

**VALIDASI METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI UNTUK
PENETAPAN KADAR α -MANGOSTIN DALAM LARUTAN ORAL
EKSTRAK KULIT BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana* L.)**
**(HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD VALIDATION
OF α -MANGOSTIN ASSAY IN MANGOSTEEN (*Garcinia mangostana* L.) FRUIT
RIND EXTRACT FORMULATED IN ORAL SOLUTION)**

Liliek Nurhidayati*, Siti Sofiah, Ros Sumarny, Kevin Caesar

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan
12640

Email: liliek_nurhidayati@yahoo.com

Received 09 December 2014, Accepted 07 February 2015, Published 01 March 2015

ABSTRAK

Ekstrak kulit buah manggis kaya akan antioksidan. α -Mangostin adalah komponen dengan efek antioksidan paling tinggi dalam kulit buah manggis. Larutan oral yang mengandung ekstrak kulit buah manggis perlu diuji penetapan kadar untuk pengujian mutunya. Penentuan kadar analit dalam sampel dengan matriks yang sangat kompleks dan jumlah analit sangat kecil, seperti α -mangostin dalam larutan oral, diperlukan metode yang selektif dan sensitif, yaitu kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar α -mangostin dengan sistem KCKT fase balik dengan menggunakan fase diam oktadesilsilan (C18), fase gerak metanol-air (90:10), laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor UV pada 316 nm. Waktu retensi α -mangostin adalah 9,622 menit. Puncak α -mangostin terpisah baik dengan resolusi sebesar 1,725. Linearitas metode berada pada rentang 1,67-5,01 bpj dengan koefisien korelasi 0,9986. Nilai simpangan baku relatif (SBR) sebesar 1,30%, perolehan kembali berada pada rentang 95,80-100,76% dengan nilai $t_{hitung} < t_{tabel}$. Batas deteksi dan batas kuantitasi masing-masing adalah 0,21 bpj dan 0,70 bpj. Metode ini memenuhi persyaratan validasi yang meliputi spesifisitas, linearitas, presisi, dan akurasi.

Kata kunci: validasi metode, KCKT, α -mangostin, larutan oral, *Garcinia mangostana* L.

ABSTRACT

Mangosteen fruit rind extract contain a lot of antioxidants. α -Mangostin is a component in mangosteen fruit rind that has highest antioxidant effect. The oral solution containing mangosteen fruit rind extract is required an assay method for quality assessment. Determination of a very low concentration of analyte in sample with very complex matrix, such as α -mangostin in oral solution, needs a selective and sensitive method, such as high performance liquid chromatography (HPLC). In this study, α -mangostin assay was performed by reverse phase HPLC system using octadecylsilane (C18) as stationary phase, methanol-water (90:10) as mobile phase, the flow rate is 1.0 mL/min, and the UV detector at 316 nm. The retention time of α -mangostin was 9.622 minutes. Peak of α -mangostin was well separated with resolution of 1.725. Linearity was in the range of 1.67-5.01 ppm with correlation coefficient of 0.9986. The relative standard deviation (RSD) was 1.30%, the recovery was in the range of 95.80 - 100.76% and the $t_{hitung} < t_{tabel}$.

value $< t_{table}$. The limit of detection and limit of quantitation were 0.21 ppm and 0.70 ppm, respectively. This method meets the validation requirements i.e. specificity, linearity, precision, and accuracy.

Key words: method validation, HPLC, α -mangostin, oral solution, *Garcinia mangostana* L.

PENDAHULUAN

Kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L) yang tidak dikonsumsi dan menjadi limbah pertanian mempunyai banyak khasiat seperti antioksidan. Salah satu senyawa dalam ekstrak kulit buah manggis yang memiliki aktivitas antioksidan adalah α -mangostin. Dalam rangka memanfaatkan limbah kulit buah manggis, telah dibuat formulasi larutan oral ekstrak kulit buah manggis dengan metode kosolvensi. Formula yang terbaik didapat dengan komposisi PEG 400 dan gliserin masing-masing sebesar 40%. Formula terbaik dipilih berdasarkan kadar α -mangostin terlarut dan aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Dari hasil penelitian diketahui serapan α -mangostin terlarut yang lebih besar memberikan aktivitas antioksidan yang lebih baik (Sofiah *et al.*, 2013).

Salah satu aspek pengujian mutu sediaan adalah penetapan kadar zat aktif. Untuk menganalisis α -mangostin dalam sediaan tersebut dibutuhkan metode yang selektif dan sensitif seperti kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). KCKT telah banyak digunakan untuk menetapkan kadar α -mangostin di dalam ekstrak dari kulit buah manggis (Aisha *et al.*, 2013; Yodhnu *et al.*, 2009; Pothitirat and Gritsanapan, 2009; Islam and Begum, 2011; Jujun *et al.*, 2009), ekstrak yang dienkapsulasi dalam PLGA (*Poly Lactic-co-Glycolic Acid*) *microspheres* (Ali *et al.*, 2012), dan α -mangostin dalam plasma darah tikus (Syamsudin *et al.*, 2010). Kondisi optimum KCKT untuk menetapkan kadar α -mangostin dalam larutan oral ekstrak kulit buah manggis dicapai menggunakan oktadesilsilan (C18) sebagai fase diam, metanol-air (90:10) sebagai fase gerak dengan laju alir 1 mL/menit dan detektor UV 316 nm (Nurhidayati *et al.*, 2014).

Sebelum digunakan untuk menetapkan kadar α -mangostin metode ini harus divalidasi. Apabila pada validasi metode ini dihasilkan spesifisitas, linearitas, presisi, dan akurasi yang memenuhi persyaratan maka metode ini akan sangat berguna dalam kontrol kualitas larutan oral ekstrak kulit buah manggis. Spesifisitas ditunjukkan oleh nilai resolusi pada kromatogram. Linearitas metode bisa dilihat dari besarnya koefisien korelasi kurva hubungan antara konsentrasi analit dengan luas puncak. Presisi metode dinilai dari

besarnya simpangan baku relatif (SBR) hasil penetapan kadar sedangkan akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (artinya hasil bagi nilai yang terukur dengan nilai benar dikalikan 100%) (Depkes RI, 1995). Pada penelitian ini digunakan metode penambahan baku. Sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel, dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Selain uji mutu, metode yang tervalidasi dapat digunakan untuk penetapan kadar dalam kaitannya dengan penentuan umur simpan sediaan.

METODE PENELITIAN

Bahan baku pembanding α -mangostin dengan kemurnian 98,36% diperoleh dari Chengdu Biopurify Phytochemical Ltd. Larutan oral ekstrak kulit buah manggis dibuat dengan metode kosolvensi menurut cara Sofiah (2013). Alat utama yang digunakan adalah kromatograf cair kinerja tinggi Shimadzu LC-20AD.

Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menyuntikkan larutan oral 3,0 mL yang diencerkan dengan fase gerak sampai 10 mL, disaring dengan kertas saring 0,2 μ m dan disonikasi. Kondisi KCKT yang digunakan adalah fase diam Shim-pack VP-ODS C18 (4,6 x 250 mm; 4,6 μ m), suhu kolom 40 °C, fase gerak metanol-air (90:10), laju alir 1,0 mL/menit dengan detektor sinar UV 316 nm. Kurva kalibrasi dibuat menggunakan satu seri larutan baku pembanding α -mangostin dengan tujuh konsentrasi berbeda (1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 bpj (bagian per juta)).

Uji Linearitas, Rentang, Batas Deteksi dan Kuantitasi

Uji linearitas dilakukan dengan membuat satu seri larutan oral dengan tujuh konsentrasi yang berbeda (pemipetan 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, dan 4,5 mL) dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan fase gerak sampai tanda. Sebanyak 20 μ L larutan tersebut yang telah disaring dengan kertas saring berpori 0,2 μ m dan disonikasi 3-4 menit diinjeksikan pada kondisi optimum. Dari kurva pada uji linearitas dapat ditentukan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi metode.

Uji Presisi dan Akurasi

Uji presisi dilakukan dengan menyuntikkan sejumlah 20 μ L larutan sampel yang diencerkan sepuluh kali. Larutan sampel disaring dengan kertas penyaring berpori 0,2 μ m dan disonikasi selama 3-4 menit ke dalam *injection port*, kemudian diukur luas puncaknya

dengan kondisi KCKT optimum. Pengerjaan dilakukan sebanyak 6 kali. Kadar α -mangostin dalam larutan oral dihitung dengan persamaan kurva kalibrasi.

Uji perolehan kembali dilakukan dengan menambahkan 20 μg dan 30 μg baku pembanding α -mangostin ke dalam larutan oral. Sejumlah 20 μL larutan sampel setelah ditambah baku pembanding α -mangostin disaring dengan kertas penyaring berpori 0,2 μm dan disonikasi selama 3-4 menit disuntikkan ke dalam *injection port*, kemudian diukur luas puncaknya. Cara yang sama dilakukan juga terhadap 20 μL larutan sampel tanpa penambahan baku pembanding. Pengerjaan dilakukan masing-masing sebanyak 3 kali.

PEMBAHASAN

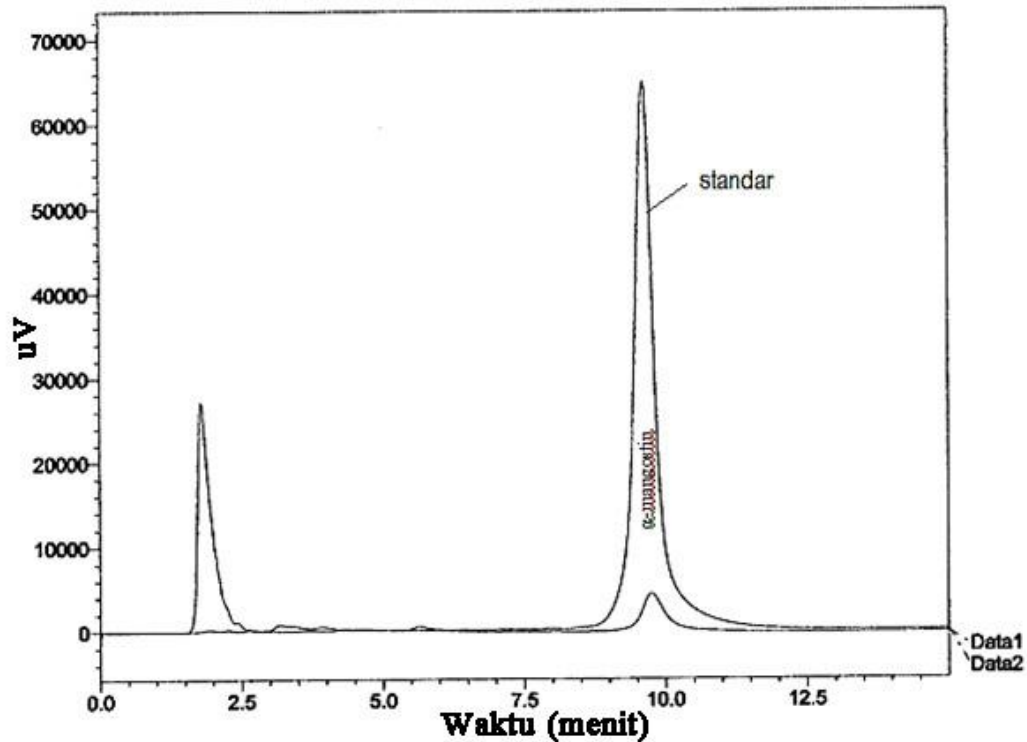
Kromatogram α -mangostin dalam larutan oral dengan fase gerak metanol-air (90:10) dengan laju alir 1,0 mL/menit diperoleh kromatogram pada Gambar 1. Dengan fase gerak dan laju alir ini, puncak α -mangostin terdeteksi dengan waktu retensi 9,622 menit. Untuk mengetahui kualitas pemisahan dengan puncak yang paling dekat dihitung harga resolusi. Resolusi dapat dihitung dengan menggunakan persamaan (1):

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \quad (1)$$

Notasi t_1 dan t_2 adalah waktu retensi kedua komponen. Huruf w_1 dan w_2 adalah lebar dasar puncak yang diperoleh dengan cara ekstrapolasi tepi puncak yang relatif lurus sampai garis dasar. Resolusi dikatakan baik bila nilainya lebih besar atau sama dengan 1,5. Berdasarkan persamaan tersebut, puncak α -mangostin pada kromatogram larutan oral terpisah dengan baik dengan resolusi 1,725 yang memenuhi kriteria uji spesifisitas (spesifik). Harga faktor ikutan (*tailing factor*) puncak α -mangostin pada kromatogram larutan oral sebesar 1,378 (Gambar 1). Harga faktor ikutan (*tailing factor*), T, diisyaratkan untuk mengetahui puncak yang dihasilkan simetris atau asimetris. Semakin besar nilai T maka puncak yang dihasilkan semakin asimetris. Nilai T dipersyaratkan tidak lebih dari 2,0. Faktor ikutan dapat dihitung dengan menggunakan persamaan (2).

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (2)$$

Notasi $w_{0,05}$ adalah lebar puncak pada 5% tinggi puncak dari garis dasar dan f adalah jarak dari puncak maksimum (*peak*) sampai tepi muka puncak pada 5% tinggi puncak dari dasar (Depkes RI, 1995).



Gambar 1. Kromatogram α -mangostin dalam larutan oral yang dibandingkan dengan kromatogram standar α -mangostin.

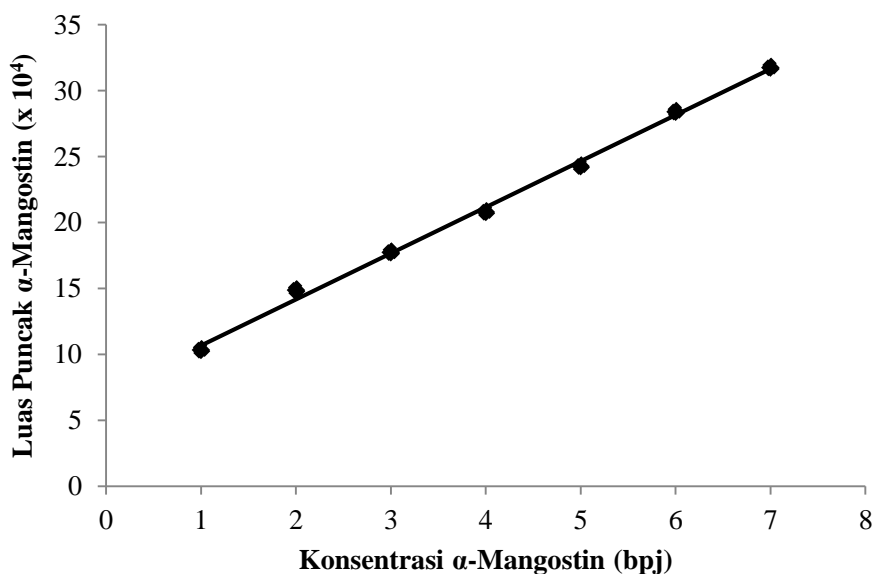
Uji Kesesuaian Sistem

Penyuntikan lima kali larutan oral yang sudah diencerkan menghasilkan luas puncak dengan simpangan baku relatif (SBR) 0,45% memenuhi persyaratan Farmakope Indonesia Edisi IV, yaitu SBR tidak lebih dari 2%. Dari hasil uji kesesuaian sistem dapat disimpulkan bahwa kondisi operasional untuk menganalisis α -mangostin secara KCKT sudah membentuk suatu kesatuan sistem yang dapat memberikan hasil yang baik.

Kurva Kalibrasi, Uji Linearitas, Rentang, Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Penyuntikan larutan baku pembanding α -mangostin tujuh konsentrasi yang berbeda menghasilkan persamaan garis regresi $y = -14555,5124 + 72726,5024 x$, dengan nilai koefisien korelasi (r) 0,9993 yang linear pada rentang 1,12 bpj sampai 6,96 bpj. Uji linearitas dilakukan dengan menetapkan konsentrasi α -mangostin dalam sampel sebanyak 6 kali kemudian hasilnya diasumsikan sebagai konsentrasi α -mangostin dalam larutan seri sampel larutan oral. Dari penetapan konsentrasi α -mangostin dalam sampel 6 kali didapatkan konsentrasi α -mangostin 3,34 bpj. Dari uji linearitas diperoleh persamaan garis regresi $y = 1945,8852 + 62758,2038 x$, dengan nilai koefisien korelasi (r) 0,9986 yang linear pada rentang 1,67 bpj sampai 5,01 bpj (Gambar 2). Hasil uji linearitas ini

menunjukkan bahan matriks tidak berpengaruh pada linearitas α -mangostin dalam larutan oral.



Gambar 2. Kurva hubungan antara konsentrasi α -mangostin dengan luas puncak.

Penetapan batas deteksi dan batas kuantitasi diambil dari hasil uji linearitas larutan oral. Hasil uji batas deteksi memberikan informasi konsentrasi terendah α -mangostin dalam sampel yang masih dapat dideteksi sebesar 0,21 bpj. Hasil uji batas kuantitasi memberikan informasi konsentrasi terendah α -mangostin dalam sampel yang masih dapat ditetapkan kadarnya dengan presisi dan akurasi yang masih dapat diterima sebesar 0,70 bpj. Dengan diketahui batas kuantitasi dapat memberikan pedoman berapa konsentrasi α -mangostin terendah dalam larutan oral yang dapat dipersiapkan untuk penetapan kadar.

Penetapan Kadar α -Mangostin dalam Larutan Oral dan Uji Presisi.

Penetapan kadar α -mangostin dalam larutan oral dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan pada konsentrasi yang sama dimaksudkan untuk sekaligus menguji presisi metode. Hasil penetapan kadar dengan 6 kali pengulangan disajikan pada Tabel 1.

Dari hasil pengujian diperoleh kadar rata-rata α -mangostin dalam larutan oral adalah $45,47 \pm 0,59$ bpj dengan simpangan baku relatif (SBR) 1,30%. Menurut pustaka, SBR yang diperbolehkan tidak lebih dari 2,0% atau berdasarkan kadar analit sebesar 45,47 bpj, SBR yang diperbolehkan tidak lebih dari 11,31% (Harmita, 2004). Dalam penetapan uji presisi ini didapatkan hasil SBR yang memenuhi kedua persyaratan tersebut sehingga metode KCKT yang diuji dapat memberikan hasil analisis yang teliti (*precise*).

Tabel 1. Hasil penetapan kadar α -mangostin dalam larutan oral dan uji presisi

Replikasi	Bobot Ekstrak Kental Dalam 100 mL Larutan Oral (mg)	Luas Puncak	Kadar α -Mangostin dalam Larutan oral (bpj)
1	17,04	315327	45,36
2		313170	45,06
3		316609	45,54
4		312803	45,01
5		314571	45,26
6		324443	46,61
		Rata-rata	45,47
		SB	0,59
		SBR (%)	1,30

Hasil presisi yang memenuhi syarat dengan SBR 1,30% juga dapat menggambarkan bahwa α -mangostin terdispersi homogen dengan sempurna dalam larutan oral. Dengan terdispersinya α -mangostin secara homogen, jumlah α -mangostin yang diambil pada pengulangan pengambilan sampel dengan pipet akan seragam.

Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan sebagai uji perolehan kembali dengan metode penambahan baku (*standard addition method*) karena matriks dalam ekstrak kental kulit buah manggis tidak diketahui dengan jelas. Uji ini dilakukan dengan menganalisis sampel larutan oral sebanyak 3 kali pengulangan dan dihitung rata-rata kadar α -mangostinnya. Setelah itu, sampel larutan oral ditambahkan larutan baku pembanding α -mangostin (konsentrasi diketahui) dan ditetapkan kadarnya dengan dilakukan 3 kali pengulangan. Perolehan kembali dihitung dengan persamaan (3).

$$\text{Perolehan kembali} = \frac{W_t - W_u}{W_b} \times 100\% \quad (3)$$

Keterangan:

w_t = Bobot analit dalam sampel setelah penambahan baku pembanding (μg)

w_u = Bobot analit dalam sampel (μg)

w_b = Bobot baku pembanding yang ditambahkan (μg)

Dari nilai perolehan kembali dilakukan uji t untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan nyata antara bobot baku pembanding yang ditambahkan dengan bobot baku pembanding yang diperoleh kembali.

Penetapan bobot α -mangostin dalam sampel tanpa penambahan baku pembanding diperoleh bobot α -mangostin rata-rata 32,70 μg . Pada penambahan 20 μg dan 30 μg diperoleh hasil uji perolehan kembali seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji perolehan kembali

Penambahan Baku Pembanding (μg)	Luas Puncak	Bobot α -Mangostin (μg)	Baku Pembanding 17,61 bpj yang Ditambahkan		Perolehan Kembali (%)
			V (mL)	w (μg)	
20	345959	49,57	1,0	17,61	95,80
	350395	50,18			99,26
	348462	49,92			97,79
30	414195	58,95	1,5	26,42	99,36
	413718	58,89			99,13
	416831	59,32			100,76
				Rata-rata	98,68
				SB	1,70
				SBR (%)	1,72
				t_{hitung}	1,902
				t_{tabel}	2,571

Keterangan:

Bobot α -mangostin yang dimaksudkan pada tabel di atas adalah bobot per 10,0 mL saat 3,0 mL sampel sudah ditambahkan fase gerak sampai 10 mL dalam labu ukur.

Hasil penetapan perolehan kembali α -mangostin dalam larutan oral didapatkan perolehan kembalinya adalah 95,80 - 100,76% dengan SBR 1,72%. Menurut pustaka, perolehan kembali yang diperbolehkan berdasarkan kadar analit sebesar 45,47 bpj, adalah 90-107% (Harmita, 2004). Uji akurasi metode menghasilkan perolehan kembali yang memenuhi persyaratan tersebut sehingga metode KCKT yang diuji dapat memberikan hasil analisis yang akurat dan teliti. Dari uji t didapatkan bahwa nilai t_{hitung} (1,902) lebih kecil dari t_{tabel} (2,571). Hasil ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata antara bobot baku pembanding yang ditambahkan dengan bobot baku pembanding yang diperoleh kembali.

KESIMPULAN

Metode penetapan kadar α -mangostin dalam larutan oral ekstrak kulit buah manggis secara kromatografi cair kinerja tinggi fase balik menggunakan fase diam oktadesilsilan (C18), fase gerak metanol-air (90:10), laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor UV 316 nm memenuhi persyaratan parameter analitik yang meliputi uji spesifisitas, linearitas, presisi, dan akurasi untuk pengujian mutu sediaan larutan oral.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Fakultas Farmasi Universitas Pancasila atas fasilitas yang diberikan dan Ditlitabmas Ditjen Dikti yang telah memberikan dana penelitian Hibah Bersaing melalui DIPA Kopertis Wilayah III Jakarta Nomor DIPA 023.04.189705/2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisha, A.F.A., Abu-Salah, K.M., Ismail, Z., and Majid, A.M.S.A., 2013, Determination of Total Xanthenes in *Garcinia mangostana* Fruit Rind Extracts by Ultraviolet (UV) Spectrophotometry, *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 7, no. 1, pp. 29-35.
- Ali, A.A.E., Taher, M., Helaluddin, A.B.M., and Mohamed, F., 2012, Development and Validation of Analytical Method by RP-HPLC for Quantification of Alpha-mangostin Encapsulated in PLGA Microspheres, *Journal Analytical and Bioanalytical Techniques* vol. 3, no. 7, DOI: 10.4172/2155-9872.1000155.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995, *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta, 1995.
- Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, vol. 1, no. 3, pp.117-120.
- Islam, M.A., and Begum, S., 2011, Quantitative Analysis of α -Mangostin in Mangosteen Fruit Rind Extract, *International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology* , vol. 1, no. 1-2, pp. 55-59.
- Jujun, P., Pootakham, K., Pongpaibul, Y., Tharavichitkul, P., and Ampasavate, C., 2009, HPLC Determination of Mangostin and Its Application to Storage Stability Study, *Journal of Natural Sciences*, vol 8, no. 1, pp. 43-53.
- Nurhidayati, L., Sofiah, S., Sumarny, R., and Caesar, K., 2014, HPLC Method Optimization of α -Mangostin Assay in Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Fruit Rind Extract Formulated in Oral Solution, *International Symposium on Medicinal Plant and Traditional Medicine*, Tawangmangu, Central Java, Indonesia, Juni 2014.
- Pothitirat, W., and Gritsanapan, W., 2009, HPLC Quantitative Analysis Method for The Determination of α -Mangostin in Mangosteen Fruit Rind Extract, *Thai Journal of Agricultural Science*, vol. 42, no. 1, pp.7-12.
- Sofiah, S., Sumarny, R., and Nurhidayati, L., 2013, Teknologi Kosolvensi pada Formulasi Sediaan Larutan Oral Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L) sebagai Antioksidan, *Laporan Penelitian*, Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta.
- Syamsudin, Faizatun, and Rahayu, L., 2010, HPLC Analysis and Pharmacokinetic Study of Mangostin After Orally Administration in Rats, *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, vol. 1, no.1, pp.1-7.
- Yodhnu, S., Sirikatitham, A., and Wattanapiromsakul, C., 2009, Validation of LC for The Determination of α -Mangostin in Mangosteen Peel Extract: A Tool for Quality Assessment of *Garcinia mangostana* L, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 47, pp.185-9.