

VALIDASI METODE ANALISIS SENYAWA PIPERIN DALAM JAMU MENGGUNAKAN METODE KLT-DENSITOMETRI

Ariny Anggredi Mulyani¹, Budiman Yasir², Subehan¹, Muhammad Aswad¹

¹ Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

² Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi, Makassar, Indonesia

ABSTRAK

Piperin adalah senyawa marker bagi tanaman dengan famili Piperaceae. Senyawa ini mempunyai rasa yang khas dan dijadikan rempah-rempah, sumber makanan, dan diaplikasikan sebagai pengobatan tradisional jamu dan senyawa ini berguna pada berbagai penyakit sebagai antiproliferative, antitumor, antiangiogenesis, antioksidan, antidiabetes, antiobesitas, kardioprotektif, antimikroba, antipenuaan, hepatoprotektif, anti-alergi, anti-inflamasi, neuroprotektif, dan efek imunomodulator. Pengujian kadar piperin sebagai kontrol kualitas diperlukan pada obat tradisional karena piperin merupakan senyawa aktif berkhasiat sekaligus sebagai senyawa mayor dalam beberapa tanaman khususnya genus Piper. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode analisis senyawa piperin dan mendeteksi marker senyawa piperin dalam obat tradisional menggunakan KLT-Densitometri. Penelitian ini bersifat eksperimental meliputi validasi metode analisis senyawa piperin dengan konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm dan deteksi piperin dalam jamu CM, Jamu AU, dan jamu PS konsentrasi 100 ppm menggunakan KLT sebagai fase diam, dan heksan: etil asetat (2:1 v/v) sebagai fase gerak dan pada panjang gelombang 340 nm. Hasil penelitian menunjukkan koefisien determinasi pada untuk parameter linearitas yaitu 0,9985, simpangan deviasi (SD) 0,0004 – 0,0088, koefisien variasi 0,04-1,04, % recovery 92.46% - 105.65%, LoD = 2.93 ppm, dan LoQ = 9.79 ppm. Untuk pengujian kadar piperin dalam jamu, marker piperin dalam jamu dapat ditemukan dengan nilai Rf 0,37, dan kandungan kadar piperin terdeteksi dalam Jamu CM 66,49 ppm > Jamu AU 4,64 ppm > jamu PS 1,9 ppm. Penggunaan KLT Densitometri dalam validasi metode analisis dan kontrol kualitas senyawa dalam produk jamu dapat dilakukan dan menghasilkan nilai sesuai dengan syarat validasi dan mendeteksi marker senyawa dalam jamu dapat diaplikasikan dengan KLT-densitometri.

Kata Kunci :

Validasi, Piperin, Jamu, KLT-Densitometri

PENDAHULUAN

Piperin adalah senyawa marker bagi tanaman dengan famili Piperaceae. Senyawa ini banyak ditemukan pada tanaman lada, cabe jawa, cabe panjang, kemukus hingga sirih, memiliki kandungan yang bervariasi yang memberikan rasa yang khas sehingga dijadikan rempah-rempah, sumber makanan, dan diaplikasikan sebagai pengobatan tradisional pada berbagai penyakit. Berdasarkan laporan penelitian senyawa ini mempunyai banyak efek farmakologis seperti antiproliferative, antitumor, antiangiogenesis, antioksidan, antidiabetes, antiobesitas, kardioprotektif, antimikroba, antipenuaan, hepatoprotektif, anti-alergi, antiinflamasi, neuroprotektif, dan efek imunomodulator dalam berbagai uji coba eksperimental in vitro dan in vivo (1-4). Piperin berhasil diisolasi pada tanaman seperti buah Piper nigrum dengan kadar piperin sebesar 1,7-7,4%, bakal bunga dan buah Piper longum dengan kadar piperin sebesar 5-9%, buah Piper chaba, buah Piper guineense, dan akar, batang, daun serta buah Piper sarmentosum dengan range kadar > 0.03% dan <9% (2).

Tanaman ini di Indonesia digunakan sebagai pengobatan tradisional berupa Jamu yang telah dipraktikkan selama berabad-abad di masyarakat untuk menjaga kesehatan (5). Perkembangan obat tradisional dari jamu, obat herbal terstandar, dan fitofarmaka adalah jenis obat tradisional yang beredar dimasyarakat mendapat dukungan dari Pemerintah untuk turut mengembangkan pengobatan tradisional sebagai alternatif. Pengembangan obat tradisional saat ini mendapat dukungan penuh dari pemerintah dan

memberikan ruang yang penting bagi pelaku usaha mikro maupun industri obat tradisional. Pengembangan ini bertujuan menghasilkan inovasi baru, namun dilain sisi produk - produk baru ini juga harus dapat dipastikan keseragaman komponennya, keamanannya, khasiatnya dan manfaatnya (6). Sebelum dinyatakan menjadi obat herbal tersatandar maka bahan baku obat tradisional harus melalui prosedur terstandarisasi terlebih dahulu (7). Prosedur terstandarisasi ini dilakukan untuk memastikan bahwa bahan baku obat herbal secara metode tervalidasi menganalisis kandungan piperin yang terkandung dalam beberapa sediaan herbal seperti jamu (17).

Farmakope Herbal Indonesia telah menjadi acuan standar mutu untuk bahan baku obat tradisional yang di dalamnya terdapat monografi simplisia dan ekstrak, persyaratan mutu hingga metode dan peralatan untuk analisisnya. Namun, metode analisis yang mendukung mutu obat tradisional dalam sediaan jamu belum banyak dikembangkan (18). Beberapa jenis jamu yang diketahui mengandung lada hitam, lada panjang maupun cabe jawa banyak beredar di pasaran seperti jenis jamu cabe-puyang, jamu encok/pegal linu, jamu masuk angin maupun jamu asam urat. Untuk menilai mutu sediaan jamu tersebut diperlukan marker, dan piperin sebagai senyawa mayor dalam lada/cabe dapat digunakan sebagai marker yang tepat untuk penilaian awal terhadap mutu jamu.

Analisis piperin dapat dilakukan menggunakan metode LC-MS/MS (8), KCKT (9), spektrofotometri UV-Vis (10) panjang gelombang 328 nm dengan hasil absorbansi yang baik yaitu

Masuk 06-12-2022

Revisi 30-08-2023

Diterima 04-09-2023

DOI: 10.20956/mff.v27i3.24411

Korespondensi

Muhammad Aswad

aswadfar@unhas.ac.id

Copyright

© 2023 Majalah Farmasi Farmakologi Fakultas Farmasi - Makassar

Diterbitkan tanggal 30 Desember 2023

Dapat Diakses Daring Pada:

<http://journal.unhas.ac.id/index.php/mff>



0.5-0.8, dan kromatografi lapis tipis (KLT) Densitometri (11). Instrumen analisis LC-MS/MS, KCKT, dan spektrofotometri cukup sulit untuk dilakukan, membutuhkan pelarut yang banyak dan biaya yang mahal, sedangkan penggunaan KLT Densitometri dapat digunakan untuk mendeteksi piperin pada panjang gelombang 340 nm, dengan keunggulan sederhana, cepat, ekonomis dan bersifat lebih selektif dibandingkan metode lain. Pada penelitian ini, akan dilakukan validasi metode analisis senyawa piperin dengan metode KLT Densitometri dan mendeteksi marker piperin pada sediaan jamu yang beredar di Makassar. Validasi metode analisis yang dilakukan bertujuan untuk menghasilkan metode yang valid dari instrumen KLT-Densitometri untuk mendeteksi piperin terhadap senyawa lain yang terdapat dalam jamu dan validasi piperin dilakukan meliputi linearitas, akurasi, presisi, LoD dan LoQ serta menentukan kurva kalibrasi (12).

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat - alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain mikropipet, timbangan analitik, plat KLT silika gel F254, chamber, UV-Box, CAMAG TLC – Scanner Densitometri, pompa vakum, corong buchner, sonikator, labu ukur, labu alas bulat, sendok tanduk, pipa kapiler, gelas beker, labu tentu ukur, labu erlenmeyer, vial, dan alat-alat gelas. Bahan- bahan yang digunakan adalah jamu AU, jamu CM, jamu PS, piperin (merck, purity≥90%), metanol PA (merck), etil asetat (merck) dan n-heksan (merck), kertas saring, kertas whatmann, silika gel F254, metanol, dan etanol 96%.

Prosedur kerja

Pembuatan larutan baku piperin

Baku piperin ditimbang 10 mg dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, kemudian ditambahkan asetonitril sampai 10 mL (larutan stok 1000 ppm) dan disonikasi selama 15 menit. Kemudian diencerkan menjadi sampel 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm. Kemudian larutan baku sampel ditotolkan pada lempeng KLT silika gel F254 dengan panjang lempeng 10 cm dan lebar 10 cm, batas bawah 2 cm, batas atas 0.5 cm, jarak eluen 7.5 cm, kemudian dielusi menggunakan n-heksan: etil asetat (2:1 v/v) dan dianalisis densitometri diperoleh nilai area setiap sampel. Kurva kalibrasi dibuat mengkorelasikan nilai area dan konsentrasi piperin yang digunakan.

Linearitas

Sampel baku piperin masing – masing 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm yang ditotolkan pada lempeng KLT silika gel F254 sebanyak 4 µl, kemudian dielusi dengan eluen n-heksan: etil asetat (2:1 v/v) dan dianalisis dengan densitometri hingga diperoleh nilai area masing-masing sampel, setiap sampel dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Masing-masing replikasi dihitung koefisien determinasi (R²) dari analisis regresi linier dengan persamaan ($y = bx + a$) (13, 15).

Presisi

Sampel baku piperin 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm yang ditotolkan pada lempeng KLT silika gel F254 sebanyak 4 µl, kemudian dielusi dengan eluen n-heksan: etil asetat (2:1 v/v) dan dianalisis dengan densitometri hingga diperoleh nilai area masing – masing sampel, setiap sampel dilakukan replikasi sebanyak 5 kali. Presisi dihitung dengan cara berikut (13, 15, 16).

a. Standar deviasi (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

b. Koefisien variasi (KV)

$$KV = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

Penentuan Kadar EGCG dalam Plasma dengan Metode Ultra-Fast Liquid Chromatography

Sampel baku piperin 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm yang ditotolkan pada lempeng KLT silika gel F254 sebanyak 4 µl, kemudian dielusi dengan eluen n-heksan: etil asetat (2:1 v/v) dan dianalisis dengan densitometri hingga diperoleh masing - masing nilai area sampel. Setiap sampel dilakukan replikasi sebanyak 5 kali. Akurasi dapat dihitung melalui % perolehan kembali (% recovery) dengan rumus (13, 15, 16):

$$\% Recovery = \frac{\text{Konsentrasi terukur}}{\text{Konsentrasi sebenarnya}} \times 100\%$$

Uji Batas Deteksi (LoD) Dan Batas Kuantitasi (LoQ)

Konsentrasi analit terkecil yang masih dapat terdeteksi (LoD) dan Kterdeteksi secara kuantitatif (LoQ) dihitung secara statistik melalui garis linier dari kurva baku piperin, setelah diperoleh data simpangan baku respon analitik dari blanko dan slope (b) pada persamaan garis ($y = a + bx$). LoD dan LoQ dihitung berdasarkan rumus (13, 15, 16).

$$LoD = \frac{3.S(\frac{y}{x})}{Slope}; LoQ = \frac{10.S(\frac{y}{x})}{Slope}$$

Penetapan Kadar piperin dalam Jamu

Simplisia jamu AU, jamu CM, dan jamu PS ditimbang 5 g, kemudian ditambahkan 50 ml etanol 96%, kemudian diekstraksi sonikasi 30 menit setiap sampel, disaring menggunakan kertas whatmann dan kertas saring dengan bantuan pompa vacum, sehingga diperoleh ekstrak cair masing-masing sampel, dikeringkan diatas waterbath suhu 40 0C sampel diperoleh ekstrak kering jamu AU sebesar 0.5802 g, jamu PS 3.7455 g, dan jamu CM sebesar 0.3082 g. Masing – masing jamu dibuat konsentrasi sebesar 100 ppm, kemudian ditotolkan sebanyak 4 µl pada lempeng KLT silika gel F254, kemudian dielusi menggunakan n-heksan: etil asetat (2:1 v/v) dan dianalisis dengan densitometri hingga diperoleh area masing – masing sampel serta konsentrasi piperin dihitung dengan menggunakan persamaan kurva baku.

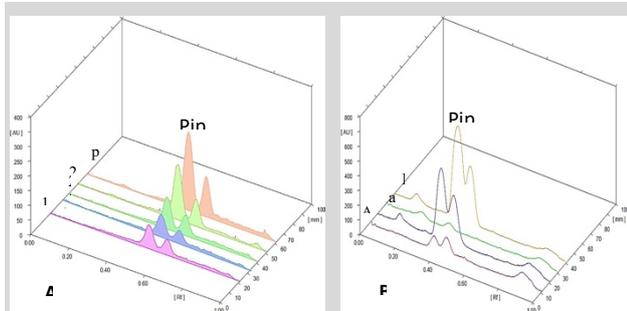
Analisis Data

Data hasil pengukuran area masing – masing sampel menggunakan KLT-densitometri dilakukan perhitungan hasil analisis menggunakan microsoft excel untuk menentukan rata – rata area sampel, persamaan regresi linear, koefisien determinasi, standar deviasi, koefisien variasi, kurva kalibrasi, %recovery, SD dan KV kemudian ditarik kesimpulan dengan membandingkan referensi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

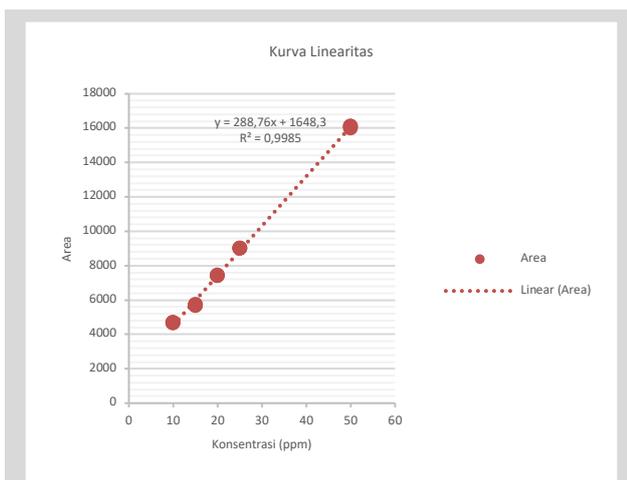
Pada pengujian validasi metode analisis senyawa marker piperin menggunakan KLT-Densitometri pada panjang gelombang maksimum 343 nm. Adapun range panjang gelombang yang digunakan dalam penelitian ini 200 - 700 nm

menggunakan fase diam silika gel 60 F254, dan fase gerak heksan dan etil asetat (2:1), kemudian ditotol 4 μ l dengan sampel baku piperin 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm sebanyak 3 replikasi dengan kecepatan scanning 20 mm/s, data resolusi 100 μ m/step. Senyawa piperin terdeteksi pada nilai Retardation factor (Rf) 0.53, penggunaan KLT dalam mendeteksi senyawa piperin memberikan resolusi yang baik seiring meningkatnya konsentrasi dari 10 ppm hingga 50 ppm seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Densitogram baku piperin (A) dan jamu AU, CM, dan PS (B)

Kurva kalibrasi atau kurva baku merupakan kurva yang menunjukkan hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit dengan beberapa seri konsentrasi baku. Pembuatan kurva baku pada penelitian ini menggunakan seri konsentrasi baku piperin 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm seperti pada Gambar 2. Penelitian ini menggunakan metode KLT-Densitometri sehingga respon yang didapat adalah dalam bentuk area densitogram. Kurva baku digunakan untuk analisis secara kuantitatif baku piperin sehingga akan didapat persamaan regresi linear ($y = bx + a$), (y) menunjukkan respon area, (a) merupakan intersep dan (b) adalah slope. Dari persamaan regresi linear juga akan didapatkan nilai R^2 (koefisien determinasi) yang menunjukkan linearitas dari suatu metode. Kurva baku dapat dikatakan linear ketika memiliki nilai koefisien determinasi (R^2) lebih besar dari 0,99 (14).



Gambar 1. Kurva kalibrasi baku Piperin

Kurva baku yang digunakan memiliki nilai koefisien determinasi lebih dari 0,99882 sehingga kurva baku bersifat linear dengan persamaan ($y=292.08x+1631.1$). Koefisien determinasi adalah parameter suatu metode yang menunjukkan hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit. Konsentrasi yang digunakan adalah batas terendah dan tertinggi dari kurva baku dimana metode masih memenuhi persyaratan validasi. Tujuan dari dibuatnya konsentrasi kurva baku adalah untuk memastikan respon instrumen terhadap analit yang berada di luar kurva tetap berada dalam konsentrasi yang ditetapkan dan kadar piperin dalam analit tidak mengalami ekstrapolasi. Konsentrasi kurva baku

diperoleh dengan menambahkan konsentrasi di atas titik tertinggi kurva baku dan konsentrasi di bawah titik terendah dari seri konsentrasi baku yang telah ditetapkan. Pada penelitian ini, seri konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm digunakan sebagai konsentrasi dengan 3 replikasi. Data ketiga replikasi konsentrasi dapat dilihat pada (Tabel 1 dan Gambar 1).

Tabel 1. Lineritas baku piperin menggunakan KLT-Densitometri

Konsentrasi (ppm)	Area		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
10	4699.1	4681.9	4671.8
15	5721.1	5733.5	5653.0
20	7406.4	7432.4	7442.4
25	9012.1	9015.4	9014.1
50	16092.4	16002.2	16100.8

$Y = 288.76x + 1648.3$; $r^2 = 0.9985$

Keterangan: y (Persamaan regresi linear); R^2 (Koefisien determinasi).

Penentuan Lineritas dilakukan untuk menunjukkan adanya hubungan yang linier antara kadar senyawa yang diukur dengan respon detektor. Berdasarkan data diperoleh dari 3 replikasi dengan nilai koefisien determinasi 0.9985 sesuai dengan range (R^2) mendekati 1) nilai ini menunjukkan bahwa tiap replikasi menunjukkan hubungan yang saling berkorelasi di tiap replikasi dan memenuhi persyaratan seperti pada (Tabel 1).

Presisi dan Akurasi berdasarkan AOAC tahun 2019, suatu metode analisis yang diuji dikatakan memenuhi parameter presisi ditunjukkan dari nilai persen koefisien variasi (KV) atau persen relative standard deviation (%RSD). Berdasarkan data yang disajikan pada Tabel 2, data parameter akurasi dan presisi pengujian kadar piperin dengan metode KLT densitometri meliputi % recovery 92.46% - 105.65%. SD 0.0004–0.0088, koefisien variasi 0.04-1.04, Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa metode analisis baku piperin yang diuji memenuhi parameter presisi dan akurasi seperti pada (Tabel 2).

Tabel 2. Akurasi dan presisi baku piperin menggunakan KLT Densitometri

Sampel	Area	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata konsentrasi (ppm)	% Recovery	Rata-rata % Recovery	SD (ppm)	%RSD
15	5721,1	14,10	14,03	94,03%	93,52%	0,0097	1,04%
15	5733,5	14,15		94,32%			
15	5653	13,87		92,46%			
15	5733,5	14,15		94,32%			
15	5653	13,87		92,46%			
20	7406,4	19,94	20,03	99,70%	100,13%	0,0026	0,25%
20	7432,4	20,03		100,15%			
20	7442,4	20,07		100,33%			
20	7432,4	20,03		100,15%			
20	7442,4	20,07		100,33%			
25	9012,1	25,50	25,51	102,01%	102,05%	0,0004	0,04%
25	9015,4	25,51		102,05%			
25	9014,1	25,51		102,03%			
25	9019,3	25,53		102,11%			
25	9014,1	25,51		102,03%			

Keterangan: SD (Standar Deviasi); %RSD (Relative Standard Deviation).

LoD (Limit of detection) dan batas kuantitasi (LoQ= Limit of quantification) ditentukan dengan membuat kurva linier antara konsentrasi sampel uji dengan luas area yang didapatkan. Batas deteksi dapat dihitung secara statistik dengan garis linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran

akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier ($y = bx+a$), sedangkan simpangan blanko = simpangan baku residual atau Sy/x , diperoleh $LoD = 2.938$ ppm, dan $LoQ = 9.794$ ppm seperti pada (Tabel 4) (Harmita, 2004).

Tabel 3. LoD dan LoQ baku piperin menggunakan KLT Densitometri

Konsentrasi (X)	Luas area (Y)	Yi	Y-Yi	(Y-Yi) ²		
5	3601.266667	3277.05	324.2166667	105116.4469	3.S(y/x)	839.5150017
10	4667.083333	4705.7	-38.61666667	1491.246944	Slope	285.7309
15	5696.666667	6134.35	-437.6833333	191566.7003	LoD	2.938131654
20	7549.583333	7563	-13.41666667	180.0069444		2.938 ppm
25	9098.716667	8991.65	107.0666667	11463.27111	10.S(y/x)	279.8383339
50	16193.38333	16134.9	58.48333333	3420.300278		2798.383339
			$\Sigma(Y-Yi)^2$	313237.9725	LoQ	9.793772179
			$S(y/x)^2$	78309.49312		9.794 ppm
			$S(y/x)$	279.8383339		

Keterangan: LoD (Limit of Detection); LoQ (Limit of Quantification).

Pengukuran kandungan baku piperin dalam ekstrak jamu AU, jamu CM, dan jamu PS menggunakan KLT Densitometri dapat dilakukan, pengukuran dengan masing - masing sampel 100 ppm, mampu terdeteksi kadar piperin dalam jamu AU 4.6 ppm mengandung simplisia Piper nigri fructus 0.035 g, jamu CM 66.49 ppm mengandung simplisia Piper nigri fructus 2.4 g, dan jamu PS 1.9 ppm mengandung simplisia Piper nigri fructus 0.0045 g, sedangkan baku piperin 104.17 ppm.

Senyawa baku piperin yang terdeteksi ada dalam jamu mempunyai nilai R_f sebesar 0.37 dengan kadar baku piperin > Jamu CM > Jamu AU

> Jamu PS. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan KLT Densitometri dapat digunakan untuk mendeteksi marker tanaman seperti pada Tabel 4 dan Gambar 1.

Tabel 4. Deteksi kadar piperin dalam jamu menggunakan KLT Densitometri

Sampel (ppm)	Jamu/baku	Piperis nigri fructus (g)	Area	Konsentrasi (ppm)	Kadar Piperin terdeteksi (g/L)	Kadar Piperin Referensi (%)
100	Jamu AU	0.035	3172.9	4.64	0.002	1.7–7.4 (4)
	Jamu CM	2.4	20845.2	66.49	1.7	
	Jamu PS	0.0045	1306.2	1.9	0.08	
	Piperin	-	31611.5	104.17	-	

Keterangan: AU, CM, dan PS (Kode jamu)

Penelitian ini menunjukkan bahwa metode KLT-Densitometri memiliki sensitifitas dan keakuratan yang baik dalam mendeteksi dan menentukan kadar piperin dalam sediaan jamu. Hal ini dapat menjadi referensi metode yang tentunya murah dan sederhana serta dapat diterapkan di industri obat

tradisional sebagai salah satu cara penilaian awal dari mutu sediaan jamu. Penggunaan piperin sebagai marker tentunya terbatas pada sediaan jamu yang mengandung bahan jenis lada seperti lada hitam, lada panjang, cabe jawa, dan kemukus.

KESIMPULAN

Dari studi diatas dapat disimpulkan bahwa validasi metode analisis menggunakan KLT Densitometri memenuhi syarat validasi dengan koefisien determinasi untuk parameter linieritas yaitu 0.9985, % recovery 92.46% - 105.65%. SD 0.0004 – 0.0088, koefisien variasi 0.04-1.04. LoD 2.938 ppm, dan LoQ = 9.794 ppm. Penggunaan KLT Densitometri dalam mendeteksi marker piperin dalam jamu dapat dilakukan dan diperoleh dengan 100 ppm sampel ekstrak kadar baku piperin 104.17 ppm > Jamu CM 66.49 ppm > Jamu AU 4.6 ppm > Jamu PS 1.9 ppm. Penggunaan KLT Densitometri dalam mendeteksi senyawa dalam bahan alam sangat penting untuk keperluan validasi dan standarisasi bahan yang digunakan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kami ucapkan kepada Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar yang telah mendukung dalam penyiapan bahan dan alat penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariastuti, R., & Fransiska, E. Profil Penggunaan Obat Tradisional Sebagai Pengobatan Alternatif Pada Masyarakat Di Desa Kalijirak, Karanganyar. *Jurnal Ilmu Keperawatan Indonesia (JIKI)*. 2019; 12(1).
- de Oliveira, A. C., Simões, R. C., Lima, C. A., da Silva, F., Nunomura, S. M., Roque, R. A., Tadei, W. P., & Nunomura, R. (2022). Essential oil of Piper purusanum C. DC (Piperaceae) and its main sesquiterpenes: bio-defensives against malaria and dengue vectors, without lethal effect on non-target aquatic fauna. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022;1-12. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19196-w>
- Febriyanti, A. P., Iswarin, S. J., & Susanti, S. Penetapan Kadar Piperin dalam Ekstrak Buah Lada Hitam (Piper Nigrum Linn.) Menggunakan Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (Lc-ms/ms). *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*. 2018;1(2), 69-79.
- Haq, I. U., Imran, M., Nadeem, M., Tufail, T., Gondal, T. A., & Mubarak, M. S. Piperine: A review of its biological effects. *Phytotherapy Research*. 2021; 35(2), 680-700.
- Hikmawanti, N. P. E., Hariyanti, C. A., & Viransa, V. P. Kandungan piperin dalam ekstrak buah lada hitam dan buah lada putih (Piper nigrum L.) yang diekstraksi dengan variasi konsentrasi etanol menggunakan metode KLT- densitometri. *Media Farmasi*. 2016;13(2), 173-185.
- Kumala Sari, L. O. R. Pemanfaatan obat tradisional dengan pertimbangan manfaat dan keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2006; 3(1), 1.
- Kusumo, A. R., Wiyoga, F. Y., Perdana, H. P., Khairunnisa, I., Suhandi, R. I., & Prastika, S. S. Jamu tradisional Indonesia: tingkatkan imunitas tubuh secara alami selama pandemi. *Jurnal Layanan Masyarakat (Journal of Public Services)*. 2020; 4(2), 465-471.
- Marques, A. M., & Kaplan, M. A. C. Active metabolites of the genus Piper against Aedes aegypti: natural alternative sources for dengue vector control. *Universitas Scientiarum*. 2015; 20(1), 61- 82.
- Murpratiwi, R., Jati, S. P., & Suparwati, A. Analisis kesiapan asosiasi pengobat tradisional terhadap rencana
- implementasi Peraturan Pemerintah Nomor 103 Tahun 2014 tentang Pelayanan Kesehatan Tradisional di kota Semarang. *Jurnal Kesehatan Masyarakat (Undip)*. 2016;4(1), 65-75.
- Mustamin, M. I., Rustam, N., & Kasman, K. Analisis Nilai Absorbansi Kadar Flavonoid Daun Sirih Merah (Piper Crocatum) Dan Daun Sirih Hijau (Piper betle L). *Gravitasi*. 2016; 15(1).
- Mustika, m. pengaruh ph cairan penyari terhadap kadar metabolit sekunder dalam ekstrak etanol biji jarak (Ricinus communis l.)= the effect of solvent pH on secondary metabolite concentration in the ethanolic extract of castor beans (Ricinus communis l.). (Skripsi, universitas hasanuddin). 2021; Tersedia: <http://repository.unhas.ac.id/eprint/6374/2/N11116059-skripsi%201-2.pdf>
- Pasaribu, L. D. penetapan kadar kurkumin dalam sediaan kapsul lunak obat herbal terstandar merk rheumakur® yang beredar di pasaran dengan metode kromatografi lapis tipis–densitometri. (Skripsi, universitas sanata dharma). 2011; Tersedia: <https://core.ac.uk/download/pdf/153436589.pdf>
- Harmita, H. (2004). Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2004; 1(3), 1.
- AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. 2002; Tersedia: URL<http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/Standards/Development_SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf> Accessed 14.04.2016
- Sugihartini, N., Fudholi, A., Pramono, S., & Sismindari, S. Validasi metode analisa penetapan kadar epigalokatekin galat dengan KLT densitometri. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. 2012; 2(1), 81- 87.
- Tambunan, V. M. (2011). Penetapan Kadar Kurkumin Dalam Sediaan Cair Obat Herbal Terstandar (OHT) Merk Kiranti Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis KLT-Densitometri. (Skripsi, universitas sanata dharma). 2011; Tersedia: https://repository.usd.ac.id/17608/2/078114122_Full.pdf
- Yuslianti, E. R., Bachtiar, B. M., Suniarti, D. F., & Sudjiatmo, A. B. Standardisasi farmasitikal bahan alam menuju fitofarmaka untuk pengembangan obat tradisional Indonesia. *Dentika Dent J*. 2016;19(2), 179-185.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Farmakope Herbal Indonesia Edisi III, 2017, 272...