

VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR KATEKIN DALAM EKSTRAK DAUN GAMBIR DENGAN *HIGH PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY*

^{1,2}Nanang Yunarto, ²Nonik Susanti, ³Uud Nourma Reswandar, ³Rulina Novianti, ³Tria Ayu Astari, ²Beny Maulana Satria

¹Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan, Jakarta

²Program Studi D-3 Farmasi, STIKES Widya Dharma Husada, Tangerang

³Pusat Kebijakan Sistem Ketahanan Kesehatan dan Sumber Daya Kesehatan, Jakarta

E-mail: nanang.safactory@gmail.com

ABSTRACT

Gambir leaves (Uncaria gambir Roxb) are a plant with a high economic value that is widely used in herbal products, cosmetics, and healthy drinks. Gambir leaf extract contains the main active compound of catechins as biomarkers and has high antioxidant activity. The quality of gambir leaf extract is determined by the levels of catechins. This study aims to validate the qualitative and quantitative determination method of catechins isolates contained in the gambir leaves by HPTLC. The mobile phase used was a mixture of chloroform: ethyl acetate: formic acid (5:4:1), with a silica gel GF 254 TLC plate as the stationary phase. Method validation is determined by measuring the parameters of linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), and limit of quantity (LOQ). The relationship between the value of r^2 on the standard curve of the height of the chromatogram area and the concentration value shows linearity. The recovery percentage is calculated to test accuracy. The RSD percentage is calculated to determine precision. LOD and LOQ are calculated based on the standard curve equation. The results showed that the method had good validity with r^2 0.997 on standard curve linearity, percent recovery 99.54 - 101.08%, with a precision value of RSD 0.43%, LOD 53.76 $\mu\text{g/mL}$, and LOQ 162, 92 $\mu\text{g/mL}$. Determination of validation of the catechin analysis method in gambir leaf extract is valid for all parameters of accuracy, precision, sensitivity, and linearity so that HPTLC-based methods can be applied to analyze catechins in products containing gambir leaf extract.

Keywords: Catechin, Gambir Leaf Extract, HPTLC, Method Validation

ABSTRAK

Daun gambir (*Uncaria gambir* Roxb) merupakan tanaman dengan nilai ekonomi tinggi yang banyak digunakan dalam produk herbal, kosmetik dan minuman kesehatan. Ekstrak daun gambir mengandung komponen utama katekin sebagai biomarker dan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Kualitas ekstrak daun gambir sangat ditentukan oleh kadar katekin. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode analisis senyawa katekin yang terkandung dalam ekstrak daun gambir dengan HPTLC. Fase gerak yang digunakan campuran kloroform: etil asetat: asam format (5:4:1), dengan fase diam plat TLC silika gel GF 254. Validasi metode ditentukan dengan mengukur parameter linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi (LOD), dan batas kuantitas (LOQ). Hubungan nilai r^2 pada kurva baku tinggi area kromatogram dengan konsentrasi nilai kadar menunjukkan linearitas. Persentase rekoverti dihitung untuk menguji akurasi. Prosentase RSD dihitung untuk menentukan presisi. LOD dan LOQ dihitung berdasarkan persamaan kurva standar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode memiliki validitas yang baik dengan r^2 0,997 pada linearitas kurva baku, persen perolehan kembali 99,54 - 101,08%, dengan nilai presisi RSD 0,43%, LOD 53,76 $\mu\text{g/mL}$, dan LOQ 162,92 $\mu\text{g/mL}$. Penetapan validasi metode analisis katekin dalam ekstrak daun gambir valid untuk seluruh parameter akurasi, presisi, sensitivitas, dan linearitas, sehingga metode berbasis HPTLC dapat diterapkan untuk menganalisis katekin pada produk yang mengandung ekstrak daun gambir.

Kata Kunci: katekin, ekstrak daun gambir, HPTLC, validasi metode

PENDAHULUAN

Indonesia yang merupakan negara agraris yang terletak pada iklim tropis sehingga memiliki hasil alam yang beranekaragam. Kekayaan alamnya yang berlimpah ini memiliki potensi sekitar 30.000 tumbuhan yang berkhasiat obat (Sari dan Andalia, 2019). Sebanyak 26% tumbuhan obat tersebut sudah dibudidayakan dan 74% masih dibiarkan tumbuh liar di hutan Indonesia. Diantara sekian banyak tanaman obat, salah satu yang memiliki potensi dan banyak dibudidaya di Indonesia adalah gambir (*Uncaria gambir* Roxb). Bancin et al. (2022) menyatakan bahwa gambir merupakan tanaman khas yang banyak ditanaman di daerah Sumatera yaitu Sumatera Barat, Sumatera Utara, Riau, dan Sumatera Selatan. Namun, sebanyak 90% gambir di Indonesia dihasilkan dari Sumatera Barat.

Gambir adalah salah satu tumbuhan yang memiliki antioksidan alami yang dihasilkan dari ekstraksi daun tanaman gambir. Ekstrak gambir memiliki kandungan utama katekin sebesar 7-33% yang merupakan metabolit sekunder dari golongan flavonoid. Selain itu, gambir juga mengandung asam catecu tanat sebesar 20-55%, juga terdapat quersetin (2-4%), catecu merah (3-5%), gambir flouresin, abu, lemak dan lilin. Bila dilihat dari senyawa-senyawa yang terkandung dalam gambir, maka tidak heran jika gambir memiliki banyak manfaat. Dalam bidang kesehatan, hasil uji preklinik pada hewan coba gambir memiliki khasiat sebagai antihiperlipidemia (Yunarto et al., 2015). Berdasarkan uji in vitro menunjukkan mekanisme katekin pada ekstrak daun gambir mampu mereduksi pembentukan kolesterol dengan menginhibisi kinerja enzim HMG KoA reduktase dan lipase (Yunarto et al., 2021; Yunarto et al., 2023).

Tingginya kadar katekin dalam daun gambir membuat daun gambir menjadi salah satu tumbuhan yang sangat potensial untuk dikembangkan menjadi produk herbal, kosmetik dan minuman kesehatan (Yunarto, et al., 2015). Namun dalam penelitiannya, Yunarto et al (2021) menjelaskan bahwa pemanfaatan isolat katekin daun gambir sebagai bahan baku obat belum banyak dilakukan, karena masih minimnya penelitian tentang isolat katekin daun gambir. Untuk mendorong perkembangan obat tradisional menjadi produk obat dengan inovasi-inovasi yang baru, diperlukan bahan baku obat herbal yang sudah terstandarisasi sehingga diperlukan metode analisis yang tervalidasi untuk menganalisis isolat katekin yang terdapat dalam daun gambir. Penetapan metode menggunakan spektrofotometer memiliki kelemahan yaitu kurang spesifik, karena senyawa yang diukur pada panjang gelombang yang sama dapat terbaca semua (Yunarto et al., 2021).

Untuk itu diperlukan pengembangan metode analisis yang baru agar proses identifikasi, pemisahan dan penetapan kadar katekin dari ekstrak daun gambir semakin baik, salah satunya dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi atau *High Performance Thin Layer Chromatography* (HPTLC). HPTLC memiliki keunggulan dibanding metode pemisahan lainnya. Keunggulannya terletak pada sensitivitas dan proses analisis yang cepat menggunakan partikel dengan ukuran yang sangat kecil dengan luas permukaan yang lebih lebar sehingga dapat membuat sistem pemisahan semakin baik (Inge et al., 2017).

Metode analisis yang baik harus dapat divalidasi agar dapat dibuktikan bahwa parameter-parameter kinerjanya mampu dalam menyelesaikan permasalahan analisis tertentu dan untuk memberikan jaminan bahwa metode analisis yang digunakan sudah spesifik, presisi, akurat, reproduibel dan tahan terhadap rentang zat aktif yang akan

dianalisa (Rohman, 2018). Oleh karena itu, validasi metode analisis katekin dari ekstrak daun gambir menggunakan HPTLC perlu dilakukan untuk membuktikan dan menjamin bahwa metode analisis yang akan digunakan valid dalam menganalisis senyawa katekin baik secara kualitatif dan kuantitatif.

METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi, Badan Kebijakan Pembangunan Kesehatan, Kementerian Kesehatan, Jakarta pada bulan Maret hingga Mei tahun 2023.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *High Performance Thin Layer Chromatography* (Camag), neraca analitik digital (AND), oven (Mettler), Sonikator (Ultrasonic Cleaner GB-928), *syringe filter* (Waters). Bahan yang digunakan adalah standar Katekin (Sigma Aldrich), ekstrak gambir dari Mungka Kabupaten Limapuluhkota, plat *silica gel* HPTLC (Merck), etil asetat (Merck), kloroform p.a. (Merck), asam format p.a. (Merck), dan metanol p.a. (Merck).

Prosedur Validasi Metode

1. Pembuatan larutan baku

Sebanyak 25 mg baku standar katekin ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan sebanyak 5 mL pelarut metanol p.a. Untuk menghomogenkan standar katekin dilakukan ultrasonikasi selama 10 menit sampai dengan larut sempurna dan ditambahkan pelarut hingga tanda batas (Yunarto et al., 2021).

2. Linearitas

Uji linearitas dilakukan dengan pembuatan kurva baku dengan seri kadar 50, 100, 150, 200, 250, dan 300 $\mu\text{g/mL}$. Larutan standar yang telah dipreparasi, kemudian disaring menggunakan *syringe filter* 0,20 μm untuk menghindari adanya kontaminasi yang akan menyebabkan penyumbatan pada proses injeksi di HPTLC. Setelah proses penyaringan, larutan standar dimasukkan ke dalam vial dan akan dilakukan proses penotolan pada alat HPTLC pada bagian Automatic TLC Sampler. Penotolan dilakukan pada lempeng KLT Silika Gel GF254 masing-masing sebanyak 20 μL menggunakan injeksi otomatis pada alat HPTLC pada bagian Automatic TLC Sampler, sehingga menghasilkan respon berupa tinggi kromatogram dan waktu retensi (Rf). Parameter linearitas ditunjukkan dengan tingginya nilai koefisien korelasi (r^2) yang tinggi dengan menghitung tinggi area kromatogram yang terukur dan jumlah katekin. Fase gerak yang digunakan campuran kloroform: etil asetat: asam format (5:4:1) (Rizky, 2019).

3. Kecermatan (*Accuracy*)

Uji kecermatan dibuat konsentrasi 100, 200, dan 300 $\mu\text{g/mL}$ dari larutan induk dan dimasukkan ke 3 buah labu ukur 5 mL yang berbeda kemudian dilakukan proses homogenisasi dengan ultrasonikator selama 10 menit dan ditambahkan larutan sampel hingga batas tera. Larutan disaring menggunakan *syringe filter* 0,20 μm dan

diinjeksikan sebanyak 20 µL ke alat HPTLC lalu hasil analisis campuran dibandingkan dengan konsentrasi senyawa aktif yang ditambahkan (Rohman, 2018).

4. Keseksamaan (*Precision*)

Uji keseksamaan dibuat larutan uji ekstrak gambir dengan kadar 200 µg/mL (dibuat dengan replikasi sebanyak 10 kali) kemudian dilakukan proses ultrasonifikasi selama 10 menit lalu dilarutkan hingga batas tera dengan pelarut methanol p.a. kemudian disaring dengan *syringe filter* 0,20 µm dan diinjeksikan sebanyak 20 µL ke alat HPTLC. Nilai presisi dihitung berdasarkan %RSD kurva baku yang sudah diperoleh (Rohman, 2018).

5. Batas Deteksi (*Limit of Detection*) dan Batas Kuantitasi (*Limit of Quantitation*)

Sensitivitas mengacu pada kemampuan metode untuk mendeteksi analit dan memperkirakan konsentrasinya. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dapat ditentukan dengan garis regresi linear dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linear $y = b x \pm a$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Rizky, 2019). LOD dan LOQ dapat dihitung menggunakan persamaan 1 dan 2.

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \text{ SD}}{S} \dots\dots (1)$$

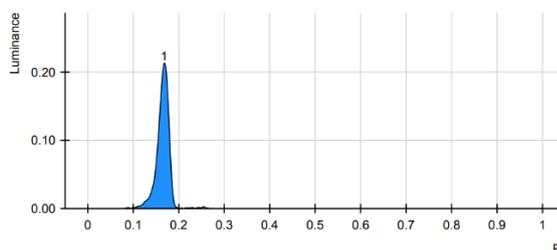
$$\text{LOQ} = \frac{10 \text{ SD}}{S} \dots\dots (2)$$

Keterangan: SD = standar deviasi, S = slope pada kurva kalibrasi

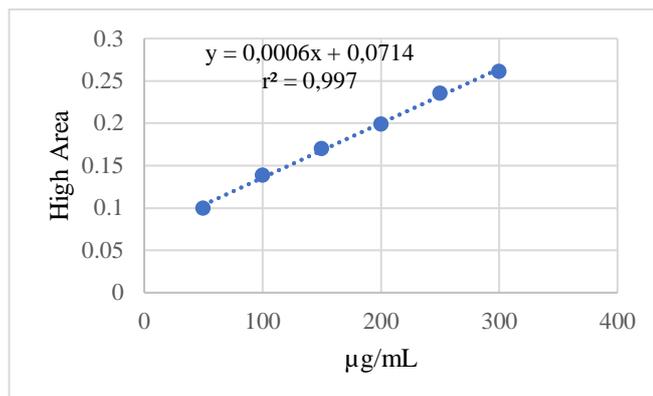
HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Linearitas

Pengujian linearitas metode analisa dan rentang dihitung berdasarkan pembuatan seri kurva baku bertujuan untuk menilai hubungan antara kadar katekin dengan tinggi area kromatogram. Larutan baku katekin dibuat dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250, dan 300 µg/mL. Metode pada penelitian ini dinyatakan linear karena memiliki nilai koefisien korelasi (r^2) yang sebesar 0,997. Nilai koefisien korelasi yang mendekati angka 1 membuktikan korelasi yang semakin linear antara konsentrasi dengan ketinggian area kromatogram. Berdasarkan AOAC (2012), nilai ini memenuhi syarat yang ditetapkan, yaitu 0,9900. Nilai koefisien korelasi yang tinggi menunjukkan hubungan yang linear antara sinyal detektor yang terukur dan kadar katekin. Dari hasil pemindaian, senyawa katekin terdeteksi pada R_f 0,168 (Gambar 1). Kurva baku hubungan antara konsentrasi larutan standar katekin dengan ketinggian kromatogram katekin disajikan pada Gambar 2.



Gambar 1. Kromatogram senyawa katekin



Gambar 2. Kurva Baku Hubungan antara Konsentrasi Standar Katekin dengan Ketinggian Kromatogram

2. Ketepatan (*Accuracy*)

Akurasi suatu metode analisis diuji dengan menghitung nilai perolehan kembali (% *recovery*) suatu sampel. Akurasi pada penelitian ini digunakan metode penambahan dengan menggunakan tiga kadar yang berbeda, yaitu 100, 200, dan 300 µg/mL yang dibuat dengan replikasi sebanyak 3 kali. Hasil persen perolehan kembali senyawa analit katekin sebesar 99,54% - 101,08% bisa dilihat pada Tabel 1. Nilai tersebut memenuhi kriteria persen perolehan kembali sebesar 98 - 102% (Marson et al., 2020). Rentang nilai akurasi ini lebih akurat jika dibandingkan pengukuran kadar katekin menggunakan spektrofotometer dengan rentang % *recovery* 98,85 – 101,64 % (Yunarto et al., 2021).

Tabel 1. Hasil Uji Akurasi Senyawa Katekin dalam Ekstrak Daun Gambir

| Konsentrasi (µg/mL) | Konsentrasi Teoritis (µg/mL) | Konsentrasi Terukur (µg/mL) | <i>Recovery</i> (%) |
|---------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 100 + sampel | 196,84 | 197,21 | 99,95 |
| 100 + sampel | 196,84 | 196,73 | 101,08 |
| 100 + sampel | 196,84 | 197,32 | 100,25 |
| 200 + sampel | 200,42 | 201,17 | 100,37 |
| 200 + sampel | 200,42 | 199,67 | 99,63 |
| 200 + sampel | 200,42 | 200,83 | 100,20 |
| 300 + sampel | 204,78 | 204,67 | 99,95 |
| 300 + sampel | 204,78 | 203,83 | 99,54 |
| 300 + sampel | 204,78 | 205,17 | 100,19 |

3. Ketelitian (*Precision*)

Metode analisis dinyatakan teliti atau presisi apabila memberikan hasil yang tetap pada pengukuran sampel di waktu yang sama. Presisi metode merupakan suatu derajat keterulangan metode analisis yang dapat dinyatakan dalam nilai simbbangan baku relatif

Relative Standard Deviation (RSD), sehingga presisi akan menunjukkan ukuran kedekatan hasil pengujian yang diperoleh dari serangkaian pengukuran yang diulang.

Pada metode ini, ketelitian diujikan dengan menggunakan larutan sampel yang dibuat pada konsentrasi 200 µg/mL dengan replikasi sebanyak 10 kali. Data hasil uji presisi dapat dilihat pada Tabel 2 yang menunjukkan bahwa nilai %RSD sebesar 1,23%. Suatu metode pengujian dinyatakan valid karena memenuhi persyaratan presisi, yaitu %RSD ≤ 2% (Yunarto, et al., 2021).

Tabel 2. Hasil Uji Presisi Senyawa Katekin dalam Ekstrak Daun Gambir

| Replikasi | Ketinggian Area | Konsentrasi (%) |
|-----------|-----------------|-----------------|
| 1 | 0,2158 | 96,27 |
| 2 | 0,2161 | 96,47 |
| 3 | 0,2148 | 95,60 |
| 4 | 0,2145 | 95,40 |
| 5 | 0,2158 | 96,27 |
| 6 | 0,2152 | 95,87 |
| 7 | 0,2161 | 96,47 |
| 8 | 0,2151 | 95,80 |
| 9 | 0,2164 | 96,67 |
| 10 | 0,2155 | 96,07 |
| | Rata-Rata | 96,09 |
| | SD | 0,41 |
| | %RSD | 0,43 |

4. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas Deteksi (*LOD*) merupakan kadar terkecil dari suatu senyawa dalam sampel yang masih bisa dideteksi, namun tidak perlu ditentukan secara kuantitatif. Sedangkan Batas Kuantitasi (*LOQ*) merupakan konsentrasi terkecil dari suatu senyawa dalam sampel yang bisa diukur secara kuantitatif menggunakan akurasi dan presisi yang dapat diterima (Rohman, 2014). Kedua parameter tersebut menentukan sensitivitas metode pengujian dalam validasi metode analisis.

Pengujian batas deteksi dan batas kuantitasi untuk validasi metode katekin ekstrak daun gambir dengan HPTLC dapat dihitung berdasarkan pada simpangan baku respon (*SD*) dan *slope* (*S*) kurva standar baku katekin sesuai dengan rumus *LOD* dan *LOQ*.

Berdasarkan Tabel 3 hasil pengujian batas deteksi (*LoD*) tersebut menunjukkan nilai sebesar 53,76 µg/mL, hal ini menandakan bahwa konsentrasi terendah dari sampel isolat katekin daun gambir yang masih bisa dideteksi pada nilai tersebut, sedangkan

pengujian batas kuantitasi (LOQ) menunjukkan nilai sebesar 162,92 µg/mL. Hal ini menandakan bahwa konsentrasi terendah dari sampel isolat katekin duan gambir yang bisa diukur secara kuantitatif sebesar 162,92 µg/mL. Hasil perhitungan LOD dan LOQ dari validasi metode analisis isolat katekin dengan KCKT ini memiliki nilai yang sedikit lebih besar jika dibandingkan dengan nilai LOD dan LOQ validasi metode analisis katekin dengan spektrofotometri yang pernah dilakukan sebelumnya yakni nilai LOD yang diperoleh adalah 3,85 µg/mL dengan LOQ µg/mL (Yunarto, et al., 2021).

Tabel 3. Nilai LOD dan LOQ

| Konsentrasi (µg/mL) | y | \hat{y} | y - \hat{y} | (y - \hat{y}) ² |
|------------------------|------------|-----------|---------------|-------------------------------|
| 50 | 0,0996 | 0,1014 | -0,0018 | 0,000003 |
| 100 | 0,1387 | 0,1314 | 0,0073 | 0,000053 |
| 150 | 0,1702 | 0,1614 | 0,0088 | 0,000077 |
| 200 | 0,1988 | 0,1914 | 0,0074 | 0,000055 |
| 250 | 0,2355 | 0,2214 | 0,0141 | 0,000199 |
| 300 | 0,2609 | 0,2514 | 0,0095 | 0,000090 |
| | Σ | | | 0,00048 |
| | SD | | | 0,0098 |
| | LOD | | | 53,76 |
| | LOQ | | | 162,92 |

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa katekin dalam ekstrak daun gambir dapat dianalisis menggunakan metode HPTLC. Penetapan validasi metode analisa yang diuji pada penelitian ini valid memenuhi persyaratan seluruh persyaratan. Oleh karena itu, HPTLC sangat cocok untuk kontrol kualitas produk gambir yang mengandung katekin secara rutin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Laboratorium Farmasi, Badan Kebijakan Pembangunan Kesehatan, Kementerian Kesehatan atas bantuan sarana dan prasarana yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC, 2012. International Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. AOAC Official Methods of Analysis.
- Bancin, N. K., Nasution, J., & Karim, A, 2022. Pemanfaatan Gambir (*Uncaria Gambir*) Oleh Etnis Pakpak, Kabupaten Pakpak Barat, Provinsi Sumatera Utara. *Jurnal Ilmiah Biologi UMA (JIBIOMA)*, 4(2), p 54-60.
- Ingle, K. P et al, 2017. Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(1), p 32-36.

- Marson, B.M., 2020. Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: An overview focused on HPLC methods. *Quím Nova*, 43(8), p 1190-1203.
- Rizky, H. M., 2019. Validasi Metode Penetapan Kadar Dibutil Ftalat pada Produk Deodoran Krim dengan Metode KLT Densitometri, Doctoral Dissertation, Universitas Airlangga
- Rohman, A., 2018. Validasi dan penjaminan mutu metode analisis kimia. Yogyakarta: Gajah Mada University Pres
- Sari, L. & Andalia, N., 2019. Inventarisasi Tumbuhan Obat di Taman Hutan Kota Banda Aceh. *Serambi Konstruktivis*, 1(1), p 88.
- Yunarto, N., Elya, B. & Konadi, L., 2015. Potensi fraksi etil asetat ekstrak daun gambir (*Uncaria gambir* Roxb) sebagai antihiperlipidemia. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 5(1), pp. 1-10.
- Yunarto, N et al., 2021. Validation of spectrophotometry method for determination of (+)-catechin in ethyl acetate fraction of gambir extract (*Uncaria gambir* Roxb.). *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*, 14(2). p 128-130.
- Yunarto, N., Sulistyowati, I., Finolawati, A., Elya, B., & Sauriasari, R., 2021. HMG-CoA Reductase Inhibitory Activity of Extract and Catechin Isolate from *Uncaria Gambir* as a Treatment for Hypercholesterolemia. *Journal of Southwest Jiaotong University*, 56(6).
- Yunarto, N., Sulistyowati, I., Reswandaru, U. N., Elya, B., Sauriasari, R., & Konadi, L., 2023. Inhibitory activity of *Uncaria Gambir* Roxb extract, ethyl acetate fraction, and catechin isolate on lipase. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2606, No. 1, p. 020011). AIP Publishing LLC.