

Development and Validation of Analytical Method for Piperine in Phytopharmaceutical Product Containing Cabe Jawa Fructus by HPLC

Wening Galih^{1,2}, Benny Permana¹, and Sophi Damayanti^{1*}

¹Pharmacochemistry Research Group, School of Pharmacy, Institut Teknologi Bandung, Bandung, Indonesia

²National Agency of Drug and Food Control, Jakarta, Indonesia

Abstract

Cabe Jawa fruit (*Retrofractii fructus*) has empirically known to have effects such as anti-inflammatory and analgesic due to the presence of piperine. The maximum daily dose for piperine is 0.300–0.540 mg/kg/person/day. A reliable analytical method is required to ensure that phytopharmaceutical preparation is safe. This study developed and validated a piperine analysis method using phytopharmaceutical samples containing Cabe Jawa. A Shimadzu prominence HPLC SIL-20A Prominence autosampler and an X-Bridge C18 column (5 m x 250 mm x 4.6 mm) were used in the research devices. The OFAT method optimised the mobile phase, instrument systems, and sample preparation. The instrument system was optimized for acetonitrile:1% glacial acetic acid (48:52), 40°C, and a 1 mL/min flow rate. Each solid and liquid sample was prepared using the multilevel methanol dilution and water-dichloromethane liquid-liquid extraction (LLE) method. The results of validating the analytical procedures for solid and liquid samples were LOD and LOQ of 1.290 g/mL and 4.300 g/mL, 1.310 g/mL and 4 g/mL, respectively. Precision: 0.157% and 1.174%. Accuracy for three different concentrations were 94.232±1.050%, 95.387%±0.176%, and 96.272±1.043%; 88.801±0.428%, 89.473 ±0.252%, and 89.338 ±0.052% respectively. The analysis of the sample's piperine revealed that this method met the criteria for the validation parameters.

Keywords: Analysis Method, HPLC, Piperine, *Retrofractii fructus*, Validation

Formulasi dan Evaluasi Sediaan Parfum dari Bahan Pewangi Alami dengan Minyak Nilam

Abstrak

Buah Cabe Jawa (*Retrofractii fructus*) merupakan bahan alam yang dimanfaatkan pada sediaan fitofarmaka, dengan efek farmakologis berupa analgesik dan antiinflamasi karena adanya kandungan piperin. Piperin memiliki dosis maksimum harian 0,300-0,540 mg/kg/org/hari. Dibutuhkan metode analisis valid untuk menjamin keamanan sediaan fitofarmaka. Tujuan penelitian ini adalah melakukan pengembangan dan validasi metode analisis piperin pada sampel fitofarmaka dengan kandungan buah Cabe Jawa menggunakan metode KCKT. Instrumen penelitian menggunakan Shimadzu prominence HPLC SIL-20A Prominence autosampler dan kolom X-Bridge C18(5 µm x 250 mm x 4.6 mm). Metode OFAT digunakan untuk optimasi fase gerak, sistem instrumen dan preparasi sampel. Hasil optimasi sistem instrumen yaitu fase gerak asetronitril:1% asam asetat glasial (48:52), suhu 40°C dan laju alir 1 mL/menit. Metode preparasi sampel padat berupa pengenceran metanol bertingkat dan Ekstraksi Cair Cair (ECC) air:diklorometan pada preparasi sampel cair. Hasil penelitian validasi metode analisis sampel padat dan sampel cair berturut turut yaitu LOD dan LOQ 1,290 µg/mL dan 4,300 µg/mL; 1.31 µg/mL dan 4 µg/mL. Presisi 0,157% dan 1.174%. Akurasi pada tiga konsentrasi berbeda 94.232 ± 1,050%; 95,387% ± 0,176% dan 96,272 ± 1,043%; 88,801 ± 0,428%; 89,473 ± 0,252% dan 89,338 ± 0,052%. Hasil penetapan kadar piperin dalam sampel menunjukkan metode ini memenuhi persyaratan parameter validasi.

Kata Kunci: HPLC, Metode Analisis, Piperin, *Retrofractii fructus*, Validasi.

Article History:

Submitted 07 April 2023

Revised 01 June 2023

Accepted 04 June 2023

Published 28 February 2025

*Corresponding author:

sophi.damayanti@itb.ac.id

Citation:

Galih, W.; Permana, B.; Damayanti, S. Development and Validation of Analytical Method for Piperine in Phytopharmaceutical Product Containing Cabe Jawa Fructus by HPLC. Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2025; 12 (1), 36-42.

1. Pendahuluan

Cabe Jawa (*Retrofracti fructus*) adalah tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai bahan baku sediaan obat tradisional. Dari data daftar produk Obat Modern Asli Indonesia (OMAI) yang tercatat hingga April 2020, terdapat 25 jenis produk fitofarmaka yang secara resmi terdaftar di BPOM-RI. Beberapa dari produk tersebut menggunakan buah cabe jawa sebagai komposisi pada sediaanannya, dengan kategori fungsi obat yang berbeda. Buah Cabe Jawa memiliki kandungan metabolit sekunder yang membuatnya berkhasiat, yaitu piperin. Piperin merupakan metabolit sekunder golongan alkaloid dengan aktivitas antipiretik, analgesik dan antiinflamasi. Efek samping seperti gangguan pada fungsi hati, dan ginjal terjadi pada pemakaian jangka panjang dan dosis yang besar, sehingga ditetapkan batas penggunaan maksimal hariannya yaitu 0,3-0,54 mg/kg/org/hari.^{1,2,3,4,5}

Penelitian analisis piperin pernah dilakukan sebelumnya. Namun penelitian terbatas pada sampel dan instrumen analisis yang digunakan. Penelitian lain dilakukan pada simplisia buah Cabe Jawa dan tablet kombinasi resveratrol dan piperin murni dengan menggunakan KCKT. Penggunaan sampel simplisia dan sediaan obat dengan kandungan piperin murni dianggap belum merepresentasikan kondisi sediaan piperin pada sediaan fitofarmaka dengan kandungan senyawa yang lebih kompleks.^{6,7}

Metode KCKT merupakan teknik yang dimanfaatkan secara luas untuk menganalisis banyak senyawa baik secara kualitatif maupun kuantitatif, tidak destruktif dengan kecepatan serta kepekaan tinggi.

Pengembangan metode analisis piperin pada sediaan fitofarmaka dengan metode KCKT belum pernah dilakukan sebelumnya.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan dan memvalidasi metode analisis piperin yang dapat diaplikasikan pada obat fitofarmaka berbagai sediaan dengan menggunakan instrumen KCKT untuk menjamin keamanan penggunaan produk fitofarmaka.

2. Bahan dan Metode

2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas yang umum ada di laboratorium, botol vial KCKT 1,5mL (Shimadzu-Jepang), botol KCKT 1L (Pyrex-Amerika), *micropipette* 1-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L dan 0,1-5mL (Eppendorf-Jerman), *syringe filter* polytetrafluoroethylene (PTFE) (Agilent Jerman), syringe 10 mL (Terumo-Jepang), waterbath

(Fisher-Amerika), vortex (Thermo- Pittsburgh), *shaker* (Thermo-Pittsburgh), pH meter (Metler Toledo), kertas pH universal (Merck-Amerika), kolom KCKT X-Bridge C18 250mm x 5 μ m x 4,6mm (Waters- Massachusetts), Detektor DAD, instrumen KCKT Shimadzu Prominence HPLC SIL-20A Prominence auto sampler (Shimadzu-Jepang).

2.2. Bahan

Baku standar piperin (Markherb), sampel matriks dan sampel fitofarmaka dengan kandungan ekstrak buah Cabe Jawa yang beredar dipasaran, etanol grade PA (Merck), metanol grade KCKT (Merck), diklorometana grade PA (Merck), natrium sulfat anhidrat grade PA (Merck), asam asetat glasial grade PA (Merck), asam klorida (HCl) 1N (Merck), kalium hidroksida (KOH) 1N (Merck) dan aquades.

2.3. Prosedur

2.3.1. Tahap Penyiapan Larutan

Pembuatan Larutan Baku Standar

Ditimbang 10 mg baku piperin, kemudian dilarutkan dalam labu ukur cokelat 10 mL pelarut ditambahkan hingga tanda batas. Didapatkan konsentrasi larutan baku sebesar 1.000 μ g/mL.

Pembuatan Seri Larutan Pembanding untuk Kurva Kalibrasi

Dibuat sejumlah seri larutan pembanding dengan konsentrasi 1, 5, 25, 50, 75, 100 dan 125 μ L/mL dengan menggunakan baku stok piperin dalam labu ukur cokelat 10 mL.

Pembuatan Larutan Matriks

Prosedur disamakan dengan pembuatan larutan uji.

Pembuatan Larutan Uji Sediaan Padat

Dimasukkan sebesar satu kali dosis sampel matriks dan sejumlah tertentu piperin ke dalam labu Erlenmeyer 100 mL, ditambahkan 30 mL metanol, larutan dihomogenkan (Larutan A). Larutan A dipipet ke dalam labu ukur cokelat 10mL dan ditambahkan pelarut hingga tanda batas (Larutan B). Larutan B disaring dengan membran PTFE ke dalam vial KCKT 1,5 mL.

Pembuatan Larutan Uji Sediaan Cair

Dimasukkan sebesar satu kali dosis sampel matriks

dan sejumlah tertentu piperin dalam labu Erlenmeyer 100 mL, lalu ditambahkan 30 mL air. Selanjutnya larutan ditambahkan HCl 1 N hingga pH 12, dikocok selama 15 menit. Selanjutnya larutan sampel ditambahkan KOH hingga pH 10 dan dihomogenkan kembali (Larutan A). Larutan A diekstraksi dengan pelarut diklorometan sebanyak tiga kali masing masing 30 ml. Fraksi pelarut diklorometan ditampung dan ditambahkan sejumlah natrium sulfat anhidrat kemudian diaduk dan diambil fase larutannya (Larutan B). Larutan B dikeringkan dalam waterbath. Ekstrak kering kemudian dilarutkan dengan pelarut asetonitril. Larutan disaring dengan menggunakan membran PTFE ke dalam vial KCKT 1.5 mL.⁸

Pembuatan Larutan Spiked Sample

Dipipet sejumlah konsentrasi piperin tertentu dari larutan baku stok pembanding ke dalam sampel matriks sehingga diperoleh konsentrasi sebagai berikut: 27; 40.5; 43.2; 54; 64.8; 67.5 dan 81 µg/mL. Dilakukan preparasi uji sampel yang sama dengan prosedur pembuatan larutan uji.

2.3.2. Tahap Optimasi

Optimasi Fase Gerak

Terdapat tiga jenis sistem fase gerak yang didapatkan dari hasil studi pustaka jurnal, antara lain: metanol:air (7:3); Larutan A (asetonitril:air (95:5) pH 4 asam asetat glasial) dan Larutan B (metanol) (7:3) dan asetonitril:1% asam asetat glasial (48:52). Dilakukan optimasi terhadap masing-masing sistem fase gerak yang meliputi suhu kolom dan laju alir.^{7,9,10}

Suhu Kolom

Optimasi dilakukan dengan membuat variasi suhu 30, 40, 50, dan 60°C.

Laju Alir

Optimasi dilakukan dengan membuat variasi laju alir 0.8; 1; 1.2 dan 1.5 mL/menit.

Optimasi Pelarut Baku Piperin

Optimasi dilakukan terhadap pelarut yang akan digunakan untuk melarutkan baku standar piperin yaitu metanol dan etanol. Larutan baku standar piperin dibuat dengan konsentrasi 54 µg/mL masing-masing dengan pelarut metanol dan etanol. Larutan diinjeksi ke dalam sistem KCKT.

2.3.3. Uji Kesesuaian Sistem (UKS)

UKS dilakukan dengan menyuntikkan sebanyak enam kali larutan baku piperin pada konsentrasi 100%.

2.3.4. Tahap Validasi Metode Analisis

Spesifisitas/selektivitas

Parameter ditetapkan dengan menyuntikkan masing-masing sebanyak tiga kali pelarut, larutan baku piperin, larutan matriks, dan larutan spiked sampel.

Linearitas

Parameter ditetapkan dengan menyiapkan tujuh seri konsentrasi spike sampel yang disuntikkan ke dalam sistem KCKT sebanyak tiga kali. Persamaan regresi linier diperoleh dengan memplot konsentrasi piperin terhadap luas area piperin sehingga diperoleh persamaan garis $Y=bx+a$. Persamaan regresi linier dilakukan sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (r) dan koefisien variasi fungsi regresi (V_{xo}).

LOD dan LOQ

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung secara statistik melalui persamaan garis regresi linear yang diperoleh. dengan rumus sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= 3,3\hat{\sigma}/S \dots\dots\dots 1 \\ \text{LOQ} &= 3,3\hat{\sigma}/S \dots\dots\dots 2 \end{aligned}$$

Keterangan :

$\hat{\sigma}$ =standar deviasi luas area
S = slope dari kurva kalibrasi

Presisi

Penetapan presisi atau Presisi *Intraday* menggunakan larutan matrik sampel dengan konsentrasi 100% dilakukan sebanyak enam kali pengulangan. Presisi *Interday* dilakukan juga dengan teknik yang sama dengan enam kali pengulangan.

Akurasi

Parameter ditetapkan dengan menyuntikkan masing-masing tiga seri konsentrasi dengan presentasi konsentrasi yaitu 80, 100, dan 120% sebanyak tiga kali. Kadar analit dihitung melalui perbandingan luas area piperin terhadap piperin teoritis dan dihitung akurasi berupa persen perolehan kembali.^{11,12,13,14}

Robustness

Parameter ditetapkan dengan melakukan perubahan kecil pada metode dan dievaluasi pengaruh simpangan baku relatifnya. Pengujian robustness

dapat ditentukan pada waktu pengembangan prosedur analisis atau optimasi. Perubahan dilakukan terhadap suhu kolom $\pm 2^{\circ}\text{C}$, laju alir $\pm 0,5$ mL/menit dan fase gerak sebesar $\pm 1\%$.

2.3.5. Pemeriksaan Sampel Fitofarmaka

Sampel yang diuji adalah sampel yang diperoleh dari sampling pengawasan *post market* obat tradisional di Balai Besar POM di Bandung dan dianalisis sesuai prosedur yang sudah tervalidasi.

3. Hasil

3.1. Hasil Optimasi Metode Analisis

Hasil optimasi metode analisis dengan KCKT menghasilkan sistem optimum sebagai berikut :

Fase diam : X-Bridge C18
(250mm x 5 μm x 4,6mm);
Fase gerak : Asetonitril:1% Asam Asetat Glisial
(48:52);
Detektor : DAD;
Suhu Kolom : 40°C;
Laju Alir : 1 mL/menit.

Data spektrum PDA piperin pada panjang gelombang 342 nm, dapat diamati pada Gambar 1.

3.2. Hasil Optimasi Pelarut Baku Piperin

Hasil optimasi menunjukkan metanol menghasilkan bentuk kromatogram yang baik.

3.3. Hasil Optimasi Preparasi Sampel

Pada hasil optimasi didapatkan dua metode preparasi uji yaitu metode pengenceran bertingkat dengan metanol untuk sampel padat dan metode ECC air: diklorometan dengan penambahan natrium sulfat anhidrat untuk sediaan sampel piperin cair.

3.4. Uji Kesesuaian Sistem

Pada ketiga fase gerak dilakukan penyuntikan baku piperin konsentrasi 54 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak enam kali.

Hasil diamati pada tabel 1. Syarat keberterimaan parameter yaitu faktor kapasitas $1 \leq k' \leq 10$, jumlah plat teoritis >2000 , $\text{RSD} \leq 2.0\%$, resolusi ≥ 1.5 dan tailing factor 0,8-1,5. Hasil menunjukkan sistem KCKT memenuhi keseluruhan syarat keberterimaan.^{13,14}

3.5. Tahap Validasi Metode Analisis

Spesifisitas

Uji dilakukan terhadap sediaan padat dan cair meliputi baku piperin, *spiked sample*, matriks sampel dan pelarut metanol. Hasil uji memenuhi syarat keberterimaan.

Linearitas

Hasil uji linearitas pada sampel sediaan padat dan cair, masing masing dihasilkan r 0,999 dengan V_{xo} 1,90% dan 0,80%, keduanya dinyatakan memenuhi syarat, dimana nilai $V_{\text{Xo}} \leq 5\%$ dan $r > 0,995$.^{11,12,13,14}

Presisi

Data uji presisi dilakukan secara *interday* dan *intraday*, nilai perolehan %RSD memenuhi syarat yaitu 0.157% untuk sediaan padat dan 0,174% untuk sediaan cair, Dimana syarat perolehan %RSD adalah $\leq 2.0\%$

LOD dan LOQ

Hasil pengujian LOD dan LOQ pada sediaan padat adalah 0,830 dan 2,800. Sedangkan pada sediaan padat adalah 1,310 dan 4,000.

Akurasi

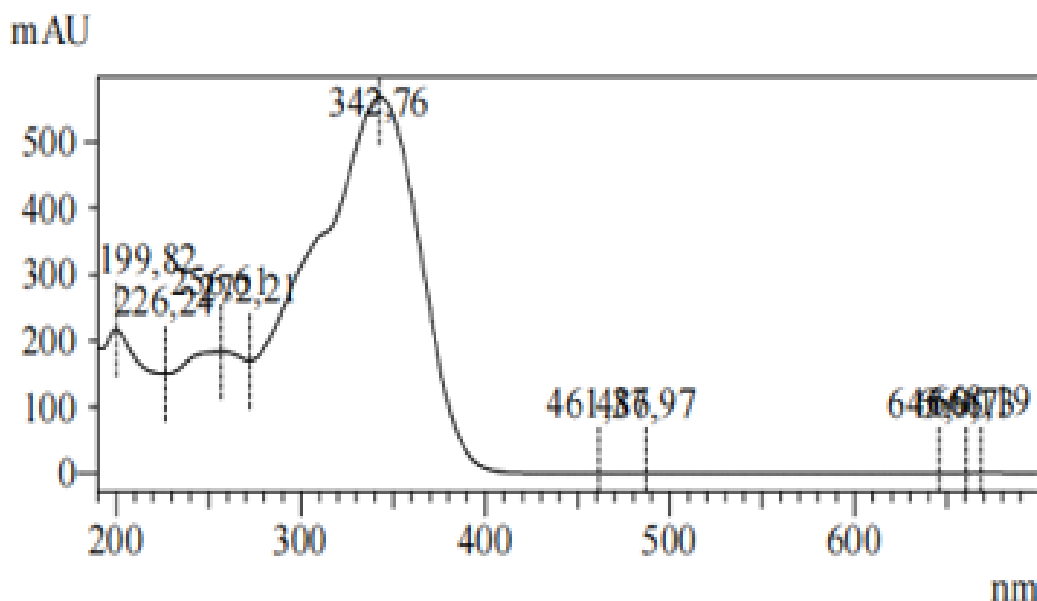
Hasil uji akurasi berupa %recovery menghasilkan nilai perolehan yang memenuhi syarat.¹³ Data ditunjukkan pada tabel 2.

Robustness

Hasil uji *robustness* memenuhi syarat keberterimaan, ditunjukkan dengan nilai perolehan %RSD $< 2\%$.¹⁵ Data dapat diamati pada tabel 3.

Tabel 1 Hasil Uji Kesesuaian Sistem (UKS)

Parameter	Fase Gerak
	Asetonitril:1% Asam Asetat Glisial (48:52)
Resolusi	3,179
Faktor Tailing	1,394
Plat Teoritis	43,330
% RSD Area	0,354
%RSD Waktu Retensi	1,046
Faktor kapasitas 'k	2,896



Gambar 1. Spektrum UV-Vis Senyawa Piperin

3.6. Pengujian Sampel

Sejumlah satu kali dosis obat fitofarmaka dipreparasi sesuai dengan prosedur pengerjaan pada preparasi sampel cair. Sampel diuji dengan metode KCKT yang telah divalidasi dan didapatkan hasil rata-ran kadar sampel uji adalah sebesar 0,187 mg.

4. Pembahasan

Piperin merupakan senyawa alkaloid yang dapat dianalisis dengan menggunakan instrumen KCKT. Piperin memiliki gugus kromofor dan auksokrom seperti yang ditunjukkan pada gambar 2. Apabila kedua gugus tersebut bergabung, hal tersebut akan mempengaruhi panjang gelombang dan intensitas absorbansi. Panjang gelombang piperin di dalam pelarut metanol menghasilkan serapan maksimal pada panjang gelombang 343 nm (UV)¹⁶, sehingga dipilih DAD sebagai detektor yang pada sistem KCKT yang akan digunakan.

Piperin juga merupakan senyawa dengan bagian yang bersifat nonpolar dan polar. Bagian senyawa yang bersifat nonpolar akan berinteraksi dengan fase diam kolom C₁₈ dengan ikatan van der Waals dan menyebabkan piperin dapat tertahan di kolom. Bagian yang bersifat polar berinteraksi dengan fase gerak

melalui ikatan hidrogen dan menyebabkan piperin dapat terelusi keluar.¹⁷

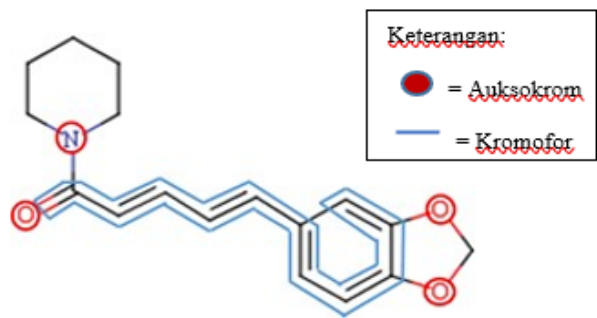
Hasil optimasi fase gerak menunjukkan bahwa Asetonitril:1% Asam Asetat Glisial (48:52) sebagai fase gerak paling optimal. Fase gerak ini mampu menghasilkan perolehan %recovery, pemisahan dan waktu retensi yang baik dibandingkan dengan kedua kandidat fase gerak lainnya.

Optimasi sistem dilakukan juga terhadap laju alir. Laju alir berkaitan dengan lama waktu interaksi senyawa piperin dengan fase diam dan fase gerak. Hasil optimasi menunjukkan bahwa laju alir 1 ml/menit merupakan nilai yang paling optimal pada sistem KCKT di penelitian ini. Laju alir 1 ml/menit mampu menghasilkan nilai AUC yang cukup besar dengan waktu retensi yang dihasilkan kurang dari 10 menit dengan tekanan kolom yang stabil sebesar 119Pa dibandingkan dengan hasil pada kandidat laju alir lainnya.^{18,19}

Optimasi preparasi sampel dilakukan terhadap sediaan padat dan cair. Pada preparasi padat digunakan metode pengenceran bertingkat dengan metanol, karena kelarutannya yang baik terhadap piperin. Sedangkan untuk preparasi sediaan cair dilakukan tahapan pemurnian dengan metode ECC untuk

Tabel 2. Hasil Uji Parameter Akurasi

% Concentration	Sediaan Padat		Sediaan Cair		Syarat Keberterimaan	
	% Recovery		% Recovery		% Recovery	% RSD
80%	93,315	±0,249	88,801	±0,428	80-100	11
100%	92,530	±0,574	89,473	±0,252		
120%	93,050	±0,126	89,338	±0,052		

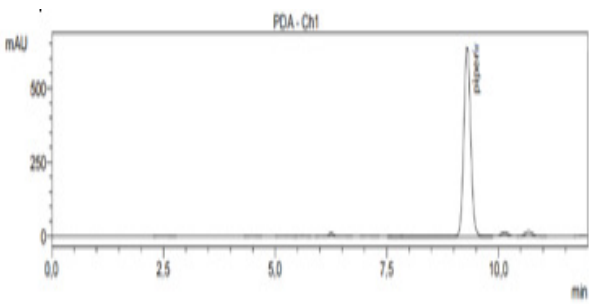


Gambar 2. Gugus Kromofor dan Auksokrom Piperin
memisahkan piperin dari matriks. Ekstraksi dilakukan dengan diklorometan yang memiliki kelarutan baik dengan piperin. Kemudian dilakukan penambahan natrium sulfat anhidrat untuk menarik sisa air pada ekstrak diklorometan.²⁰

Pada awalnya preparasi sampel sediaan padat ditujukan untuk preparasi sampel pemisahan bagi semua jenis sampel uji piperin baik padat maupun cair. Akan tetapi ketika optimasi dilakukan, preparasi sampel tersebut hanya bekerja baik pada sediaan padat tetapi tidak pada sediaan cair. Hal tersebut dimungkinkan terjadi karena adanya perbedaan matriks pembawa atau bahan lainnya yang mempengaruhi proses pemisahan tersebut sehingga pada sediaan sampel cair perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut dengan menggunakan metode ECC.

Untuk data spesifisitas menunjukkan hasil yang baik, dimana tidak ada kesamaan bentuk spektrum dan waktu retensi dengan senyawa piperin.

Selanjutnya diperoleh nilai linearitas sebesar 0,999, sistem dikatakan baik bila nilai linearitas mendekati 1. Data perolehan presisi berupa %RSD sebesar 0,157% (padat) dan 0,174% (cair). Nilai %RSD menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, Shrestha (2020) dengan nilai perolehan %RSD 3,19% dan Jasoliya (2014) %RSD >0,45% dengan instrumen yang sama. Pada perolehan



Gambar 3 Kromatogram Sampel Uji
nilai akurasi yang ditunjukkan %*recovery*, diperoleh 92,965% untuk sediaan padat dan 89,204% untuk sediaan cair.^{7,9} Hasil ditunjukkan dengan kromatogram sampel pada gambar 3.

Kadar kandungan piperin pada sediaan sampel fitofarmaka yang diuji masih dibawah syarat 0,3-0,54 mg/kg/org/hari.² Dapat disimpulkan kadar piperin pada sediaan fitofarmaka masih dalam batas aman.

5. Simpulan

Hasil pengembangan metode analisis piperin sediaan fitofarmaka memenuhi parameter validasi dan dapat digunakan untuk menguji kandungan piperin yang terdapat pada produk fitofarmaka sediaan padat dan cair.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan RI dan didukung oleh Fakultas Farmasi Institut Teknologi Bandung.

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan bahwa data yang dipublikasikan pada naskah ini tidak ada konflik kepentingan terhadap pihak manapun.

Tabel 3. Hasil Uji Parameter Robustness

Parameter	Variasi	RSD % Baku	RSD% Spiked Sampel
Komposisi Fase Gerak	asetonitril:1% asam asetat glasial (47:53)	0,035	0,217
	asetonitril:1% asam asetat glasial (48:52)	0,036	0,175
	asetonitril:1%asam asetat glasial (49:51)	0,155	0,773
Laju Air	0,95 ml/menit	0,041	0,171
	1 ml/menit	0,036	0,175
	1,05 ml/menit	0,145	0,255
Suhu Kolom	38°C	0,036	0,175
	40°C	0,036	0,175
	42°C	0,633	0,176

Referensi

1. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM). Buku Informatorium OMAI. Badan Pengawas Obat dan Makanan RI. 2020; ISBN: 978-602-415-023-5.
2. Makiyah, S. N. N., Tasminatun, S., Arsito, P. N., Fauziah, K. N., Nugrahanti, D. R., & Putriani, A. Subchronic Toxicity of Piperine in Piper nigrum on The Histology of The Kidney, Liver, and Lungs of Mice (Mus musculus L.). Bali Medical Journal. 2021;10:1161–1167.
3. Kim, J., Lee, K. P., Lee, D. W., & Lim, K. Piperine Enhances Carbohydrate/Fat Metabolism in Skeletal Muscle During Acute Exercise in Mice. Nutrition and Metabolism. 2017;14(1).
4. Sachan, N; Pal, D; Chandra, P. Piperine: Sources, Properties, Applications, and Biotechnological. Springer International Publishing. 2021; 759-791.
5. Khismatrao A, Bhairy S, Hirlekar R. Development and validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Curcumin and Piperine. International Journal of Applied Pharmaceutics. 2018;10(5):43-48.
6. Kusumah, K.P. Penetapan Kadar Piperin dari Ekstrak Buah Cabe Jawa (*Piper retrofracti fructus*) Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). (Tesis). Bandung: Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia (SFTI); 2019.
7. Jasoliya, J., & Jani, A. Method Development and Validation of RP-HPLC Method for Stimultaneous Estimation of Resveratrol and Piperine in Combined Capsule Dosage Form. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014;3(5) :1096-1107.
8. Elfahmi, E., Wirasutisna, K. R., & Desyane, H. K). Isolasi Senyawa Aktif Lignan dari Buah Lada Hitam (*Piper nigrum L.*) dan Daun Sirih (*Piper betle L.*). Acta Pharmaceutica Indonesia. 2012; 37(1), 14-17.
9. Shrestha, S., Chaudhary, N., Sah, R., & Malakar, N. Analysis of Piperine in Black Pepper by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Nepal Chemical Society. 2020;41(1):80-86.
10. Santosh, M. K., Shaila, D., Rajyalakshmi, I., & Rao, I. S. RP-HPLC Method for Determination of Piperine from Piper longum Linn. and Piper nigrum Linn. Journal of Chemistry. 2005; Vol. 2, Issue 2. <http://www.e-journals.net>.
11. International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 3, 7-13. EPA; 2005.
12. International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Guideline on Validation of Analytical Procedure Q2 (R2). EPA; 2023.
13. U.S. Pharmacopeial Convention., & United States Pharmacopeial Convention. Council of Experts and its Expert Committees. The United States Pharmacopeia USP 42 NF 37: the National Formulary, The United States Pharmacopeial Convention. USP; 2019.
14. U.S. Pharmacopeial Convention., & United States Pharmacopeial Convention. Council of Experts and its Expert Committees. The United States Pharmacopeia USP 46: the National Formulary, The United States Pharmacopeial Convention. USP; 2023.
15. Association of Official Analytical Chemist (AOAC). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC; 2019.
16. Ferreira, Sergio & Caires, Adriana & Borges, Thaise & Lima, Ariana & Silva, Laiana & Santos, Walter. Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. Microchemical Journal. 2016;131.
17. Susanti, S. Optimasi Metode Analisis High Performance Liquid Chromatography Fase Terbalik Pada Penetapan Kadar Piperin dalam Ekstrak Piper Nigrum Lin. (Tesis). Yogyakarta.: Universitas Sanata Darma; 2019.
18. Thi Huong Hoa Le; Thi Hong Phung & Dinh Chi Le. Development and Validation of an HPLC Method for Stimutaneous Assay of Pottasium Guaiacolsulfonate and Sodium Benzoate in Peditric Oral Powder. Hindawi: Journal Analytical Methods in Chemistry. 2019; 9.
19. Dachriyanus. Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi. Padang: LPTIK; 2004.
20. Sigma Aldrich. Analytix Reporter: Chromatographic Testing of Black Pepper According to United State Pharmacopeia. Sigma Aldrich. 2018;1:13-15.