

VALIDASI METODE ANALISIS PENETAPAN KADAR α -MANGOSTIN PADA GEL EKSTRAK KULIT BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana* L.) DENGAN KLT-SPEKTROFOTODENSITOMETRI

Budari, M. K. S.¹, Dewantara, IG. N. A.¹, Wijayanti, N. P. A. D.¹

¹Jurusan Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Korespondensi: Made Kalih Sindu Budari
Jurusan Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana
Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 0361-703837
Email : kalsinbud@gmail.com

ABSTRAK

α -mangostin merupakan salah satu derivat xanton yang terkandung dalam kulit buah manggis yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri pemicu jerawat yaitu *Staphylococcus aureus*. Dalam penelitian ini ekstrak kulit buah manggis diformulasikan dalam sediaan gel. Untuk menjamin keamanan dan efektivitas dari sediaan obat, semua proses dan metode dalam pembuatan obat harus dikontrol dengan baik khususnya metode analisis yang digunakan untuk menentukan kadar zat aktif dalam sediaan. Dimana metode ini harus dapat menentukan kadar α -mangostin dengan tepat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji metode analisis yang digunakan. Metode analisis kuantitatif harus dapat memenuhi syarat dari beberapa parameter yaitu akurasi, presisi, rentang dan linieritas, batas deteksi (LOD), batas kuantitasi (LOQ) dan spesifitas. Pada penelitian ini kadar α -mangostin dalam gel ditentukan dengan KLT-Spektrofotodensitometri dengan fase gerak campuran pelarut kloroform dan etil asetat dengan perbandingan 9:1 dan fase diam silika gel 60 F₂₅₄. Hasil pemisahan kemudian dipindai dengan KLT-Scanner pada panjang gelombang 320nm yaitu panjang gelombang maksimum α -mangostin.

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa metode ini telah memenuhi kriteria penerimaan validasi yaitu akurasi 99,14%; presisi dengan KV < 2%; Spesifikasi dengan korelasi spektrum > 0,99; linieritas dengan r > 0,99; batas deteksi (LOD) 17,1ng dan batas kuantitasi (LOQ) 105,4ng.

Kata Kunci: α -mangostin, validasi, metode analisis, KLT-Spektrofotodensitometri

1. PENDAHULUAN

Manggis merupakan buah yang tumbuh di daerah tropis yang banyak digunakan sebagai obat herbal. Kulit buah manggis banyak mengandung xanton yang merupakan senyawa golongan polifenol (Zhou dkk., 2011). Salah satu derivat xanton yaitu α -mangostin memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri pemicu jerawat yaitu *Staphylococcus aureus*.

Ekstrak kulit buah manggis yang diaplikasikan langsung untuk pengobatan dirasa tidak praktis dan kurang nyaman, sehingga diperlukan formulasi sediaan sebagai pembawa, salah satunya adalah gel. Keuntungan dari sediaan gel adalah memiliki efek pendinginan pada kulit saat digunakan, penampilan sediaan yang jernih

dan elegan, pada pemakaian di kulit setelah kering meninggalkan film tembus pandang, elastis, daya lekat tinggi yang tidak menyumbat pori sehingga pernapasan pori tidak terganggu, mudah dicuci dengan air, pelepasan obatnya baik, kemampuan penyebarannya pada kulit baik (Voight, 1994).

Formulasi gel ekstrak kulit buah manggis sebagai antijerawat telah dilakukan oleh Arikumalasari (2013) dengan memvariasikan jumlah *Hidroxy Propyl Methyl Cellulose* (HPMC). Hasil penelitian diperoleh jumlah HPMC 15% menghasilkan sediaan dengan sifat fisika dan kimia yang memenuhi persyaratan. Sediaan obat mutlak harus memenuhi persyaratan khasiat dan keamanan. Khasiat dan keamanan obat dapat dijamin melalui pemantauan mutu sediaan mulai

dari proses pembuatan, penyimpanan, distribusi hingga tahap penggunaannya. Salah satu pemantauan mutu yang dilakukan adalah analisis kadar zat aktif dalam sediaan obat untuk memastikan kandungannya sesuai dengan yang dikehendaki. Selain itu perlu dilakukan validasi pada semua hal yang berkaitan dengan proses pembuatan obat, salah satu validasi yang harus dilakukan untuk menjamin kualitas dan keamanan obat adalah validasi metode analisis kadar zat aktif dalam sediaan obat.

Validasi metode analisis adalah upaya yang dilakukan melalui penelitian laboratorium untuk membuktikan karakteristik kinerja metode memenuhi aplikasi analisis yang dimaksud (BPOM, 2001). Validasi dilakukan untuk melihat pengaruh dari kondisi peralatan yang digunakan, pereaksi dan personil yang melakukan pemeriksaan. Parameter validasi yang ditetapkan dalam analisis kuantitatif yakni kekhasan (spesifitas), linieritas dan rentang, batas deteksi (DL) dan batas kuantitasi (QL), keseksamaan (presisi) dan kecermatan (akurasi) (UNODC, 2009).

Akurasi diartikan sebagai ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan.

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Suatu data dikatakan presisi jika nilai koefisien variasi (KV) < 2% (Harmita, 2004).

Spesifitas adalah kemampuan mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks. Spesifitas dari suatu metode analisis KLT diperoleh dengan cara identifikasi dan pemeriksaan kemurnian dari noda analit. Hal ini dapat dilakukan dengan cara pengukuran secara *in situ* dari spektra UV-Vis dari analit dan standar yang sesuai, dimana keduanya dielusi pada plat yang sama, kemudian dilakukan penghitungan korelasi dari analit dan standar tersebut.

Linieritas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara

langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel.

Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linieritas yang dapat diterima. Parameter yang diamati adalah nilai r , dimana suatu data dikatakan linier apabila nilai $r = 1$ atau -1 (Harmita, 2004).

Batas deteksi (*detection limit*, DL) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas kuantitasi (*quantitation limit*, QL) merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Nilai dari DL dan QL dapat ditetapkan menggunakan metode S/N.

Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan validasi metode penetapan kadar α -mangostin dalam gel ekstrak kulit buah manggis dengan KLT-Spektrofotodensitometri.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 95% kulit buah manggis, HPMC (Bratachem), propilen glikol (Bratachem), metil paraben (Bratachem), propil paraben (Bratachem), akuades (Bratachem), KH_2PO_4 , air bebas CO_2 , natrium hidroksida, kertas whatmann no. 1, standar baku α -mangostin, pelarut metanol (PA), kloroform (PA), etil asetat (PA), dan fase diam plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck-Germany).

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 6,0

Dimasukkan 50 mL kalium fosfat monobasa 0,2 M ke dalam labu terukur 200 mL, tambahkan 5,6 natrium hidroksida 0,2 M, kemudian tambahkan air sampai tanda batas (Depkes RI, 1979).

2.2.2 Pembuatan Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan mengacu pada Farmakope Herbal Indonesia yaitu campuran pelarut kloroform dan etil asetat dengan perbandingan 9:1.

2.2.3 Pembuatan Larutan Standar α -mangostin

Larutan standar α -mangostin dibuat dengan melarutkan standar α -mangostin dalam methanol.

2.2.4 Pembuatan Basis Gel

Basis gel dibuat berdasarkan formula pada penelitian Arikumalasari (2013).

2.2.5 Penentuan Akurasi, Linieritas, DL dan QL

Dibuat larutan standar α -mangostin 400 ng, 500 ng, dan 600 ng. Larutan uji dibuat dengan menambahkan larutan standar ke dalam 1 gram basis gel. Gel uji kemudian dilarutkan dalam 10 mL buffer fosfat. 2 mL larutan gel uji dan buffer fosfat kemudian diekstraksi dengan 2 mL kloroform. Akurasi ditentukan dengan menganalisis kadar analit dalam larutan uji dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan. Nilai akurasi dari suatu senyawa dalam matriks dengan konsentrasi $>0,1\%$ diterima jika berada pada rentang 95-105% dari kadar yang sebenarnya (Harmita, 2009). Penentuan LOD dan LOQ dilakukan dengan menggunakan metode *signal to noise* (Chan dkk., 2004).

3.1 Akurasi

Tabel 1. Penetapan Kadar dan Perolehan Kembali α -mangostin

Kadar Sebenarnya (ng)	Kadar yang Diperoleh (ng)	Persen Perolehan Kembali (%)	Rata-rata	Rata-rata	SD	KV (%)
400	400,70	100,17				
400	391,93	97,98	99,44			
400	400,65	100,16				
500	496,91	99,38				
500	502,06	100,41	98,68	99,14	0,41	0,41
500	489,85	97,97				
600	589,19	98,20				
600	612,82	102,14	99,31			
600	602,56	100,43				

3.2 Batas deteksi (*detection limit*, DL) dan Batas kuantitasi (*quantitation limit*, QL)

Tabel 2. Data *Signal* dan *Noise* pada Kromatogram Larutan Seri Standar α -mangostin.

<i>Signal</i>	<i>Noise</i>						Rata-rata <i>Noise</i> (mN)	Sd <i>Noise</i> (SdN)
	6,5	2,1	5,3	10,8	17,1	2,6		
391,6	3,4	3,1	2,6	6,7	7,7	8,3	5,9	3,6
	10	8	1,9	1,9	2,5	5,4		

2.2.6 Penentuan Spesifitas

Larutan uji ditotolkan pada plat yang telah dicuci dan diaktivasi kemudian plat dielusi. Plat dipindai dengan TLC *Scanner* pada λ maks untuk membuat kromatogramnya. Kemurnian puncak diuji dengan memindai spektrum puncak analit pada tiga daerah, yaitu awal puncak (S), tengah puncak (M), dan akhir puncak (E). Masing-masing spektrum tersebut dihitung korelasinya menggunakan metode *cross correlation function* (r). Puncak telah dikatakan murni apabila korelasi spektrum pada tiga daerah tersebut di atas 0,95 ($r_{S-M-E} > 0,95$) (Dhandhukia and Thakker, 2011).

2.2.7 Penentuan Presisi

Penentuan presisi dilakukan menggunakan 3 variasi massa penotolan yang berbeda (400, 500, dan 600 ng) dengan 3 kali pengulangan. Parameter presisi terpenuhi jika $KV < 2\%$ (Harmita, 2004).

3. HASIL

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, didapat hasil validasi metode sebagai berikut.

3.3 Presisi

Tabel 3. Presisi Larutan Standar α -mangostin

Konsentrasi (ng/spot)	AUC Pengulangan Penotolan			Rata-rata	SD	KV (%)
	1	2	3			
400	398,68	406,99	414,78	406,82	8,05	1,98
500	502,51	515,87	507,27	508,55	6,77	1,33
600	604,87	585,53	601,56	597,32	10,34	1,73

3.4 Spesifitas

Tabel 4. Hasil Uji Kemurnian Spektrum α -mangostin pada Penentuan Spesifisitas

Konsentrasi	Rf	r(s,m)	r(m,e)	Kemurnian
400ng	0,42	0,999098	0,998179	Terpenuhi
400ng	0,42	0,999484	0,998867	Terpenuhi
400ng	0,41	0,999392	0,998245	Terpenuhi
500ng	0,42	0,999262	0,998653	Terpenuhi
500ng	0,43	0,999368	0,99865	Terpenuhi
500ng	0,42	0,998776	0,998707	Terpenuhi
600ng	0,43	0,999453	0,998063	Terpenuhi
600ng	0,43	0,999321	0,998526	Terpenuhi
600ng	0,44	0,997198	0,999796	Terpenuhi

Keterangan: $r_{(s-m)}$ = korelasi spektrum Rf awal dibandingkan dengan Rf maks;

$r_{(m-e)}$ = korelasi spektrum Rf maks dibandingkan dengan Rf akhir

4. PEMBAHASAN

Berdasarkan data yang diperoleh pada hasil uji validasi metode, uji akurasi memberikan nilai rata-rata perolehan kembali α -mangostin adalah 99,14% dengan nilai SD sebesar 0,41 dan KV sebesar 0,41% (tabel 1). Perolehan kembali (akurasi) dari suatu senyawa dalam matriks dapat diterima jika berada pada rentang 95-105% dari kadar yang sebenarnya (Harmita, 2004). Oleh karena itu, perolehan kembali α -mangostin telah memenuhi persyaratan validasi untuk parameter akurasi.

Penentuan DL dan QL dilakukan dengan memanfaatkan rasio *signal-to-noise* (S/N). Adapun nilai DL dan QL α -mangostin masing-masing adalah 17,1 ng dan 105,4 ng. Hal ini menunjukkan bahwa batas terkecil analit yang masih dapat terdeteksi adalah dengan kadar 17,1 ng dan batas terkecil analit yang dapat terkuantifikasi adalah 105,4 ng.

Dari penentuan rentang linieritas yang dikerjakan dalam penelitian ini digunakan 6 larutan yakni 50 ng, 100 ng, 500 ng, 1000 ng, 1500 ng, dan 2000 ng dan dihasilkan persamaan regresi linear $y=17,2x+1166,4$ dengan nilai r sebesar 0,994. Menurut Lawson (1996) nilai r

minimum yang dapat diterima untuk jumlah larutan standar sebanyak 5 larutan adalah 0,991; sebanyak 6 larutan adalah 0,974; sebanyak 7 larutan adalah 0,951; dan sebanyak 8 larutan adalah 0,925 sehingga pada rentang tersebut α -mangostin memberikan respon yang linier.

Dalam penelitian ini, presisi AUC dengan massa penotolan 400 ng, 500 ng, dan 600 ng menunjukkan nilai KV berturut-turut 1,98%; 1,33%; dan 1,73%. Suatu metode analisis yang menggunakan senyawa standar dalam penetapan presisi harus mempunyai nilai koefisien variasi (KV) di bawah 2% untuk dapat memenuhi syarat validitas (Harmita, 2004). Oleh karena itu, hasil uji presisi yang dilakukan telah memenuhi persyaratan validasi untuk parameter presisi.

Menurut Dhandhukia dan Thakker (2011), uji kemurnian (*purity*) memenuhi persyaratan jika korelasi > 0,95. Dari data pada Tabel 4.7, dapat diketahui bahwa α -mangostin telah memenuhi persyaratan korelasi minimum dimana nilai $r > 0,99$ yang diukur pada awal puncak (s,m) dan akhir puncak (m,e).

5. KESIMPULAN

Metode analisis ini memenuhi kriteria penerimaan validasi metode yang meliputi akurasi, spesifitas, presisi, rentang dan linieritas, dengan batas deteksi (LOD) 17,1ng dan batas kuantitasi (LOQ) 105,4ng.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada Dedi Sumawirawan atas kerjasama dan bantuannya dalam proses penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Arikumalasari, Jesica. 2013. *Optimasi HPMC sebagai Gelling Agent dalam Formula Gel Ekstrak Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L.)*. (Skripsi). Bali: Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Udayana.
- Chan, C.C., Y.C. Lee, H. Lam, and X.M. Zhang. *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*. 2004. Canada: John Wiley and Sons. PP: 37-39, 43.
- Dhandhukia, P.C. and J.N. Thakker. 2011. *Quantitative Analysis and Validation of Method Using HPTLC*. Heidelberg: Springer. Hal. 11-15.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. I, No.3. Hal. 117-135.
- Lawson, L. 1996. Evaluation of Calibration Curve Linearity. *Guidance Memo*. No. 96-007. Hal. 1-9.
- UNODC. 2009. *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing og Illicit Drugs in Seized Material and Biological Specimens*. New York: United Nations. PP: 9-12.
- Voigt, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Penerjemah: Soendani Noerono. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Hal. 370, 398-434.
- Zhou, X., R. Huang, J. Hao, H. Huang, M. Fu, Z. Xu, Y. Zhou, Xu-E Li, S.X. Qiu, dan B. Wang. 2011. Two New Prenylated Xanthenes from The Pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *Helvetica Chimica Acta*. Vol. 94. Hal. 2092- 2098.