

**VALIDASI METODE ANALISA PENETAPAN KADAR
EPIGALOKATEKIN GALAT
DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**VALIDATION METHOD OF QUANTITATIVE ANALYSIS OF
EPIGALLOCATECHIN GALLAT BY HIGH PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Nining Sugihartini¹, Achmad Fudholi², Suwidjiyo Pramono², Sismindari²

¹ *Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan*

Jl. Prof. Dr. Soepomo, Janturan, Yogyakarta

² *Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada*

Email: nining.sugihartini@pharm.uad.ac.id

ABSTRAK

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan metode analisis yang dapat dipergunakan untuk menetapkan kadar epigalokatekin galat yang terkandung dalam ekstrak teh hijau. Metode tersebut perlu divalidasi untuk membuktikan bahwa metode tersebut akan memberikan hasil pengukuran yang sesuai dengan peruntukannya. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa metode KCKT yang digunakan akan memberikan selektifitas, linieritas, ketelitian, ketepatan yang memenuhi persyaratan dan diketahui batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ). Pada penelitian ini, selektifitas diketahui dengan menghitung resolusi antar dua puncak yang berturutan. Penetapan kadar 10 ug/mL dan 100 ug/mL dengan replikasi 5 kali dilakukan untuk mengetahui ketelitian (berdasarkan nilai CV) dan ketepatan (berdasarkan nilai perolehan kembali). Linieritas diketahui dengan menghitung nilai r pada kurva hubungan antara kadar dan luas area kromatogram. Dari persamaan kurva baku tersebut juga dapat dihitung nilai LOD dan LOQ. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode yang digunakan memenuhi persyaratan selektifitas dengan nilai $R_s 2,27 > 1,5$; cukup linier dengan nilai $r=0,997$; memiliki ketelitian dengan nilai CV 8,74% pada kadar 200 $\mu\text{g/mL}$ dan 3,74% pada kadar 500 $\mu\text{g/mL}$; ketepatan dengan nilai perolehan kembali 99,76% pada kadar 200 $\mu\text{g/mL}$ dan 100,52% pada kadar 500 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai LOD sebesar 33,28 ug/mL dan LOQ sebesar 110,93 ug/mL.

Kata kunci : Epigalokatekin galat, Validasi, KCKT

ABSTRACT

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was one of analytical methods commonly used to determine the concentration of epigallocatechin gallate (EGCG) on green tea extract. The method must be validated in order to fit to its purpose. The aim of this research was to prove that the used method has selectivity, linearity, precise, accurate and know limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) is acceptable. The selectivity of analytical method was determined by calculating the resolution value between two peak. Data from 10 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$ with 5 replicates would give precision and accuracy. Precision was known from CV

value and accuracy was known from recovery value in each concentration. Linearity was known from regression linear between concentration and wide area of peak. From regression linear could calculate LOD and LOQ. Research show that method of analyse have selectivity with $R_s = 2.27 > 1.5$; linearity with $r = 0.99$; precision with CV 8.74% at concentration 200 $\mu\text{g/mL}$ and 3.74% at concentration 500 $\mu\text{g/mL}$; accuracy with recovery 99.76% at concentration 200 $\mu\text{g/mL}$ and 100.52% at concentration 500 $\mu\text{g/mL}$ and the value of LOD is 33.28 $\mu\text{g/mL}$ and LOQ is 110.93 $\mu\text{g/mL}$.

Key word : Epigallocatechin gallate, Validation, HPLC

PENDAHULUAN

Senyawa *epigallocatechin gallate* (EGCG) telah terbukti memiliki banyak khasiat bagi kesehatan kulit berdasarkan hasil penelitian secara *in vitro* maupun *in vivo* (Hsu, 2005). Berbagai bentuk sediaan telah dikembangkan agar khasiat tersebut dapat dirasakan manfaatnya oleh masyarakat luas. Di sisi lain efektivitas penggunaan produk tersebut sangat tergantung pada kadar EGCG yang ada dalam bahan baku, ekstrak maupun dalam bentuk sediaan. Oleh karena itu diperlukan metode analisa penetapan kadar untuk mengetahui kadar EGCG dalam produk.

Metode analisa yang sekarang ini banyak digunakan adalah metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Metode tersebut mampu memberikan data baik secara kualitatif maupun kuantitatif dengan tepat dan teliti dibandingkan metode analisa yang lain. Meskipun demikian kelemahan dari metode ini adalah biaya yang diperlukan relatif lebih mahal.

Validasi terhadap suatu metode analisa menjadi faktor penting karena hanya metode analisa yang telah dibuktikan validitasnya maka hasil pengukurannya bisa dipertanggungjawabkan dan dipergunakan sebagai landasan dalam perhitungan berikutnya. Beberapa parameter dalam melakukan validasi tersebut meliputi linieritas, selektivitas, ketelitian,

ketepatan, *limit of detection* dan *limit of quantification*.

Parameter linieritas menggambarkan hubungan yang linier antara konsentrasi dan serapan sehingga persamaan yang diperoleh dapat dipergunakan untuk menghitung konsentrasi zat aktif dalam sampel yang diketahui serapannya (Anonim, 2006). Sedangkan parameter selektivitas menggambarkan kemampuan metode analisa untuk memisahkan zat aktif dari komponen lainnya, ketelitian menggambarkan kedekatan hasil uji dalam beberapa kali pengulangan, ketepatan menggambarkan kedekatan hasil uji dengan nilai yang sesungguhnya, *limit of detection* menggambarkan jumlah minimal yang mampu dideteksi oleh metode analisa dan *limit of quantification* menggambarkan jumlah minimal yang mampu dideteksi oleh metode analisa yang dapat dipertanggungjawabkan secara kuantitatif (Snyder dkk., 1997; Anonim, 2006; Miller & Miller, 2000).

Pada penelitian ini EGCG yang ditetapkan terkandung dalam ekstrak setelah proses penyarian sehingga hasil pengukuran yang diperoleh merupakan informasi penting bagi standarisasi ekstrak dan evaluasi efisiensi proses penyarian. Selain itu metode analisa ini juga digunakan untuk menetapkan kadar EGCG dalam larutan sampel hasil transpor EGCG menembus membran sehingga hasil pengukurannya merupakan informasi penting untuk mengevaluasi transpor EGCG.

Berdasarkan hal tersebut maka validasi terhadap metode analisa yang akan digunakan menggunakan peralatan yang ada menjadi sangat penting untuk dilakukan.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat berupa Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Shimadzu, Japan), kolom C 18 (Shimadzu), penyaring vakum, penyaring Whatman 0,45 μm dan alat gelas.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Standar epigalokatekin galat (E Merck dengan tingkat kemurnian 95%), Asetonitril (derajat kromatografi), metanol (p.a), aquabides, membran nylon 0,45 μm , asam fosfat (p.a) dan trietilamin (p.a).

Jalannya Penelitian

1. Kondisi KCKT

Pada penelitian ini digunakan fase gerak yang merupakan campuran antara asam fosfat 0,1%:metanol:asetonitril:aquabides dengan perbandingan 14:1:3:7. Aquabides yang digunakan sebelumnya telah disaring. Setelah keempatnya dicampur kemudian ditambahkan tri etilamin sampai diperoleh pH larutan 4. Kondisi yang digunakan dalam penetapan kadar epigalokatekin galat adalah menggunakan fase diam C 18, kecepatan alir 1 mL/menit, detektor spektrofotometer uv dengan λ 280 nm dan volume injeksi 20 μl .

2. Parameter validasi

a. Selektifitas

Selektifitas metode dapat dapat ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s) dengan persamaan:

$$R_s = \frac{2.(Rt_B - Rt_A)}{W_A + W_B} \geq 1,5$$

Dimana:

Rt_A = waktu retensi puncak pertama

Rt_B = waktu retensi puncak kedua

W_A = lebar alas puncak pertama

W_B = lebar alas puncak kedua

b. Linieritas

Seri larutan baku dibuat pada konsentrasi 10, 25, 50, 100, 200 dan 400 $\mu\text{g/mL}$. Larutan disaring dengan membran nilon 0,45 μm yang selanjutnya diinjeksikan pada sistem KCKT. Luas area yang dihasilkan dicatat dan dibuat persamaan linier hubungan antara kadar dan luas area yang dihasilkan. Nilai r dari persamaan tersebut menggambarkan linieritas. Persamaan dinyatakan linier jika nilai r yang diperoleh lebih besar dari r tabel.

c. Ketelitian

Untuk uji ketelitian dibuat kadar 10 dan 100 $\mu\text{g/mL}$ dengan replikasi sebanyak 5 dan kemudian ditetapkan kadarnya dengan KCKT. Kadar sampel ditetapkan berdasarkan kurva baku yang sudah diperoleh. Selanjutnya dihitung kadar rata-rata, SD dan CV. Metode dinyatakan teliti jika $CV \leq 2\%$ (Snyder dkk., 1997; Miller & Crowther, 2000).

d. Batas Deteksi LOD dan LOQ

Batas deteksi dihitung berdasarkan persamaan kurva baku yang sudah diperoleh (Anonim, 2006).

e. Ketepatan (*accuracy*)

Pengujian dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit murni ke dalam campuran pembawa. Kemudian campuran dianalisis dan hasilnya dibandingkan terhadap kadar analit yang ditambahkan (kadar sebenarnya). Kriteria tepat diberikan jika hasil analisis memberikan perolehan kembali antara 98-102% (AOAC, 2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini EGCG ditetapkan kadarnya pada panjang gelombang 280 nm dengan menggunakan campuran fase gerak asam fosfat 0,1%:metanol:asetonitril:aquabides (14:1:3:7) (Martono, 2009). Partikel yang masih ada dalam aquabides dihilangkan agar tidak mengganggu proses elusi dengan proses penyaringan sebelumnya. Fase gerak tersebut dibuat pH-nya menjadi 4 dengan penambahan tri etilamin karena berdasarkan literatur diketahui bahwa EGCG lebih stabil dalam kondisi asam (Hirun and Roach, 2011).

1. Selektifitas

Nilai resolusi digunakan sebagai parameter untuk menunjukkan selektifitas metode analisis berdasarkan pemisahan antar puncak (*peak*) dengan nilai yang baik adalah ≥ 2 (Snyder dkk., 1997). Literatur lain menyebutkan bahwa nilai $R_s \geq 1,5$ sudah menunjukkan pemisahan puncak yang baik (Sastrohamidjojo, 2002). Hasil pengukuran waktu retensi dan lebar alas puncak yang berdekatan dengan puncak EGCG disajikan pada Tabel I.

Tabel I. Data waktu retensi dan lebar alas puncak yang berdekatan

	Puncak sebelum puncak EGCG	Puncak EGCG
Waktu retensi (Rt) (menit)	6,743	9,255
Lebar alas (cm)	0,6	1,6

Berdasarkan hasil perhitungan diketahui bahwa nilai resolusi antara kedua puncak adalah 2,27. Hal ini menunjukkan bahwa pemisahan antara dua puncak yang berdekatan sudah menunjukkan pemisahan yang cukup baik yaitu memenuhi persyaratan nilai $R_s \geq 1,5$.

2. Linieritas

Koefisien korelasi (r) menunjukkan tingkat linieritas hubungan antara kadar analit

dengan luas area puncak. Persamaan yang menyatakan hubungan antara kadar analit dan luas puncak disajikan pada gambar 1 dengan nilai $r = 0,997$. Nilai r ini lebih besar daripada r tabel (0,8783) sehingga dapat dikatakan persamaan kurva bakunya linier.

3. LOD/LOQ

Limit of Detection menggambarkan konsentrasi analit terkecil dalam sampel yang masih dapat diukur. Nilai tersebut ditentukan melalui ratio *Signal to Noise* (S/N) dengan cara mengukur analit pada konsentrasi yang telah diketahui terhadap blanko. Nilai LOD untuk KCKT didasarkan pada S/N yaitu sebesar 3:1 (Anonim, 2006; Snyder dkk., 1997).

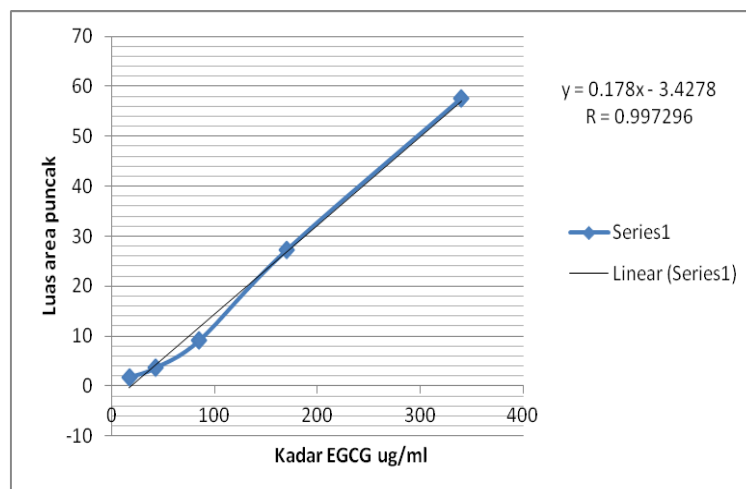
Limit of Quantification menggambarkan konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat dianalisis dengan presisi dan akurasi di bawah kondisi percobaan tertentu. Nilai tersebut ditentukan dengan membandingkan *Signal to Noise* yaitu sebesar 10:1 (Anonim, 2006).

Berdasarkan persamaan kurva baku maka diperoleh nilai LOD dan LOQ pada metode analisa yang dipergunakan sebesar 33,28 $\mu\text{g/mL}$ dan 110,93 $\mu\text{g/mL}$.

4. Ketelitian

Metode analisa yang teliti akan memberikan hasil pengukuran tetap pada setiap waktu dari sampel yang sama. Presisi dinyatakan sebagai *standard deviation* (SD) atau *Relative Standard Deviation* (RSD) atau *Coefficient of Variation* (CV)

Ketelitian pada penelitian ini dievaluasi dengan menggunakan dua kadar yaitu 200 $\mu\text{g/mL}$ dan 500 $\mu\text{g/mL}$ dengan replikasi sebanyak 3 kali. Hasil perhitungan nilai CV disajikan pada Tabel II yang menunjukkan bahwa nilai CV pada kadar 200 $\mu\text{g/mL}$ sebesar 8,74% dan pada kadar 500 $\mu\text{g/mL}$ sebesar 3,74%. Besarnya nilai CV kemungkinan disebabkan adanya kesalahan random yang terjadi selama uji.



Gambar 1. Kurva hubungan antara kadar EGCG dan luas area puncak

Tabel II. Nilai CV pada kadar 200 µg/mL dan 500 µg/mL

No.	Kadar (µg/mL)	SD	CV (%)
1.	200	17,43	8,74
2.	500	18,82	3,74

5. Ketepatan

Jumlah analit yang ditambahkan ke dalam sampel atau selisih antara rata-rata dan nilai sebenarnya yang dapat diterima menunjukkan ketepatan. Dalam hal ini ketepatan dihitung sebagai *persen recovery* (perolehan kembali). Hasil perhitungan rata-rata perolehan kembali disajikan pada Tabel III.

Tabel III. Rata-rata perolehan kembali pada kadar 200µg/mL dan 500 µg/mL

No.	Kadar sebenarnya (ug/mL)	Kadar terukur (ug/mL)	Recovery (%)
1.	200	199,51±17,43	99,76
2.	500	502,62±18,82	100,52

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa perolehan kembali antara 98-102% sehingga metode analisa yang digunakan diharapkan akan

memberikan data mendekati dengan yang sebenarnya (AOAC, 2002 dan Ermer dan Miller, 2005).

KESIMPULAN

Kesimpulan yang bisa diambil dari penelitian ini adalah:

Metode yang digunakan sudah memiliki selektifitas dengan nilai $R_s 2,27 > 1,5$; cukup linier dengan nilai $r=0,997$; memiliki ketelitian dengan nilai CV 8,74% pada kadar 200 µg/mL dan 3,74% pada kadar 500 µg/mL; ketepatan dengan nilai perolehan kembali 99,76% pada kadar 200 µg/mL dan 100,52% pada kadar 500 µg/mL dan nilai LOD sebesar 33,28 ug/mL dan LOQ sebesar 110,93 ug/mL.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Ditjen DIKTI melalui anggaran BPPS Program S3 tahun 2007.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2006, *The United State Pharmacopeia*, 29th Ed., 3050-3053, United State Pharmacopeia Convention Inc., Rockville
- AOAC, 2002, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, AOAC International
- Ermer, J., and Miller, H., 2008, *Method Validation in Pharmaceutical Analysis A Guide To Best Practice*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Hirun, S., Mai, C., and Roach, P. D., 2011, An Improved Solvent Extraction Method for The Analysis of Catechins and Caffeine in Green tea, *Journal of Food and Nutrition Research*, **50**.
- Hsu, S., 2005, Green Tea and The Skin, *J. Am. Acad. of Dermatol.*, 52:1049-59
- Martono, Y., 2009, Validasi Metode KCKT Isokratik untuk Penetapan Kadar Asam Galat, Kafein dan EGCG pada Berbagai Produk Teh Celup, *Tesis*, Program Pascasarjana Fakultas Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Miller, J.C and Miller J.N., 1991, *Statistik untuk Kimia Analisis*, edisi kedua, 109-120, diterjemahkan oleh Suroso ITB, Bandung
- Miller, J.M and Crowther, J.B., 2000, *Analytical Chemistry in a GMP Enviroment, a Practical Guide*, 84-99, John Willey and Sons Inc., New York
- Sastrohamodjojo, H., 2002, *Kromatografi*, 67-77, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J and Glajch, J.L., 1997, *Practical HPLC Method Development*, 2nd, 644-646, 686-702, John Willey & Sons Inc., New York