

VALIDASI METODE ANALISIS MANGIFERIN DALAM PLASMA *IN VITRO* SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS-DENSITOMETRI

Roslinda Rasyid¹, Ermi Nofriyelli¹, Regina Andayani¹

¹Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Padang.

Email : roslindarasvid26@gmail.com

Abstrak

Mangiferin merupakan senyawa polifenol C-glikosilxanton yang umumnya terdapat pada daun dan kulit batang mangga (*Mangifera Indica*) dari famili Anacardiaceae. Senyawa ini memiliki aktivitas biologis sebagai antiinflamasi, antidiabetes. Konsentrasi obat dalam plasma kecil, sehingga diperlukan metode bioanalisis yang selektif, akurat dan sensitif. Metode analisis kromatografi lapis tipis-densitometri (KLT Densitometri) telah dikembangkan dan divalidasi untuk analisis mangiferin dalam plasma *in vitro*. Mangiferin diekstraksi dari plasma dengan metode pengendapan protein menggunakan metanol melalui proses vorteks selama 5 menit dan sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Analisis densitometri mangiferin dalam plasma dilakukan pada panjang gelombang 257 nm pada plat KLT silica gel 60 F₂₅₄ sebagai fase diam dan metanol-asam format 1% (3:7 v/v) sebagai fase gerak. Pemisahan mangiferin menghasilkan bercak dengan Rf 0,52. Linearitas diperoleh pada rentang konsentrasi 0,1-0,5 µg/mL menunjukkan kurva kalibrasi yang linear dengan persamaan regresi $y = 1025,4 + 1336,5x$ dan koefisien korelasi ($r = 0,9999$). Batas deteksi dan batas kuantitasi mangiferin adalah 0,008 µg/mL dan 0,028 µg/mL. Koefisien variasi (KV) *intraday* dan *interday* tidak lebih dari $\pm 15\%$ untuk konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Uji akurasi berkisar 97,5% - 98,67%. Metode analisis yang diperoleh sudah memenuhi kriteria penerimaan sesuai persyaratan validasi.

Kata kunci : Mangiferin, KLT-Densitometri, Validasi, Plasma

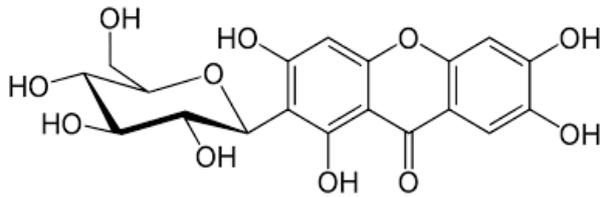
PENDAHULUAN

Mangiferin (1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone-C-2-β-D-glucoside) merupakan salah satu senyawa derivat xanton yaitu C-glicosylxanthenes yang terdistribusi secara luas pada tumbuhan tinggi seperti *Mangifera indica*, L. (Schieber, *et al.*, 2003) dan *Anemarrhena asphodeloides* (Chul, *et al.*, 2006).

Mangiferin dapat diisolasi dari bagian kulit batang, akar, daun, dan buah tumbuhan.

Mangiferin memiliki aktivitas farmakologis sebagai antidiabetes (Muruganandan, *et al.*, 2005), hepatoprotektif (Yoshikawa, *et al.*, 2002), antitumor, immunomodulator, anti-HIV (Guha, *et al.*, 1996), antioksidan, analgetik,

antelmintik dan antialergi (Leiro, *et al.*, 2003).



Gambar 1. Struktur kimia mangiferin

Salah satu tahap yang penting dalam pengembangan obat baru adalah analisis obat dalam cairan biologis atau bisa disebut bioanalisis. Hal ini perlu dilakukan untuk memperoleh data yang akan dijadikan pedoman dalam studi klinis dan studi keamanan obat (Harahap, 2010). Studi klinik menunjukkan adanya hubungan antara konsentrasi obat dalam darah dengan efek terapi dan efek toksik yang ditimbulkan. Penetapan kadar obat dalam plasma merupakan salah satu parameter yang berguna dalam uji bioavailabilitas suatu obat.

Penetapan kadar mangiferin di dalam darah memerlukan metode bioanalisis yang sensitif dan tervalidasi serta perlu dikembangkan metode preparasi sampel yang optimum. Validasi perlu dilakukan agar hasil analisis yang diperoleh terpercaya, cermat, handal untuk kepentingan analisis secara rutin.

Beberapa metode telah digunakan dalam penentuan mangiferin dalam cairan biologis seperti High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Wang, *et al.*,

2006), Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - (MS/MS) (Han, *et al.*, 2010), termasuk LC-MS telah dikembangkan (Liu, *et al.*, 2010). Namun metode penetapan kadar senyawa mangiferin dalam cairan biologis menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-densitometri belum ada dilaporkan. KLT-densitometri dipertimbangan sebagai pilihan terbaik untuk mendukung studi bioanalisis karena memberikan nilai akurasi dan presisi yang sebanding dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), spesifisitas yang tinggi, dapat dipercaya, pengerjaan relatif mudah dan cepat, biaya pengoperasian relatif mudah.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Mangiferin kemurnian 95% (Wuxi Gorunjie Natural-Pharma CO., Ltd), plasma darah manusia diperoleh dari Palang Merah Indonesia (PMI) Padang, metanol p.a (Merck), asam formiat p.a (Merck), aquades, dan fase diam plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck-Germany), TLC-Scanner 4 (Camag), pipa kapiler Nanomat (Camag), twin chamber ukuran 20x20 cm, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 7000 Pharmaspec), sentrifugator (DKC), vortex, pipet mikro (Eppendorf), pipet volume, microtube.

Prosedur penelitian

Preparasi larutan induk dan larutan standar

Ditimbang 10 mg mangiferin, kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 10 mL sehingga diperoleh larutan induk konsentrasi 1000 µg/mL. Kemudian 2 ml larutan induk dipipet ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga tanda batas, diperoleh konsentrasi larutan standar 200 µg/mL.

Pembuatan larutan asam formiat 1 %

Larutan asam formiat 98% dipipet 1 mL ke dalam labu ukur 100 mL, dicukupkan volume dengan aquades sampai tanda batas.

Preparasi dan ekstraksi mangiferin dalam plasma

Dalam *microtube* polipropilen 1,5 mL dimasukkan 200 µL larutan mangiferin konsentrasi 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,5 µg/mL dan ditambahkan 200 µL plasma masing-masingnya, kemudian divortex selama 30 detik. Selanjutnya ditambahkan 1 mL metanol sebagai pengekstrak, lalu divortex kembali 5 menit. Larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Ambil bagian supernatan larutan.

Penetapan panjang gelombang maksimum mangiferin

Dipipet 0,5 mL dari larutan standar (200 µg/mL) dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan metanol sampai tanda batas. Diukur serapan menggunakan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 200-400 nm dan ditentukan panjang gelombang serapan maksimumnya

Instrumentasi dan kondisi analisis

Analisis dilakukan dengan menggunakan lempeng KLT aluminium yang dilapisi silika gel 60 G F₂₅₄ dengan ketebalan 250 µm (E.Merck). Lempeng KLT dipotong dengan ukuran 7 cm x 2-10 cm bergantung pada jumlah larutan sampel/baku yang akan dianalisis. Larutan sampel/baku ditotolkan pada lempeng KLT menggunakan Nanomat yang dilengkapi pipa kapiler 2 µl (Camag). Jarak antar bercak adalah 1 cm. Lempeng dilusi sampai ketinggian sekitar 5 cm dalam chamber gelas yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan uap fase gerak. Fase gerak yang digunakan adalah metanol : asam format 1% dengan salah satu dari kombinasi berikut: (3:7), (8:2), (7:3), (4:6) yang dapat memisahkan senyawa paling baik pada rentang R_f 0,2-0,8. Pemindaian (scanning) densitometrik dilakukan pada 257 nm dengan KLT-densitometri "TLC-Scanner 4"

yang dilengkapi perangkat lunak CATS. Dimensi celah 8 mm x 0,4 mm dan kecepatan pemindaian 10 mm per detik.

Validasi Metode

Validasi metode analisis dilakukan dengan mengacu pada petunjuk Food and Drug Administration meliputi linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, presisi, akurasi dan selektifitas.

Linearitas. Larutan standar diencerkan dengan metanol sehingga diperoleh konsentrasi 0,1-0,5 µg/mL. Kemudian ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dengan fase gerak terpilih. Linieritas dievaluasi dengan menentukan koefisien korelasi (r) dari analisis regresi linier ($y = bx + a$) dari kurva kalibrasi hubungan antara luas puncak kromatogram bercak dengan konsentrasi zat uji.

Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi. LOD dan LOQ ditentukan dengan menggunakan data standar deviasi respon dan slope kurva kalibrasi. LOD dan LOQ dihitung masing-masing dengan persamaan $3 SBr/b$ dan $10 SBr/b$. SBr adalah satandar deviasi dari intersep- y garis regresi. b adalah slope kurva kalibrasi.

Presisi. Presisi dilakukan pada konsentrasi konsentrasi rendah (0,1 µg/mL),

sedang (0,3 µg/mL), tinggi (0,5 µg/mL) ditotolkan pada plat KLT dengan volume totolan 2 µL, dikembangkan dengan fase gerak terpilih. Dilakukan tiga kali pengulangan dalam hari yang sama (*intraday*) dan tiga hari berbeda (*interday*). Dihitung nilai %KV.

Akurasi. Larutan mangiferin dalam plasma konsentrasi rendah (0,1 µg/mL), sedang (0,3 µg/mL), tinggi (0,5 µg/mL) disiapkan seperti pada preparasi sampel. Sebanyak 2 µL ditotolkan pada plat KLT, dikembangkan dengan fase gerak terpilih. Percobaan dilakukan masing-masing tiga kali pengulangan. Dihitung perbandingan nilai terukur dari konsentrasi mangiferin dalam plasma dengan nilai sebenarnya.

Selektifitas. Dibandingkan puncak densitogram antara plasma blanko dengan puncak densitogram mangiferin dalam plasma. Metode memenuhi syarat apabila pada rentang R_f zat uji tidak terdapat puncak pengganggu yang berasal dari komponen-komponen dalam plasma.

HASIL DAN DISKUSI

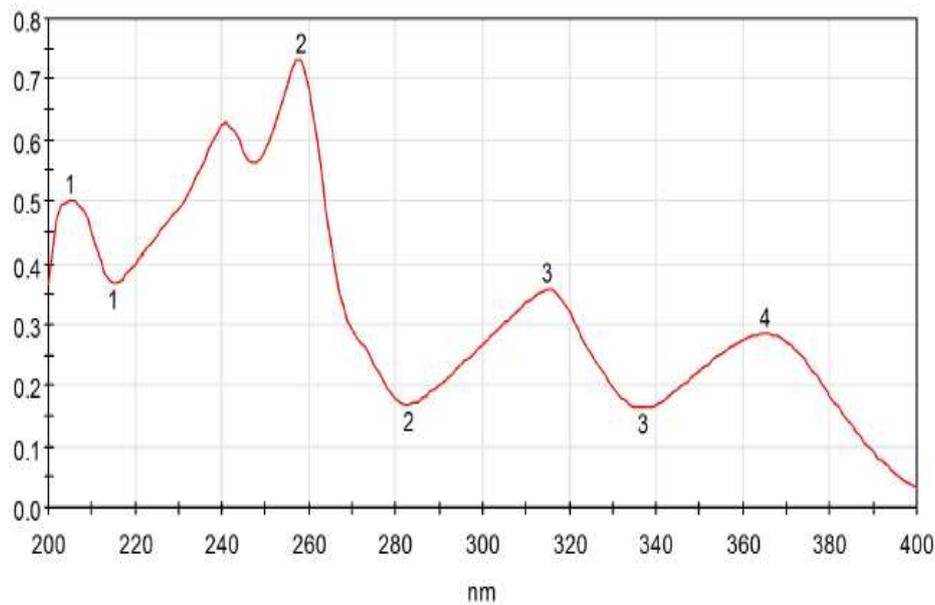
Hasil

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil :

1. Penetapan panjang gelombang maksimum mangiferin

Hasil *scanning* larutan mangiferin standar dalam pelarut metanol

menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm menunjukkan serapan maksimum pada λ_{\max} 257 nm.



Gambar 2. Spektrum UV mangiferin dalam pelarut metanol $\lambda_{\max}=257$ nm

λ_{\max} mangiferin diatur sebagai panjang gelombang yang digunakan untuk analisis menggunakan KLT-Densitometri.

2. Optimasi kondisi analisis

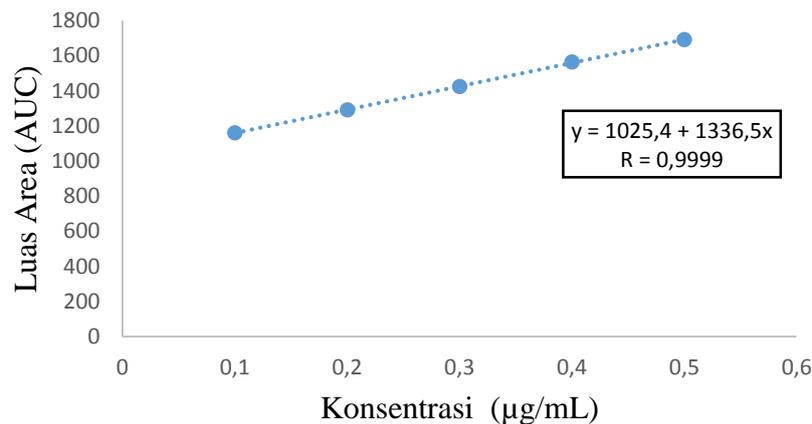
Optimasi fase gerak dilakukan dengan komposisi fase gerak yang digunakan adalah perbandingan (8:2 v/v) nilai R_f yang dihasilkan adalah 0,84, namun fase gerak ini tidak dipilih untuk digunakan dalam analisis karena nilai R_f terlalu tinggi melebihi persyaratan R_f yang baik 0,2-0,8. Perbandingan fase gerak diturunkan menjadi 7:3 v/v memberikan nilai R_f 0,8, bercak yang dihasilkan sudah cukup bagus

tapi terdapat fronting, selanjutnya dicobakan perbandingan 4:6 v/v memberikan nilai R_f 0,62, namun bercak yang dihasilkan memiliki tailing, maka fase gerak ini tidak dipilih untuk digunakan dalam analisis. Sehingga perbandingan (3:7 v/v) dipilih untuk digunakan untuk analisis karena menunjukkan pemisahan yang baik, tidak ada tailing dan nilai R_f yang dihasilkan adalah 0,52. Nilai R_f telah memenuhi ketentuan nilai R_f yang baik yaitu antara 0,2-0,8 (Rohman, 2009).

3. Uji Linearitas

Pada larutan standar mangiferin konsentrasi 0,1 – 0,5 µg/mL diperoleh kurva kalibrasi dengan persamaan regresi $y = 1025,4 + 1336,5x$ dengan nilai koefisien korelasi 0,9999. Maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis mangiferin dalam

plasma memenuhi kriteria uji linearitas $0,98 \leq r \leq 1$ pada rentang konsentrasi yang diberikan (Harmita, 2004) dan dapat diterima untuk suatu metode analisis yang valid.



Gambar 3. Kurva kalibrasi larutan mangiferin standar konsentrasi 0,1 – 0,5 µg/mL

4. Uji Batas Deteksi Dan Batas

Kuantitasi

Batas deteksi mangiferin adalah 0,008 µg/mL dan batas kuantitasnya adalah 0,028 µg/mL. Batas deteksi dan Batas kuantitasi penting untuk mengetahui batas terendah konsentrasi suatu zat yang masih dapat ditentukan dengan metode yang digunakan secara akurat dan presisi. Semakin kecil nilai batas deteksi dan kuantitasi menunjukkan semakin sensitifnya suatu metode. Dalam perhitungan analisis kadar obat dalam darah diperlukan suatu metode yang cukup sensitif yang dapat mengukur hingga satuan ng/ml.

5. Presisi

Menurut *Food and Drug Administration* (2013), suatu metode memberikan keterulangan yang baik jika nilai KV tidak melebihi 15% kecuali pada kadar analit di bawah batas kuantitasi, dimana seharusnya KV tidak melebihi 20%. Berdasarkan hasil penelitian ini konsentrasi yang digunakan untuk uji presisi di atas nilai batas kuantitasi dan nilai KV memenuhi kriteria tidak melebihi 15%. Hasil presisi *intraday* ditunjukkan pada Tabel 1 dan hasil presisi *interday* ditunjukkan pada Table 2.

Konsentrasi (µg/mL)	Waktu	Luas Area (AUC)	Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata konsentrasi (µg/mL)	SB	%KV
0,1	1	1167,2	0,106	0,104	0,002	1,62
	2	1163,7	0,103			
	3	1163,0	0,103			
0,3	1	1451,1	0,319	0,325	0,006	1,72
	2	1465,7	0,329			
	3	1461,0	0,326			
0,5	1	1688,3	0,496	0,494	0,0031	0,63
	2	1687,1	0,495			
	3	1680,6	0,490			

Tabel 1. Presisi *intraday* mangiferin standar

Konsentrasi (µg/mL)	Hari Ke-	Luas Area (AUC)	Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata konsentrasi (µg/mL)	SB	%KV
0,1	1	1156,3	0,098	0,098	0,001	0,76
	2	1156,1	0,098			
	3	1158	0,099			
0,3	1	1461	0,326	0,330	0,004	1,82
	2	1477,1	0,333			
	3	1467,7	0,342			
0,5	1	1667,8	0,481	0,490	0,0092	1,89
	2	1679,2	0,489			
	3	1692,5	0,499			

Tabel 2. Presisi *interday* mangiferin standar

6. Akurasi

Konsentrasi (µg/mL)	Luas Area (AUC) rata-rata	Konsentrasi (µg/mL) rata-rata	% akurasi rata-rata
0,1	1155,8	0,097	97,57%
0,3	1420,5	0,296	98,67%
0,5	1678,9	0,489	97,80%

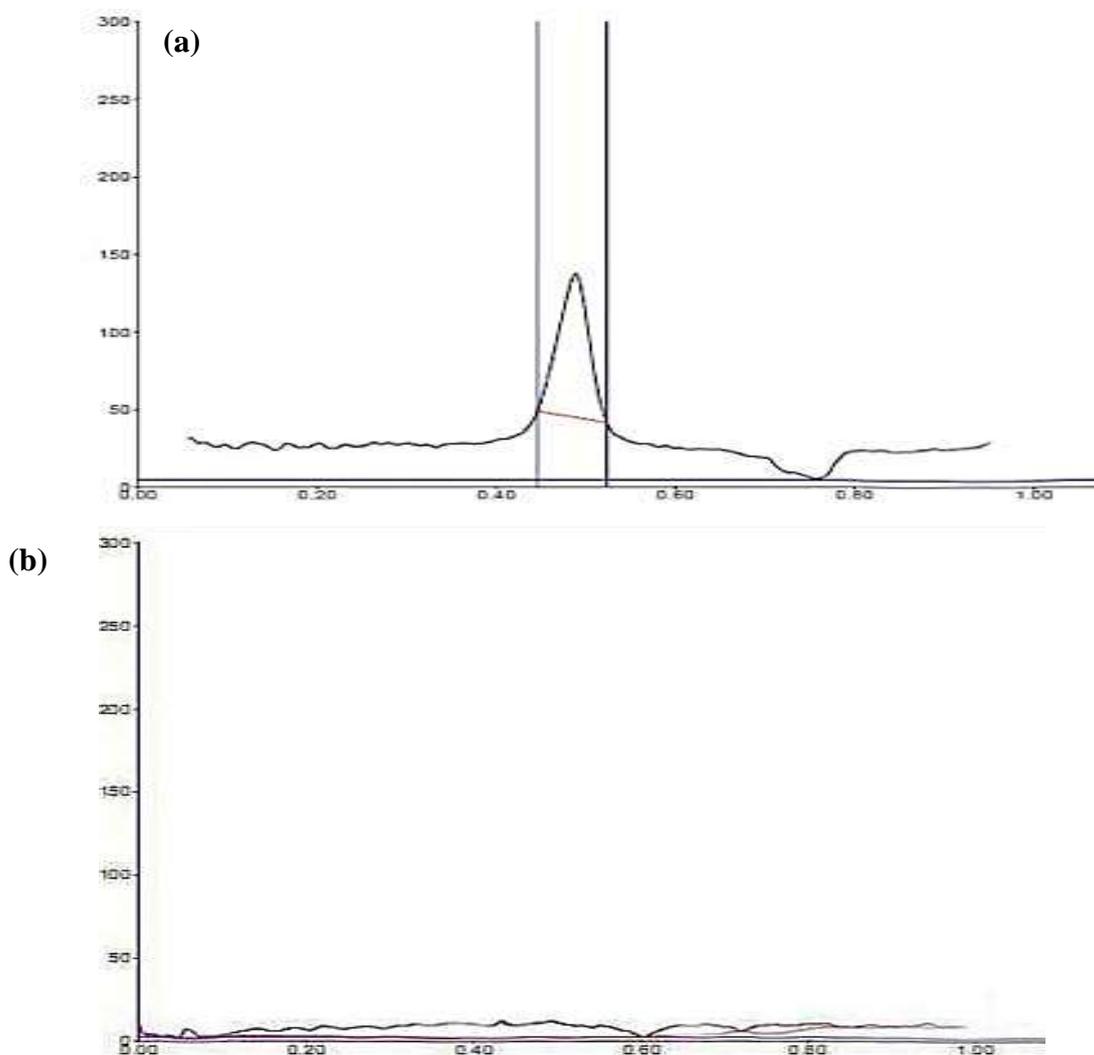
Tabel 3. Akurasi mangiferin dalam plasma *in vitro*

Pada pengujian akurasi digunakan plasma yang mengandung mangiferin dengan tiga konsentrasi yaitu konsentrasi rendah 0,1 µg/mL, konsentrasi sedang 0,3 µg/mL dan konsentrasi tinggi 0,5 µg/mL. Berdasarkan percobaan, % akurasi rata-rata untuk konsentrasi rendah 97,57%, sedang 98,67%, tinggi 97,80%. Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, nilai persen akurasi untuk analisis mangiferin dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang

dipersyaratkan yaitu berada dalam rentang 85%-115% (Harmita, 2004).

7. *Selektifitas*

Uji selektifitas dilakukan dengan membandingkan kromatogram antara blanko plasma dengan kromatogram plasma yang mengandung mangiferin konsentrasi terendah 0,1 µg/mL. Metode ini menunjukkan selektifitas yang baik, karena tidak terdapat puncak kromatogram sampel blanko plasma pada Rf puncak mangiferin.



Gambar 4. (a) Densitogram mangiferin dalam plasma konsentrasi 0,1 µg/mL, (b) Densitogram plasma blanko

KESIMPULAN

Validasi metode analisis menggunakan KLT - densitometri memberikan hasil yang cermat dan teliti dan memenuhi kriteria linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, presisi, akurasi, dan selektifitas, sehingga dapat digunakan untuk analisis mangiferin dalam plasma.

DAFTAR PUSTAKA

- Chul K, Mi-Jeong A, Jinwoong K. Preparative isolation of mangiferin from *Anemarrhena asphodeloides* rhizomes by centrifugal partition chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2007;29: 869–875.
- Food and Drug Administration. Guidance of Industry: Bioanalytical Methods Validation. Diakses 14 Oktober 2017 dari <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>; 2013.
- Guha S, Ghosal S, Chattopadhyay U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy*, 1996;42(6): 443–451.
- Han D, Chen C, Zhang C, Zhang Y, Tang X. Determination of mangiferin in rat plasma by liquid–liquid extraction with UPLC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010;5: 260–263.
- Harahap Y. Sample Preparation: Bioavailability and Bioequivalency. Jakarta: Departement Farmasi UI; 2010.
- Harmita. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2004;1(3): 117-135
- Leiro J, García D, Escalante M, Delgado R, Ubeira FM. Anthelmintic and antiallergic activities of *Mangifera indica* L. stem bark components Vimang and mangiferin. *Phytother Res.*2003;17(10): 1203-1208.
- Liu Y, Xu F, Zeng X, Yang L, Deng Y, Wu Z. Application of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to pharmacokinetic study of mangiferin in rats; *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2010;878: 3345–3350.
- Muruganandan S, Lal J, Gupta PK, Gupta S, Srinivasan K. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;97: 497–501
- Rohman A. Kromatografi untuk Analisis Obat. Yogyakarta: Graha Ilmu; 2009.
- Schieber A, Berardini N, Carle R. Identification of Flavonol and Xanthone Glycosides from Mango (*Mangifera indica* L. Cv. “Tommy Atkins”) Peels by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Agric. Food Chem* 2003; 51: 5006-5011
- Harmita. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2004;1(3): 117-135.
- Wang H, Ye G, Tang YH, Zhu HY, Ma RR, Sun ZL, Huang CG High-performance liquid chromatographic method for the determination of mangiferin in rat plasma and urine. *Biomed Chromatogr* 2006; 20 (12): 1304-8.
- Yoshikawa M, Ninomiya K, Shimoda H, Nishida N, Matsuda H. Hepatoprotective and antioxidative properties of *Salacia reticulata*: preventive effects of phenolic constituents on CCl₄-induced liver injury in mice. *Biol Pharm Bull* 2002;25(1): 72-6.