

Penentuan Kadar Rubraxanton pada Ekstrak Kulit Batang *Garcinia spp*

Meri Susanti, Dachriyanus, Deddy Prima Putra, dan Fatma Sriwahyuni

ABSTRACT: In this study a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) has been used for determination of rubraxanton on bark extracts *Garcinia spp* (*Garcinia mangostana*, *Garcinia cowa*, *Garcinia griffitii*, *Garcinia dioica* and *Garcinia forbesii*). HPLC system consisted of C-18 reversed phase column with a length of 250 mm, diameter 4.6 mm, 20 mL injection volume, mobile phase methanol: water (gradient system with polarity) and flow rate of 1 ml / min. Rubraxanton levels obtained in this study; 9.161% for *G. mangostana*, 6.942% for *G. cowa*, 6.762% for *G. dioica*, 0.499% for *G. forbesii* and 0.229% for *G. griffitii*. The method has been validated for specificity, linearity, accuracy, precision, limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ). The linearity of the method can be seen from the regression coefficient $r = 0.9996$ with a linearity range from 1.72 to 55 ug/ml. Recovery of rubraxanton in the extract of *G. mangostana* was between 99.61 to 101.08%. Intra-and inter-day precision showed relatively small level of standard deviation (lower than 2%). Limit Of Detection (LOD) and Limit Of Quantitation (LOQ) are 0.55 ug / ml and 1.82 ug / ml respectively.

Keywords : rubraxanton, bark extracts, *Garcinia spp*.

ABSTRAK: Dalam penelitian ini telah digunakan metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) untuk penentuan kadar rubraxanton pada ekstrak kulit batang *Garcinia spp* (*Garcinia mangostana*, *Garcinia cowa*, *Garcinia griffitii*, *Garcinia dioica* dan *Garcinia forbesii*). Sistem KCKT terdiri dari kolom fase terbalik C-18 dengan panjang kolom 250mm, diameter 4,6mm, volume injeksi 20 μ l, fase gerak metanol : air dengan sistem *gradient polarity* dan laju alir 1ml/menit. Kadar rubraxanton yang diperoleh pada penelitian ini adalah 9,161% untuk *G. mangostana*, 6,942% untuk *G. cowa*, 6,762% untuk *G. dioica*, 0,499% untuk *G. forbesii* dan 0,229% untuk *G. griffitii*. Metoda ini telah tervalidasi untuk spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, *limits of detection* (LOD) dan *limits of quantitation* (LOQ). Linieritas dari metoda dapat dilihat dari harga koefisien regresi $r = 0,9996$ dengan rentang linieritas 1,72 – 55 μ g/ml. *Recovery* rubraxanton dalam ekstrak *G. mangostana* adalah 99,61 – 101,08%. Presisi *intra* dan *inter-day* memperlihatkan harga standar deviasi relatif yang lebih kecil dari 2%. *Limit Of Detection* (LOD) dan *Limit Of Quantitation* (LOQ) berturut-turut adalah 0,55 μ g/ml dan 1,82 μ g/ml.

Kata kunci : rubraxanton, ekstrak kulit batang, *garcinia spp*.

Laboratorium Kimia Bahan Alam,
Fakultas Farmasi, Universitas Andalas,
Padang

Korespondensi:

Meri Susanti

Email : meri_susanti008@yahoo.com

PENDAHULUAN

Garcinia adalah salah satu tumbuhan obat yang termasuk ke dalam famili Guttiferae. Kelompok tumbuhan ini telah banyak digunakan dan diperdagangkan oleh masyarakat Asia sebagai obat tradisional untuk bermacam-macam penyakit seperti diare, infeksi kulit, luka dan sebagai antiseptik (1). Penelitian terhadap genus ini telah berhasil mengisolasi beberapa senyawa kimia yang terbukti memiliki aktifitas farmakologi. Salah satunya adalah senyawa rubraxanton.

Rubraxanton (1,3,6 - trihidroksi - 8 - geranyl - 7 - methoxy xanton) telah berhasil diisolasi dari beberapa spesies *Garcinia* diantaranya *G. Dioica*, (2) *G. parvifolia* (3) *G. cowa* (4, 5) *G. mangostana* (6) dan *G. griffithii*. Aktivitas farmakologi yang menarik dari senyawa ini terkait dengan daya an-ti bakterinya, dimana rubraxanton telah terbukti mampu menghambat dengan baik pertumbuhan *Staphylococcus aureus* (2), *Trichophyton mentagrophytes*, dan *Microsporium gypseum* (3), *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (7), dan *Helicobacter pylori* (6). Selain itu rubraxanton juga telah dilaporkan sebagai antitumor dan aktif sebagai antioksidant dan antikolesterolemia (7).

Berdasarkan survey yang dilakukan terhadap genus *Garcinia* di daerah Sumatera Barat diketahui bahwa terdapat sekurangnya sembilan spesies *Garcinia* yang tersebar di beberapa tempat yang telah dimanfaatkan masyarakat secara tradisional (*personal information*). Penelitian ini dimaksudkan untuk menganalisis kadar rubraxanton yang potensial dalam terapi beberapa penyakit di dalam ekstrak kulit batang *Garcinia spp* yang ditemui di daerah Sumatra Barat. Sehingga dengan hasil penelitian ini dapat diketahui spesies mana yang mengandung rubraxanton terbanyak untuk dijadikan sumber bahan baku untuk kepentingan pengobatan nantinya.

Penetapan kadar rubraxanton dilakukan dengan metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Untuk hasil yang baik terhadap metoda yang

digunakan terlebih dahulu dilakukan validasi metoda. Sehingga penelitian ini dibagi atas validasi metoda penetapan kadar rubraxanton secara KCKT meliputi penentuan linieritas, akurasi, presisi *intra* dan *inter day* serta *limits of detection* dan *limits of quantitation* dan penetapan kadar rubraxanton dalam ekstrak beberapa spesies *Garcinia* secara KCKT.

METODE PENELITIAN

Alat

Timbangan analitik Libror AEG - 80 SM Shimadzu, seperangkat alat destilasi, *rotary evaporator*, KCKT merk Shimadzu®, detektor UV-Vis SPD 10AVP, pompa ganda/*gradient*, rekorder Shimadzu CLASS - VP V6.14 SP2, kolom Shim - pack VP-ODS 250 x 4,6mm, timbangan analitik Libror AEG - 80 SM Shimadzu, oven Memmert®, desikator, labu ukur berbagai ukuran, gelas ukur, pipet takar, cawan, krus, pipet tetes, kulkas, penyaring milipore, penyaring vakum, vial-vial kecil, botol kaca, corong, dan gelas ukur.

Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah kulit batang tumbuhan *G. mangostana*, *G. dioica*, *G. cowa*, *G. forbesii*, dan *G. griffithii* yang diambil di Sarasah Bonta Kotamadya Payakumbuh Sumatera Barat, pelarut metanol, aquabidest (Otsuka), metanol p.a (Merck), rubraxanton, α mangostin

Prosedur Kerja

1. Pembuatan Ekstrak Kulit batang tumbuhan *Garcinia spp* dikering anginkan ditempat teduh. Kemudian dirajang dan dijadikan serbuk, sehingga diperoleh serbuk kering. Serbuk kering kulit batang seberat 250g dimaserasi dengan metanol ditempat yang terlindung dari cahaya langsung selama 5 hari. Setelah 5 hari hasil maserasi disaring dan ampas dilakukan lagi maserasi dengan pelarut yang sama selama 3 hari. Pengerjaan

ini dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan. Maserat digabungkan dan dipisahkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental.

2. Penetapan Rubraxanton dalam Ekstrak Beberapa Spesies *Garcinia spp* secara HPLC

Pembuatan Larutan Uji Ekstrak *Garcinia spp* (500ppm)

Ekstrak kulit batang (*G. dioica*, *G. cowa*, *G. forbesii*, *G. griffitii* dan *G. mangostana*) sejumlah kurang lebih 50mg ekstrak dilarutkan dengan metanol sampai volume 100ml. Larutan disaring dengan penyaring milipore 0,45 μ m. Larutan diinjeksikan ke dalam sistem kromatografi dengan fasa diam (oktadesilsilane C - 18), fasa gerak metanol air sistem *gradient polarity* dengan kenaikan metanol 2% tiap menit, kecepatan aliran 1ml/menit, detektor UV pada:

Uji Spesifisitas

Spesifisitas ditentukan dengan menganalisis campuran larutan standar rubraxanton yang dicampur dengan senyawa pembanding α mangostin. Larutan diinjeksi dengan volume injeksi 20 μ l ke dalam sistem KCKT. Kemampuan pemisahan semua senyawa dalam sampel ditunjukkan dengan menghitung resolusi (R) antara puncak-puncak yang dihasilkan. Identifikasi ditentukan dengan membandingkan waktu retensi dari puncak-puncak utama pada masing-masing kromatogram dari larutan uji dengan kromatogram larutan standar.

Linieritas dan Kurva Kalibrasi

Linieritas dilakukan analisa seri larutan standar rubraxanton (lima seri konsentrasi) dan diinjeksikan pada alat KCKT dengan menggunakan loop 20ul. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot luas area yang didapat dari analisa terhadap konsentrasi standar. Linieritas ditentukan oleh harga r (koefisien korelasi).

Presisi

Presisi yang dilakukan mencakup presisi sistem dan presisi metoda. Presisi sistem dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar dengan konsentrasi tertentu sebanyak enam kali pengulangan yang dilakukan setiap hari pengerjaan.

Pengukuran variabel *intra* dan *inter-day* dibutuhkan untuk penentuan presisi metoda. Tiga variasi konsentrasi larutan standar rubraxanton diinjeksikan ke dalam sistem KCKT. Konsentrasi standar rubraxanton dari eksperimen dihitung dengan persamaan garis lurus yang didapat dari kurva kalibrasi. Relatif Standar Deviasi (RSD) digunakan sebagai nilai presisi. Presisi *intra* dan *inter-day* didapat dengan melakukan analisa secara triplet dalam sehari yang dilakukan selama 3 hari dengan kondisi KCKT yang sama.

Akurasi

Akurasi metoda ditentukan oleh pengujian *recovery* menggunakan metoda standar addisi. Tiga variasi konsentrasi larutan standar rubraxanton disiapkan dan ditambahkan kedalam larutan uji ekstrak *Garcinia spp*. Larutan diinjeksikan dengan tiga kali pengulangan ke dalam sistem KCKT untuk tiap-tiap konsentrasi selama tiga hari.

Sensitifitas

Sensitifitas ditentukan dari perhitungan nilai LOD dan LOQ.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisa kualitatif dan kuantitatif dari rubraxanton secara KCKT dilakukan setelah dilaksanakan uji kesesuaian sistem. Dalam penelitian ini fase gerak yang digunakan adalah campuran metanol : air dengan kepolaran diturunkan tiap menitnya. Untuk pengujian ini diperoleh harga $N = 173863.3$ dan nilai $JSPT = 0,001438$ mm/pelat teori.

Pada pengujian spesifisitas menggunakan sistem ini diperoleh pemisahan yang baik senyawa rubraxanton dengan senyawa α mangostin

(Gambar 1) dengan harga resolusi (R) = 1,4112, faktor kapasitas (k') = 7,40038.

Validasi metoda KCKT dari *rubraxanton* dalam ekstrak *Garcinia spp* dilakukan terhadap beberapa parameter:

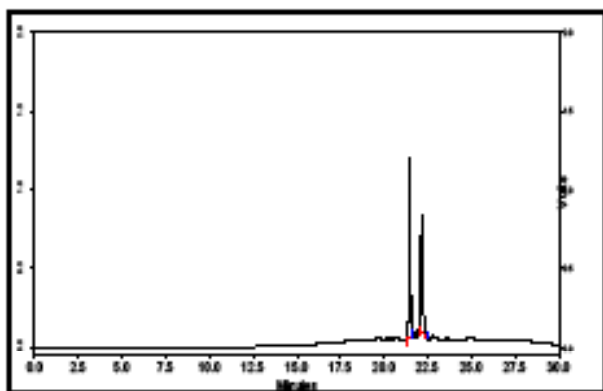
1. Linieritas dan Kurva Kalibrasi

Linieritas dan kurva kalibrasi dilakukan dengan menganalisa larutan standar rubraxanton yang dibuat pada enam variasi dosis. Sebagai parameter adanya hubungan linier atau tidak digunakan koefisien korelasi r pada garis regresi linier $y=154166,7302 (x) - 134007,8756$, dari metoda ini didapat harga $r = 0,9996$. Uji T student untuk membuktikan adanya hubungan antara konsentrasi dengan luas puncak pada $df = 4$ dengan taraf

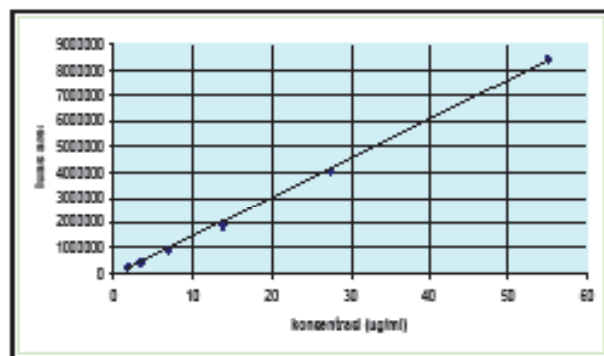
kepercayaan $P = 0,05$ ternyata $t \text{ hitung} = 79,052 > t \text{ tabel} = 2,747$, yang berarti H_0 ditolak dan ada korelasi yang bermakna antara konsentrasi dan luas area (Gambar 2).

2. Sensitivitas

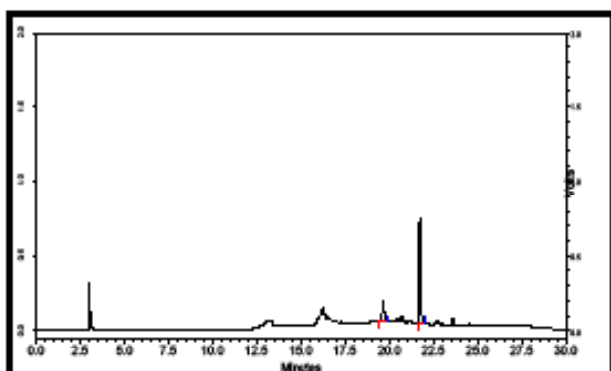
Kepekaan metoda analisa ditentukan oleh batas deteksinya (LOD) sedangkan batas kuantitas terkecil yang dapat dianalisa oleh suatu metoda dengan cermat diistilahkan sebagai LOQ. LOD dan LOQ dapat ditentukan dari kurva linieritas larutan standar yang dibuat dengan berbagai konsentrasi. Hasil perhitungan LOD dan LOQ analisa rubraxanton diperoleh dari persamaan regresi larutan standar adalah $LOD = 0,55\text{ug/ml}$ dan $LOQ = 1,82 \text{ ug/ml}$.



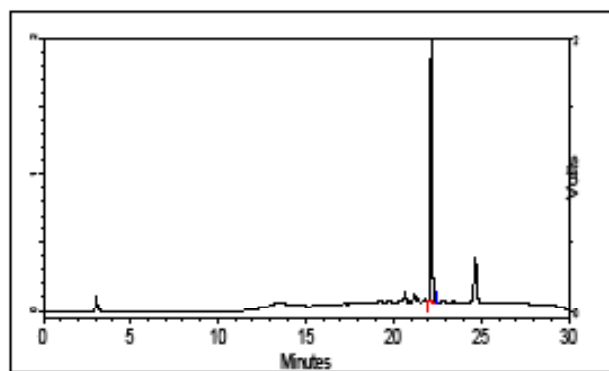
Gambar 1. Kromatogram standard rubraxanton dan senyawa α mangostin



Gambar 2. Kurva linieritas larutan baku rubraxanton



Gambar 3. Kromatogram Sampel Ekstrak *Garcinia dioica* 458,362 ug/ml



Gambar 4. Kromatogram Sampel Ekstrak *Garcinia mangostana* 459,745 ug/ml

3. Akurasi

Untuk menilai ketepatan suatu metoda parameter penting lainnya adalah akurasi dan *recovery* dari baku yang ditambahkan ke dalam sampel uji tersebut. Prosentase *recovery* yang didapat merupakan penilaian ketepatan metoda yang dipakai. Pada penelitian ini akurasi metoda ditetapkan dengan metoda standar addisi. Metoda ini dipilih karena sampel yang diuji berupa ekstrak sehingga komponen pembawanya sangat kompleks dan tidak dapat diketahui secara pasti sehingga tidak memungkinkan untuk menggunakan metoda sampel plasebo. Dari Tabel 1 terlihat bahwa prosentase standar rubraxanton yang diperoleh kembali dalam ekstrak dengan rentang 96,32% sampai 106,30% dengan Stan-

dar Deviasi Relative (RSD) < 5 %. Harga *recovery* yang diperoleh dalam metoda ini telah memenuhi persyaratan *recovery* untuk analisis yakni berkisar antara 95 – 105% dimana selisih kadar pada berbagai penentuan < dari 5%.

4. Presisi

Presisi yang dilakukan meliputi presisi sistem yang dilakukan selalu setiap saat akan melakukan KCKT. Uji ini dilakukan dengan penyuntikan berulang larutan standar yang diketahui konsentrasinya sebanyak 6 kali penyuntikan untuk menunjukkan kinerja alat pada kondisi dan hari pengujian dengan batas presisi $RSD \leq 2\%$. Harga *Relatif Standar Deviasi (RSD)* dari 6 kali penyuntikan larutan standar adalah 1,354%, hal ini ber-

Tabel 1. Akurasi dan Recovery standar rubraxanton yang ditambahkan dalam pengujian Rubraxanton secara KCKT selama 3 hari.

Konsentrasi standar yang ditambahkan ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)			Mean (%)	RSD (%)
	Hari 1	Hari 2	Hari 3		
5,5	102,828	101,348	99,062	101,080	1,699
	$\pm 2,866$	$\pm 5,582$	$\pm 0,928$	$\pm 1,897$	
11	97,040	94,987	$\pm 97,315$	97,315	$\pm 1,808$
	$\pm 4,292$	6,196	$\pm 0,795$	1,452	
16,5	96,061	95,905	$\pm 96,341$	96,102	$\pm 1,919$
	$\pm 2,936$	0,407	$\pm 2,921$	0,221	

Tabel 2. Hasil Uji Presisi *intra day* Metoda Penetapan Kadar Rubraxanton dalam Ekstrak *Garcinia mangostana*

No	Berat Sampel Tertimbang (mg)	Kadar larutan ($\mu\text{g/ml}$)	Luas Puncak Perlakuan 1&2	Rata-rata	Kadar rubraxanthon (%)
1.	50,0	459,264	6336749 6377009	6356879	9,168
2.	50,1	460,182	6345054 6308765	6322757	9,101
3.	50,0	459,264	6198765 6189852	6194309	8,938
4.	50,0	459,264	6240029 6319754	6279892	9,059
5.	50,2	461,101	6411018 6391425	6401222	9,193
6.	50,1	460,182	6389765 6343567	6366666	9,163
Rata2					9,104 \pm 0,095
RSD					1,044 %

arti metoda ini telah memenuhi persyaratan Farmakope Indonesia edisi IV yaitu kecil atau sama dengan 2%.

Presisi metoda dilakukan dengan replikasi atau keberulangan sampel ekstrak *Garcinia spp* yang diuji dengan cara yang sama sebanyak 6 kali pengulangan. Dalam pengujian ini digunakan ekstrak *G. mangostana*. Dari Tabel 2 terlihat jelas presisi metoda pengujian rubraxanton dalam ekstrak *G. mangostana* ini memenuhi persyaratan yang berlaku yaitu $RSD \leq 2\%$. Sehingga metoda ini dapat digunakan untuk maksud penetapan kadar rubraxanton di dalam ekstrak.

Presisi *inter-day (ruggedness)* dilakukan dengan replikasi atau keberulangan sampel ekstrak *Garcinia mangostana* yang diuji dengan cara yang sama yang dibuat sebanyak 3 seri konsentrasi dimana tiap-tiapnya dibuat 3 kali pengulangan yang dilakukan pada hari yang berbeda. Dari hasil pengujian terlihat bahwa harga RSD untuk hari yang berbeda adalah 0,720%.

Dari hasil pengujian secara KCKT terhadap ekstrak beberapa spesies *Garcinia spp* ini diketahui bahwa masing-masing ekstrak uji mengandung senyawa rubraxanton dengan kandungan dalam masing-masing ekstrak adalah *G. mangostana* = 9,161%, *G. cowa* = 6,942%, *G. dioica* = 6,762%, *G. forbesii* = 0,499% dan *G. griffitii* 0,229%. Dari data ini terlihat bahwa kadar rubraxanton dalam ekstrak *G. mangostana*, *G. cowa* dan *G. dioica* >1% (Gambar 3), sehingga dapat

dikatakan bahwa rubraxanton merupakan salah satu komponen mayor dalam ekstrak tumbuhan ini. Sementara pada *G. forbesii* dan *G. griffitii* rubraxanton merupakan komponen minor karena kadarnya yang kurang dari 1% dalam masing-masing ekstrak tersebut.

Dari penelitian ini diperoleh informasi bahwa ekstrak dengan kandungan rubraxanton tertinggi adalah pada spesies *G. mangostana* (Gambar 4).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan kolom fase terbalik C-18 fase gerak metanol air dengan sistem *gradient polarity* yang dimulai dengan metanol 20 % sampai metanol 100% dengan kenaikan metanol 2%/menit, kecepatan aliran 1ml/menit, detektor UV pada panjang gelombang 243nm merupakan metoda yang tervalidasi meliputi presisi, akurasi dan *recovery*, linieritas, LOD dan LOQ, spesifisitas memenuhi persyaratan yang ditetapkan. Kadar rubraxanton dalam ekstrak *Garcinia spp* yang diperoleh dengan metoda KCKT adalah *G. Manostana* 9,161%, *G. cowa* 6,942%, *G. dioica* 6,762%, *G. forbesii* 0,499% dan *G. griffiti* 0,229% dimana ekstrak dengan kadar rubraxanton tertinggi adalah pada ekstrak *G. mangostana*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cannel RJP. Natural Product Isolation. Tokowa – New Jersey: Human Press Inc 1998: 170-175
2. Iimuna M, Tosa H, Tanaka T, Asai F, Kobayashi Y, Shimano R, Miyauchi K. Antibacterial Activity of Xanthenes from Guttiferous Plants Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol* 1996; 48(8): 861-5
3. Pattalung PN, Wiriyachitra P, Ongsakul M. The antimicrobial activities of rubraxanthone isolated from *Garcinia parvifolia* Miq. *Journal Science Social* 1988; 14: 67-71.
4. Lee H, Chan H. 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-8-(3,7-dimethyl-2,6-octadienyl) xanthenone from *Garcinia cowa*. *Phytochemistry* 1997; 16: 20038-20040.
5. Abusarakam W, Phongpaichit S, Jansakul C, Wiriyachitra P. Screening of Antibacterial Activity of Chemical Xanthon from *Garcinia mangostana*. *Journal of Science and Technology* 1983; 5: 337 – 339.
6. Dachriyanus, Dianita R, Jubahar J. Uji Aktivitas Antimikroba dan Antioksidan Senyawa Hasil Isolasi dari Kulit Batang Tumbuhan *Garcinia cowa* Roxb. *Jurnal*

- Matematika dan Pengetahuan Alam 2003; 12.
7. World Health Organization. Quality Control Methods for Medicinal Plant Material. England, 199
 - The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 24th ed and The National Formulary 19th ed Rockville. P 2000: 2149 – 2151.
 8. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Indonesia. Ed IV. Jakarta, Indonesia, 1996.
 9. Departemen Republik Indonesia. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta: Indonesia, 2000.
 10. Adamovics JA. Chromatographic analysis of Pharmaceuticals. New York: Marcell Dekker, 1990.