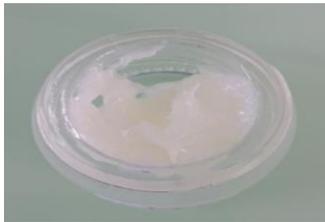
#### Data hasil Pembuatan dan Pengemasan salep MABC M/A

Formulasi salep basis larut air mengacu pada penelitian pratimasari *et al.* (2015) yang bisa dilihat pada tabel 1 dengan komposisi MABC sebesar 5% sebagai zat aktif yang memiliki aktivitas antiinflamasi (Pratimasari *et al.* 2015). Formulasi salep pada tabel 1 menggunakan metode peleburan pada suhu 70°C. Tabel 1. Formulasi salep MABC basis larut air (Pratimasari *et al.*, 2015).

**Tabel 1.** Formulasi salep MABC basis larut air (Pratimasari *et al.*, 2015)

Bahan	Formula
Minyak atsiri bunga cengkeh	5%
PEG 4000	28 gram
PEG 400	67 gram

Sediaan salep MABC basis larut air lalu dikemas dalam pengemas gelas dan disimpan pada suhu ruang. Secara fisik sediaan salep MABC M/A berwarna putih dan memiliki aroma khas cengkeh seperti disajikan pada gambar 2.



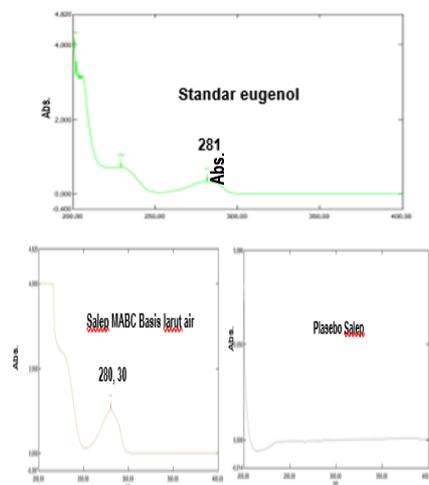
**Gambar 1.** Salep MABC basis larut air

Hasil formulasi salep MABC dalam pengemas gelas secara fisik berwarna putih dengan bau khas minyak cengkeh. Hal ini sejalan dengan penelitian Amelia (2021) yang menyatakan bahwa krim MABC M/A secara organoleptis memiliki warna putih, berbau khas cengkeh, memiliki tekstur lembut, membentuk konsistensi setengah padat dan tidak terasa lengket.

### Validasi metode analisis eugenol pada spektrofotometri UV-Vis dan KCKT

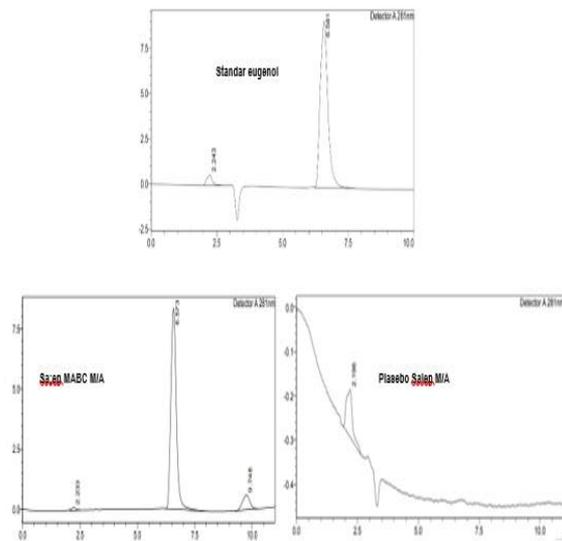
#### Spesifisitas

Uji spesifisitas analisis eugenol menggunakan spektrofotometri UV-Vis dilakukan pada larutan standar eugenol, salep MABC basis larut air dan plasebo salep MABC basis larut air, caranya yaitu dengan membandingkan hasil spektra yang diperoleh dari tiap-tiap sampel tersebut (Gambar 3).



**Gambar 2.** Uji spesifisitas eugenol pada spektrofotometri UV-Vis

Grafik uji spesifisitas (Gambar 2) pada spektrofotometri UV-Vis menunjukkan adanya kesamaan *peak* antara standar eugenol dan salep MABC basis larut air yaitu absorbansi pada panjang gelombang 281 nm. Sedangkan pada plasebo salep MABC basis larut air tidak terlihat absorbansi pada panjang gelombang tersebut. Sehingga Hal ini menunjukkan bahwa tidak ditemukan keberadaan senyawa eugenol pada plasebo salep M/A basis larut air. Uji spesifisitas eugenol dengan menggunakan metode KCKT (Gambar 3) dilakukan dengan cara membandingkan *peak* waktu retensi yang dihasilkan oleh larutan standar, salep MABC basis larut air dan plasebo salep M/A basis larut air.



**Gambar 3.** Uji spesifisitas eugenol pada KCKT

Hasil uji spesifisitas (Gambar 3) menunjukkan terdapat kesamaan waktu retensi antara standar eugenol dengan salep MABC basis larut air yang menunjukkan waktu retensi pada 6,581 dan 6,573 menit. Sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa yang terkandung dalam salep MABC basis larut air tersebut adalah eugenol. Sedangkan pada sampel plasebo salep tidak ditemukan *peak* pada waktu retensi tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa plasebo salep M/A tidak mengandung senyawa eugenol di dalamnya.

### Uji ketepatan (Akurasi)

Data hasil uji kesesuaian (akurasi) seperti pada table 2. Uji akurasi metode analisis dihitung dengan uji perolehan kembali dengan metode penambahan persyaratan yaitu tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket (Depkes, R.I., 1995).

**Tabel 2.** Hasil uji kesesuaian sistem KCKT standar eugenol

Parameter	Nilai rerata	Syarat	Keterangan
Lempeng teroris (N)	2.671	>2000	MS
Tailing factor	1.2397	0.9-1,4	MS
Faktor kapasitas (K')	2,0148	-	MS
% RSD	6,6947	<2%	MS
Waktu retensi			
Resolusi	10,0412	>1,4	MS
%RSD Luas Area	195,237	>2%	MS

MS= Memenuhi syarat

- = Tidak diketahui

Akurasi dari metode spektrofotometri UV-Vis dan KCKT dapat ditentukan dengan menganalisis ketiga mosentrasi yang berbeda dengan menggunakan larutan plasebo salep M/A menggunakan teknik adisi standar senyawa eugenol. Untuk pengujian akurasi digunakan kosentrasi yang berbeda-beda yaitu kosentrasi 80, 100 dan 120%. Hasil dari pengujian ini di perolehan kembali dari jumlah standar (analit) yang ditambahkan ke dalam larutan plasebo atau selisis antara rata-rata dengan nilai sebenarnya yang dapat diterima menunjukkan nilai akurasi/ketepatan (Sugihartini *et al.*, 2014).

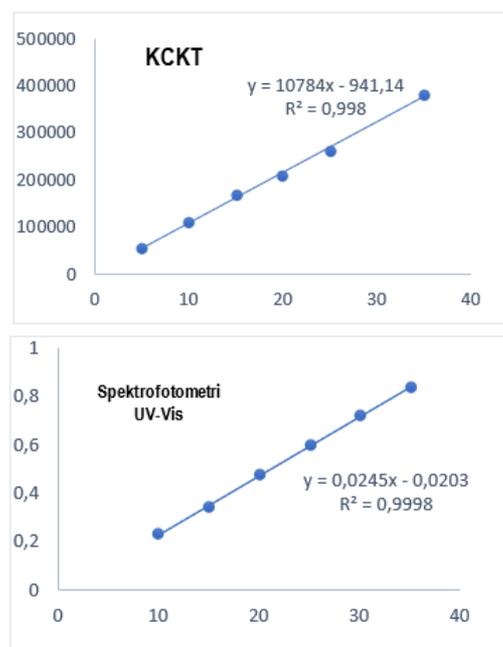
### Linieritas dan sensitivitas

Data hasil uji lineritas dan sensitivitas seperti pada table 3. Hasil persamaan regresi linier yang peroleh dari nilai absorbansi versus kosentrasi diperoleh kurva baku  $Y = 0,00245x - 0,0203$  (Spektro UV Vis) dan  $y=10784x-941,14$  (KCKT). Persamaan garis regresi linier menunjukkan nilai korelasi ( $r$ ) = 0,998 (gambar 4) sehingga memenuhi syarat (Miller dan Miller, 2005). Selanjutnya hasil Uji sensitivitas dilakukan dengan uji batas deteksi (LOD) dan

batas kuantifikasi (LOQ). Pada penelitian ini diperoleh nilai LOD 0,76  $\mu\text{g/mL}$  dan nilai LOQ 2,52  $\mu\text{g}$

**Tabel 3.** Hasil uji linieritas, LOD, dan LOQ spektrofotometri UV-Vis dan KCKT

Metode	Parameter			
	Persamaan kurva baku	R <sup>2</sup>	LOD	LOQ
Spektrofotometri UV-Vis	$y = 0,0245x - 0,0203$	0,9998	0,1896	0,6318
KCKT	$y = 10784x - 941,14$	0,998	0,2789	0,9265



**Gambar 4.** Grafik uji linieritas spektrofotometri UV-Vis dan KCKT

Pembuatan kurva baku LOD dan LOQ pada senyawa eugenol ini digunakan persamaan garis pada metode spektrofotometri UV-Vis dan KCKT dapat dilihat pada tabel 3 dan gambar 4. Menunjukkan nilai linieritas diperoleh pada pengujian dengan ke dua metode tersebut.

### Ketelitian (Presisi)

Data hasil Uji persisi dari ke dua metode diantara spektrofotometri UV-Vis dan metode KCKT dibuat dalam tiga kosentrasi standar dari senyawa eugenol yang berbeda-beda dari kosentrasi 10,20 sampai dengan 30 ppm dari

ketiga replikasi tersebut dapat dilihat pada (Tabel 4). Hasil penelitian ini nilai RSD yang diperoleh sebesar 0,95% sehingga memenuhi syarat karena nilai kurang dari 2% (Rohman, 2009).

**Tabel 4.** Hasil uji presisi metode spektrofotometri UV-Vis dan KCKT

Metode	Konsentrasi (ppm)	Rerata kadar $\pm$ SD	%RSD
Spektrofotometri UV-Vis	10	10,24 $\pm$ 0,02	0,19
	20	20,15 $\pm$ 0,02	0,10
	30	28,91 $\pm$ 0,03	0,12
KCKT	10	10,24 $\pm$ 0,07	0,64
	20	19,75 $\pm$ 0,02	0,84
	30	28,17 $\pm$ 0,04	0,12

Hasil uji dari kedua metode spektrofotometri UV-Vis dan KCKT dapat dilihat pada (Tabel 4). Hasil tersebut menunjukan nilai %RSD <2%. Artinya ke dua metode tersebut presisi. Nilai dari %RSD yang memiliki nilai lebih kecil pada uji presisi menunjukan hasil yang sangat baik pada metode analisis (Pramod,

*et al.*, 2013). Hasil perbandingan kedua metode pada penelitian ini didapatkan hasil dari %RSD memiliki nilai yang lebih kecil pada metode spektrofotometri UV-Vis dibandingkan dengan metode KCKT. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ke dua metode tersebut memiliki perbedaan dalam analisis senyawa kimia eugenol. Metode spektrofotometri UV-Vis memiliki ketelitian yang lebih baik dibandingkan metode KCKT untuk analisis senyawa kimia eugenol.

#### Uji T test Data hasil penetapan kadar dari metode spektrofotometri UV dan KCKT

Data hasil uji secara statistik. Uji normalitas data menggunakan Kolmogorov Smirnov dan uji homogenitas data menggunakan tes Levene Statistic dan diperoleh kesimpulan bahwa data yang diuji normal dan homogen, ini dapat dilihat dari hasil signifikansi 0,200 > 0,05 yang artinya data tersebut homogen. Data selanjutnya dilakukan uji t untuk mengetahui perbedaan kadar eugenol dalam sediaan salep MABC basis larut air dari kedua metode tersebut. Hasil Uji t diperoleh nilai signifikansi kadar eugenol dari kedua metode yaitu 0,480 yang artinya kedua metode tersebut tidak berbeda bermakna.

**Tabel 5.** Hasil Uji t validasi metode spektro UV Vis dan KCKT

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of The Difference	
									Lower	Upper
Persen_ Recover y	Equal variances assumed	4.598	.048	4.374	16	.000	-6.37222	1.45699	9.46089	3.28355
	Equal variances not assumed			4.374	12.387	.001	-6.37222	1.45699	9.46089	3.28355

Hasil analisis pada tabel 5 diketahui bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara kedua metode yang digunakan untuk menentukan validasi kadar eugenol baik dengan spektro UV

vis ataupun KCKT. Dalam penelitian ini diketahui bahwa hasil penetapan kadar eugenol menggunakan spektrofotometri UV vis ataupun

KCKT sama-sama memenuhi persyaratan dan mempunyai kualitas yang baik.

Hasil penelitian ini secara keseluruhan dapat dinyatakan bahwa metode standar dengan sensitifitas, akurasi, dan presisi tinggi yang dapat digunakan untuk dalam analisis suatu sampel untuk menghasilkan suatu pengukuran kadar tetap pada setiap sampel. Namun dapat disarankan pada Industri obat sebaiknya disarankan menggunakan validasi metode spektrofotometri UV karena spektrofotometri UV lebih murah dibandingkan metode KCKT jika dilihat dari segi biaya.

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa kedua metode memenuhi persyaratan validasi. Hasil penetapan kadar menggunakan kedua metode memenuhi persyaratan menurut Farmakope Indonesia Edisi VI dengan kriteria hasil validasi metode menggunakan spektrofotometri UV menunjukkan linieritas ( $R = 0,9998$ ), presisi ( $CV = 0,137\%$ ), LOD  $0,190 \mu\text{g/mL}$ , LOQ  $0,632 \mu\text{g/mL}$ , akurasi (recovery =  $100,05\%$ ). Validasi metode menggunakan KCKT menghasilkan parameter linieritas ( $R = 0,998$ ), presisi ( $CV = 0,533\%$ ), LOD  $0,28 \mu\text{g/mL}$ , LOQ  $0,93 \mu\text{g/mL}$ , akurasi (recovery =  $106,43$ ). Kadar rata-rata kadar eugenol pada sediaan salep MABC basis larut air menggunakan spektrofotometri UV sebesar (%kadar =  $2,201 \pm 0,037$ ) sedangkan menggunakan KCKT sebesar (%kadar =  $3,191 \pm 0,023$ ). Kedua metode tidak memiliki perbedaan nyata berdasarkan uji beda *student test*, baik pada parameter validasi maupun hasil penetapan kadar eugenol

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kemenristek/ BRIN melalui mekanisme hibah Penelitian Tesis Magister dengan nomor kontrak : PTM-003/SKPP.TT/LPPM UAD/VI/2020. Selain itu peneliti juga mengucapkan terimakasih kepada Laboratorium Farmasi UAD dan teman teman yang telah banyak membantu selama proses penelitian juga Dr. Sundari, M.Pd dan Dr Bahtiar, M.Si yang telah memberikan bantuan dalam analisis data dan pemaknaan hasil analisis data dalam penelitian ini.

### Referensi

- Anief, M. (1997). *Ilmu Meracik Obat*. GajahMada University Press, Yogyakarta.
- AOAC. (2011). *Annex I: Validation Study Protocol*
- Astuti, R Harini, Dwi., & Wijayanti. (2012). Aplikasi Metode Spektrofotometri Visibel Untuk Mengukur Kadar Kurkuminoid Pada Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*). Prosiding Seminar Nasional Aplikasi Sains & Teknologi. Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta (SNAST) Periode III.
- Depkes RI. (1995). *Farmakope Indonesia, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia*, Jakarta, 4, 223, 1009, 1061.
- Devineni, J. (2017) New sensitive UV spectrophotometric method for simultaneous estimation of lopinavir and ritonavir in fixed dose combination as soft gels. *International Journal of Pharmaceutical Development & Technology*, 7 (1), 25-30.
- Dewi, D. R. N., Zakkia, L. U., Khoiruddin, W., & Harismah, K. (2018). Pengaruh pH Terhadap Lamanya Penyimpanan Sediaan Ekstrak Daun Seligi Dan Eugenol Dari Minyak Daun Cengkeh Sebagai Obat Antinyeri. *Prosiding SNST Fakultas Teknik*, 1(1)
- Dewi, D. R. N., Zakkia, L. U., Khoiruddin, W., & Harismah, K. (2018). Pengaruh pH Terhadap Lamanya Penyimpanan Sediaan Ekstrak Daun Seligi Dan Eugenol Dari Minyak Daun Cengkeh Sebagai Obat Antinyeri. *Prosiding SNST Fakultas Teknik*, 1(1).
- Kementerian Kesehatan RI. (2020). *Farmakope Indonesia edisi VI. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia*.
- Miller, J.C. and Miller, J.N. (1988). *Statistics for Analytical Chemistry, 2 ndEdition*, John Wiley & Sons, New York, 109-120.
- Miller, J.C. dan J.N. Miller. (1991). *Statistika Untuk Kimia Analisis*. Diterjemahkan oleh Suroso, ITB, Bandung.
- Mustariani, B. A. A., Rahmawati, S., & Aulia, N. H. (2021). Potensi Salep dari Fraksi Aktif Bawang Merah Bima (*Allium Sp*) Sebagai Penghambat Infeksi Sekunder Jamur Patogen Penyebab Luka Diabetes. *Jurnal*

- Kesehatan Bakti Tunas Husada, *Jurnal Ilmu-Ilmu Keperawatan, Analisis Kesehatan Dan Farmasi*, 21(2), 194–206.
- Pratimasari, D., Sugihartini, N., & Yuwono, T. (2015). Evaluasi Sifat Fisik Dan Uji Iritasi Sediaan Salep Minyak Atsiri Bunga Cengkeh Dalam Basis Larut Air. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 11(1), 9–15. <https://doi.org/10.20885/jif.vol11.iss1.art2>
- Putra, M. M., Dewantar, I., & Swastini, D. A. (2017). Pengaruh lama penyimpanan terhadap nilai pH sediaan cold cream kombinasi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia*
- Putra, M. M., Dewantar, I., & Swastini, D. A. (2017). Pengaruh lama penyimpanan terhadap nilai pH sediaan cold cream kombinasi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia Jacob et al* *Jurnal Kajian Veteriner* 49 mangostana L.), herba pegagan (*Centella asiatica*) dan daun gaharu (*Gyrinops versteegii* (gilg) Domke). *Jurnal Farmasi Udayana*, 3(1), 279745.
- Rohman, A. (2009). *Kromatografi Untuk Analisis Obat, Edisi pertama*, Cetakan Pertama, Graha Ilmu, Yogyakarta, 111.
- Salunke, J.M., Pawar, D.S., Chavhan, V.D., and Ghante, M.R. (2013). Simultaneous UV spectrophotometric method for estimation of ritonavir and lopinavir in bulk and tablet dosage form, *Der Pharmacia Lettre*, 5 (3), 156–162.
- Sari, A., & Maulidya, A. (2015). Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit (*Curcuma longa* Linn). *Sel Jurnal Penelitian Kesehatan*, 3(1), 16–23.
- Snyder, R.L., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L., (1997). *Practical HPLC Method Development, 2 nd Edition*, John Wiley & Son, Inc., New York, 686-697
- Sugihartini, N., Mugita Sari, D. E., Bachri, M. S., & Yuliani, S. (2019). *The Amount of  $\beta$ Carotene, Total Phenolic and Total Flavonoid of Ethanol Extract of Leaf Moringa Oleifera with Variation Concentration of Solvent*. 33–37. <https://doi.org/10.2991/adics-phs-19.2019.22>
- Susilowati, E., & Saptuti W, S. (2014). Optimasi Sediaan Salep Yang Mengandung Eugenol Dari Isolasi Minyak Cengkeh (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Indonesian Journal on Medical Science*, 1(2), 29–34.
- Wenzel, T. 2021. *Molecular and Atomic Spectroscopy*. LibreTexts. doi: 10.1021/ed010p308.
- Zulkarnain, A. K., Susanti, M., & Lathifa, A. N. (2013). Stabilitas fisik sediaan lotion o/w dan w/o ekstrak buah mahkota dewa sebagai tabir surya dan uji iritasi primer pada kelinci. *Traditional Medicine Journal*, 18(3), 141-150.