

VALIDASI METODE KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS-DENSITOMETRI UNTUK PENETAPAN KADAR KOLKISIN DALAM INFUS DAUN KEMBANG SUNGSANG (*Gloriosa superba* Linn.)

AULIYA HILMI, SUDJARWO, ASRI DARMAWATI

Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga

Email: auliya.hilmi@gmail.com

ABSTRACT

Thin layer chromatography-densitometry for determination of colchicine in Gloriosa superba Linn. infuse has been validated using selectivity, accuracy, precision and linearity parameter. The aim of this study was to obtain a valid method for determination of colchicin in Gloriosa superba Linn. infuse. The results were as follow, selective mobile phase was chloroform: diethylamine (9:1). Rf value of colchicine was 0.35 and it was completely separated from another compound in sample with Rs of 2.14 and 3.5, respectively. Linearity test showed there was linear relationship between colchicine concentration and area, represented by coefficient of correlation (r) of 0.9965 and V_{xo} of 8.19%. The average colchicine recovery was $(85.77 \pm 6.39) \%$ and its precision was 7.45%. RSD for instrument precision was 3.74%. The results of this study indicated that this method was valid and met the requirement of AOAC. Applying this method, the colchicine concentration obtained in Gloriosa superba Linn. infuse was 0.73 ppm.

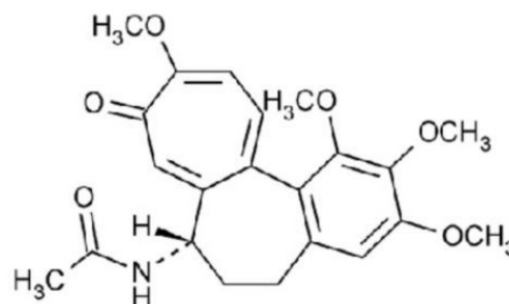
Keywords: Colchicine, thin layer chromatography-densitometry, Gloriosa superba Linn.

PENDAHULUAN

Kolkisin telah digunakan untuk pengobatan gout artritis sejak masa lalu hingga saat ini (Cocco, 2010). Salah satu tanaman yang mengandung kolkisin adalah *Gloriosa superba* Linn., yang dalam bahasa lokal dikenal dengan nama kembang sungsang (gambar 1). Kolkisin ($C_{22}H_{25}NO_6$) merupakan alkaloid yang larut dalam air (1:22), mudah larut dalam alkohol atau kloroform. Seluruh bagian tanaman *Gloriosa superba* Linn. mengandung kolkisin dengan kadar yang bervariasi. Kandungan kolkisin dalam biji adalah (0,15-0,25%), umbi (0,02-0,2%), daun tua (0,01-0,05%), daun muda (0,01-0,06%) (Arambewela, 1991). Tetapi, kandungan kolkisin dalam sediaan infus belum diketahui.



Gambar 1. Tanaman Kembang Sungsang (*Gloriosa superba* Linn.)



Gambar 2. Kolkisin (USP 30, 2007)

Infus adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit. Infus merupakan cara yang paling sederhana untuk membuat sediaan herbal dari bahan lunak seperti daun dan bunga. Kecuali dinyatakan lain infus dibuat dengan menggunakan 10% simplisia (BPOMRI, 2010).

Selain kolkisin, daun *Gloriosa superba* Linn. diketahui mengandung senyawa lain misalnya gloriosin, cornigerin, 3-dimetilkolkisin dan lain sebagainya (Khandel, 2012), sehingga penetapan kadar kolkisin dalam infus *Gloriosa superba* Linn. dapat terganggu oleh adanya senyawa lain tersebut. Oleh karena itu validasi metode penentuan kadar

kolkisin dalam infus daun *Gloriosa superba* Linn. perlu dilakukan.

Metode kromatografi lapis tipis (KLT)-densitometri merupakan salah satu metode yang diharapkan dapat digunakan untuk penentuan kadar kolkisin dalam infus karena relatif sederhana, tidak mahal, dan bila menggunakan fase gerak yang cocok akan dapat memisahkan kolkisin dari senyawa lain yang terdapat dalam infus tersebut. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan validasi metode KLT-densitometri untuk penentuan kadar kolkisin dalam infus daun *Gloriosa superba* Linn.

Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan metode KLT-densitometri yang valid untuk penetapan kadar kolkisin dalam infus daun *Gloriosa superba* Linn. berdasarkan parameter selektifitas/spesifisitas, akurasi, presisi dan linieritas (AOAC,2002).

METODE PENELITIAN

Alat

Timbangan analitik (Ohaus Pioneer), bejana kromatografi 20x10x5 cm³ (CAMAG), Densitometer (Shimadzu Dual Wavelength Chromato Scanner CS 930), Lampu UV CAMAG, freeze dryer (Eyela Freeze Dryer Model FD-81) dan alat-alat gelas yang umum digunakan pada laboratorium kimia analisis.

Bahan

Sampel: seluruh bagian daun tanaman *Gloriosa superba* Linn. yang dikumpulkan dari Desa Sungonlegowo-Kabupaten Gresik, Jawa Timur, Indonesia pada tanggal 23 Maret 2013 dan dideterminasi di Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

Kolkisin (*pharmaceutical grade*; Xi'an olin biological tech), kloroform pa (BDH), dietilamin pa (Merck), etanol (teknis), metanol pa (E.Merck), aseton pa (E Merck), air suling, dan lempeng Lapis Tipis Silika Gel 60 F₂₅₄ siap pakai (E Merck)

Prosedur Kerja

Pembuatan Larutan Baku Kolkisin untuk Uji Kualitatif

Dibuat larutan baku induk kolkisin dalam kloroform 1000 ppm. Selanjutnya dibuat larutan

baku kerja mengandung kolkisin (10 ppm – 1000 ppm) dalam pelarut kloroform.

Penentuan Kadar Air

Timbang teliti 1 – 2 gram simplisia dalam krus porselin tertutup yang telah diketahui bobot konstan. Bahan dalam krus diratakan dengan menggoyangkan krus, dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam, ditimbang, selanjutnya dipanaskan pada suhu yang sama sampai diperoleh bobot tetap (selisih penimbangan 0,25%).

Pembuatan Infus Daun *Gloriosa superba* Linn.

Daun *Gloriosa superba* Linn. dicuci sampai bersih, ditiriskan dan dikeringkan dengan diangin-angin selama satu minggu. Sampel dipotong-potong @ ± 1 cm². Sampel kering ditimbang sebanyak 100 gram kemudian dimasukkan ke dalam panci infus dan ditambahkan air suling 1000 ml. Panci infus dipanaskan di atas tangas air selama 15 menit (terhitung mulai suhu cairan mencapai 90°C) sambil sekali – kali diaduk. Akhirnya infus diserai selagi panas melalui kain flanel dan ditambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume infus 1000 ml. (BPOM RI, 2010). Infus yang diperoleh dipekatkan menggunakan Eyela Freeze Dryer Model FD-81, sampai diperoleh infus kering.

Preparasi sampel

Ditimbang teliti 2 g infus kering, ditambah dengan air suling ± 5 ml, kemudian dimasukkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur, digetarkan dengan gelombang ultrasonik selama 30-35 menit selanjutnya ditambahkan air suling hingga volume 10,0 ml. Sebanyak 2,0 ml suspensi sampel dimasukkan ke tabung reaksi, ditambah dengan 2,0 ml air suling dan 6,0 ml kloroform. Campuran tersebut diputar/vortex selama 10 menit sebelum kemudian di-sentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya diambil 4,0 ml larutan kloroform untuk diuapkan sampai kering. Ditambahkan 0,5 ml kloroform ke dalam residu ekstrak kloroform dan digetarkan selama 5-10 menit. Sebanyak 5 µl dari larutan sampel yang diperoleh ini ditotolkan pada pelat KLT.

Untuk analisis dengan cara adisi baku ditambahkan 2,0 ml larutan baku kolkisin, dalam

pelarut air, ke dalam 2,0 ml suspensi sampel sebelum diproses dengan cara yang sama.

Validasi Metode

Selektifitas

Ditotolkan larutan baku kerja kolkisin dalam kloroform, larutan sampel dan larutan sampel yang telah diadisi dengan larutan baku kerja kolkisin pada lempeng KLT silika gel GF₂₅₄. Eluasi lempeng KLT dengan fase gerak kloroform:dietilamin (9:1), kloroform:aseton:dietilamin (5:4:1) serta kloroform:metanol (9:1), kemudian dianalisis dengan KLT-densitometer.

Diamati noda analit dalam sampel yang mempunyai faktor retensi (Rf) sama dengan kolkisin baku, diperiksa kromatogram dan spektra analit menggunakan densitometer. Dipilih fase gerak yang dapat memisahkan dengan baik noda kolkisin dari noda lain didekatnya, dan dipilih panjang gelombang maksimum kolkisin pada spektra yang diamati.

Linieritas

Larutan baku kolkisin 10ppm – 1000ppm ditotolkan sebanyak 5 µl pada lempeng KLT silika gel GF₂₅₄, kemudian dieluasi dengan fase gerak kloroform:dietilamin (9:1). Diukur area pada panjang gelombang terpilih kemudian dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi kolkisin dengan area.

Berdasarkan area terukur (y) pada berbagai kadar baku kerja kolkisin (x), maka dapat dihitung harga koefisien korelasi (r). Bila ada hubungan linier antara y dengan x maka dihitung persamaan garis regresi ($y = bx + a$) dan koefisien variasi fungsi (V_{x_0}).

Akurasi

Dibuat larutan baku kolkisin 200 ppm, 250 ppm dan 300 ppm dari larutan baku induk kolkisin 500 ppm dalam pelarut air suling.

Diadisi 2,0 ml larutan baku kolkisin (dalam pelarut air suling) ke dalam 2,0 ml suspensi sampel

sebelum diproses sesuai dengan cara preparasi sampel.

Larutan ekstrak sampel yang diperoleh ditotolkan ke pada lempeng KLT sebanyak 5 mikroliter. Dieluasi menggunakan fase gerak kloroform:dietilamin (9:1). Diamati area kolkisin pada panjang gelombang terpilih menggunakan densitometer. Dihitung % perolehan kembali berdasarkan kurva baku.

Presisi Instrumen

Sebanyak 5 µl larutan baku kolkisin 400 ppm (dalam kloroform) ditotolkan sebanyak 10 kali, masing-masing dengan jarak 1 cm pada lempeng KLT silika gel GF₂₅₄. Selanjutnya dieluasi dengan fase gerak kloroform:dietilamin (9:1). Diamati area kolkisin pada panjang gelombang terpilih menggunakan densitometer. Kemudian dihitung area rata – rata, deviasi baku (SD), dan koefisien variasi (KV).

HASIL PENELITIAN

Pengeringan Sampel Daun *Gloriosa superba* Linn.

Dari 2,7 kg (berat basah) daun *Gloriosa superba* Linn diperoleh 537,1 gram daun kering (19,89 %). Dari setiap 300 gram sampel daun kering dibuat menjadi 3 liter infus dan akhirnya setelah melalui *freeze dry* dihasilkan 52,15 gram sampel kering infus (17,38 %).

Penetapan Kadar Air

Kadar air dalam sampel daun *Gloriosa superba* Linn. kering adalah $(20,00 \pm 0,26) \%$. Sedangkan kadar air sampel kering infus daun *Gloriosa superba* Linn adalah $(13,12 \pm 0,04) \%$.

Validasi Metode

Selektifitas

Hasil uji selektifitas tercantum pada tabel 1 berikut.

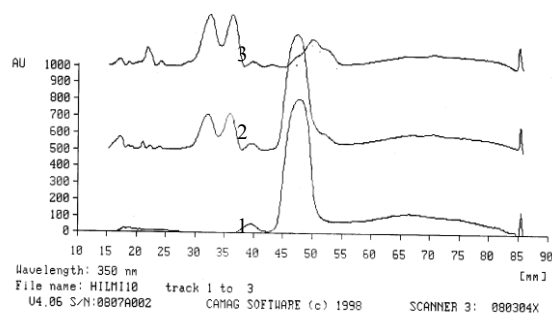
Tabel 1. Harga Rf kolkisin pada berbagai fase gerak

Komposisi Fase gerak	Rf		
	Baku kolkisin	Kolkisin hasil ekstraksi yang diadisi baku kolkisin	Kolkisin hasil ekstraksi
kloroform : aseton : dietilamin (5:4:1)	0,46	0,48	0,48
kloroform : metanol (9:1)	0,52	0,52	0,52
kloroform : dietilamin (9:1)	0,34	0,35	0,35

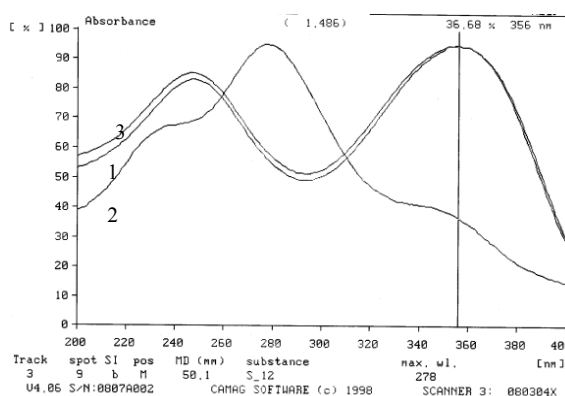
Profil kromatogram ekstrak *Gloriosa superba* Linn. dengan menggunakan fase gerak kloroform:aseton:dietilamin (5:4:1) tercantum pada gambar 3. Sedangkan profil spektra noda yang mempunyai Rf sama dengan kolkisin baku tidak menunjukkan kemiripan (gambar 4). Hal yang sama juga terjadi pada penggunaan fase gerak kloroform:metanol (9:1) (gambar 5 dan gambar 6).

Profil kromatogram sampel dengan menggunakan fase gerak kloroform:dietilamin (9:1)

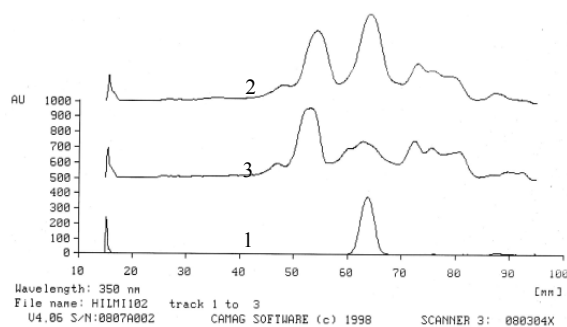
tercantum pada gambar 7. Profil spektra noda yang mempunyai Rf sama dengan kolkisin baku menunjukkan kemiripan (gambar 8). Jadi fase gerak terpilih adalah kloroform:dietilamin (9:1) karena mampu memisahkan noda kolkisin dari noda senyawa lain didekatnya (yang mempunyai Rf lebih kecil dan lebih besar) masing-masing dengan Rs 2,14 dan 3,5 dan profil spektra noda mirip (*match*) dengan spektra kolkisin baku.



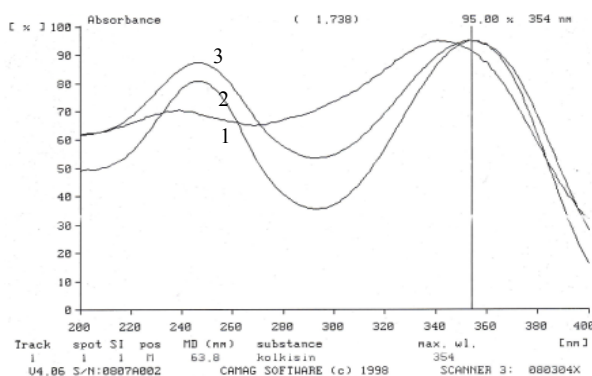
Gambar 3. Kromatogram sampel menggunakan fase gerak kloroform:aseton:dietilamin (5:4:1)
Keterangan: 1 = baku kolkisin, 2 = sampel yang diadisi dengan baku kolkisin, 3 = sampel



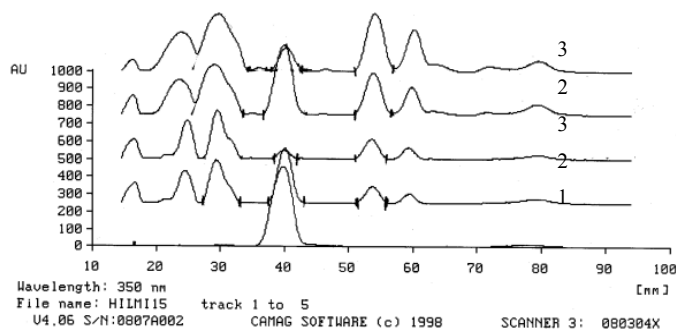
Gambar 4. Profil spektra analit pada Rf 0,46 menggunakan fase gerak kloroform:aseton:dietilamin (5:4:1)
Keterangan: 1 = baku kolkisin, 2 = sampel yang diadisi dengan baku kolkisin, 3 = sampel



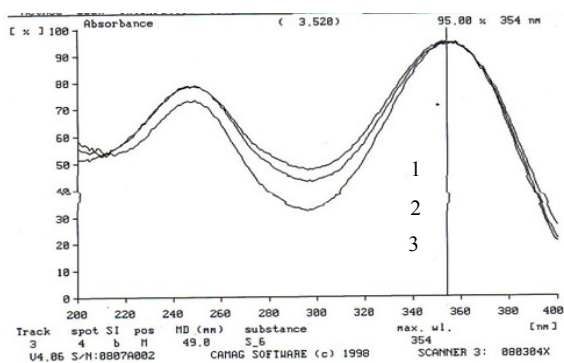
Gambar 5. Profil sampel menggunakan fase gerak kromatogram kloroform:metanol (9:1)
Keterangan: 1 = baku kolkisin, 2 = sampel yang diadisi dengan baku kolkisin, 3 = sampel



Gambar 6. Profil spektra analit pada Rf 0,52 dengan fase gerak kloroform:metanol (9:1)
Keterangan: 1 = baku kolkisin, 2 = sampel yang diadisi dengan baku kolkisin, 3 = sampel



Gambar 7. Profil kromatogram sampel menggunakan fase gerak kloroform:dietilamin (9:1)
Keterangan: 1 = baku kolkisin, 2 = sampel yang diadisi dengan baku kolkisin, 3 = sampel



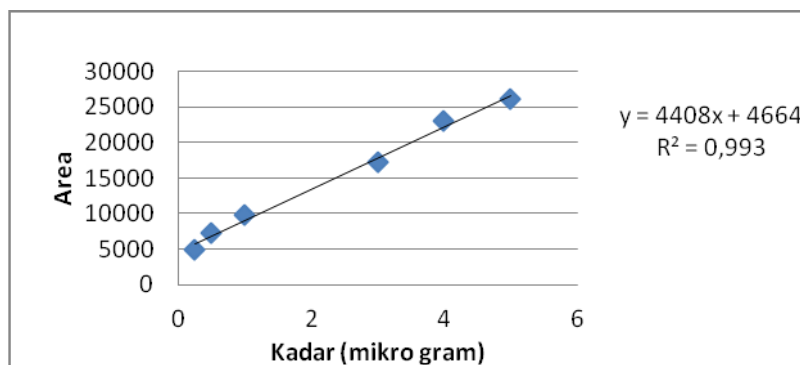
Gambar 8. Profil spektra analit pada Rf 0,34 dengan fase gerak kloroform:dietilamin (9:1)
Keterangan: 1 = baku kolkisin, 2 = sampel yang diadisi dengan baku kolkisin, 3 = sampel

Presisi Instrumen

Larutan baku kolkisin 399,2 ppm ditotolkan sebanyak 10 kali dengan volume penotolan 5 μ l dengan jarak penotolan 1 cm pada pelat KLT silika gel 60F₂₅₄. Hasil uji presisi instrumen didapatkan rata-rata area kolkisin 13921,98 unit dengan koefisien variasi (KV) sebesar 3,74%. Hasil ini baik untuk analisis dengan KLT-densitometer.

Linieritas

Hasil uji linieritas kolkisin menunjukkan adanya hubungan linier antara kadar kolkisin dengan area yang terbaca pada densitometer (koefisien korelasi 0,9965). Persamaan garis regresi $Y=4408 X + 4664$ dengan $V_{xo} = 8,19\%$ (gambar 9).



Gambar 9. Kurva linieritas baku kolkisin

Akurasi

Hasil prosentase perolehan kembali berdasarkan cara adisi baku kolkisin dengan tiga macam kadar yang berbeda tercantum pada tabel 2.

Tabel 2. Akurasi penetapan kadar kolkisin dalam infus *Gloriosa superba* Linn.

Kadar kolkisin yang ditambahkan (μ g)	Kadar kolkisin yang diperoleh (μ g)	Prosen (%) Perolehan kembali
388,0	333,1	86,10
404,8	382,6	94,51
414,4	345,6	83,40
506,0	456,9	90,30
511,0	469,5	91,89
518,0	387,3	74,77
582,0	468,2	80,61
607,2	490,5	80,79
613,2	549,4	89,59
Rata-rata		85,77 $\pm$ 6,39
Koefisien Variasi (KV)		7,45

Penetapan Kadar Kolkisin

Hasil penetapan kadar kolkisin dalam sampel infus yang dikeringkan dalam beberapa kali replikasi tercantum pada tabel 3.

Tabel 3. Penetapan kadar kolkisin dalam infus yang dikeringkan

Replikasi	Infus kering (μg)	Kolkisin diperoleh (μg)	Kadar kolkisin dalam infus kering (%)
1	$406,8 \times 10^3$	12,64	0,0031
2	$407,7 \times 10^3$	25,75	0,0063
3	$395,3 \times 10^3$	19,43	0,0049
4	$401,2 \times 10^3$	26,27	0,0065
5	$418,5 \times 10^3$	10,35	0,0025
6	$396,2 \times 10^3$	15,52	0,0039
7	$400,4 \times 10^3$	15,34	0,0038
8	$392,2 \times 10^3$	11,23	0,0029
9	$411,2 \times 10^3$	17,84	0,0043
Rata-rata			$0,0042 \pm 0,0014$
Koefisien Variasi (KV)			33,55 %

PEMBAHASAN

Sampel diekstraksi menggunakan kloroform karena kloroform dapat melarutkan kolkisin dengan baik (O'neil, M, 2006) serta merupakan bahan yang praktis tidak bercampur dengan air. Dari USP 30 proses ekstraksi kolkisin tablet dilakukan dengan menggunakan campuran air dan kloroform dengan perbandingan air:kloroform (2:3), oleh karena itu pada penelitian ini digunakan perbandingan tersebut dalam proses ekstraksi.

Pada penelitian ini didapatkan bahwa analit memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 354 nm sedangkan menurut Florey tahun 1981 panjang gelombang maksimum kolkisin adalah 350 nm. Perbedaan panjang gelombang tersebut mungkin terjadi karena perbedaan kondisi analisis, misalnya adanya pengotor (*impurities*) dalam analit (Kumar, 2006).

Uji akurasi dilakukan dengan metode adisi baku kolkisin masing-masing sebanyak 400 μg , 500 μg dan 600 μg . Rata-rata dari prosen perolehan kembali (% *recovery*) adalah $85,77\% \pm 6,39\%$. Nilai ini memenuhi persyaratan pustaka (AOAC, 2002) yaitu rata-rata perolehan kembali 75% - 120% (untuk senyawa dengan konsentrasi 1 ppm). Presisi metode berdasarkan koefisien variasi (KV) adalah 7,45 %. Nilai KV yang dihasilkan memenuhi persyaratan yaitu $\leq 8\%$ (untuk senyawa dengan konsentrasi 1 ppm). Hal ini dapat terjadi

karena beberapa faktor yaitu kadar kolkisin yang kecil, dan menggunakan pelarut yang mudah menguap serta masih terdapat senyawa lain yang mengganggu.

Penetapan kadar kolkisin dalam infus kering dilakukan dengan menggunakan kurva baku pada plat KLT yang sama. Setiap data yang diperoleh berdasarkan rata-rata dalam 2 noda dari preparasi yang sama. Berdasarkan perhitungan didapat rata-rata kadar kolkisin dalam infus kering sebesar $0,0042 \pm 0,0014\%$ (42 ± 14 ppm). Jumlah tersebut setara dengan 0,000073% b/v (0,73 ppm) kolkisin dalam infus, atau setara dengan 0,000876% b/b (8,76 ppm) dalam daun kering. Sehingga dari perhitungan dapat diketahui untuk satu sediaan yang mengandung 0,5 mg kolkisin diperlukan 57,08 gram daun *Gloriosa superba* Linn. kering. Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya (kadar kolkisin dalam daun *Gloriosa superba* Linn. pada penelitian yang dilakukan oleh Arambewela tahun 1991 yaitu 0,01 %-0,05 %). Ini dapat terjadi karena perbedaan tempat koleksi sampel, (Arambewela mengkoleksi tanaman dari Srilanka) serta metode analisis yang digunakan berbeda. Tempat tumbuh sampel yang berbeda sangat memungkinkan adanya perbedaan konsentrasi metabolit sekunder yang dihasilkan (Kunle, 2012). Selektifitas metode yang digunakan juga dapat menyebabkan perbedaan hasil analisis.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa metode KLT-Densitometri untuk penetapan kadar kolkisin dalam infus daun Gloriosa superba Linn. ini valid dan memenuhi syarat AOAC untuk analisis analit dengan kadar 1 ppm, meliputi selektivitas ($R_s = 2,14$ dan $3,5$), linieritas ($r=0,9965$), akurasi ($85,77\% \pm 6,39\%$) dan presisi ($7,45\%$).

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC, 2002. **AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals**, p. 1-38.
- Arambewela, Lakshmi S.R., Kumudini, M.A.N., and Ranatunga, J., 1991. Studies on Gloriosa superba Grown in Sri Lanka. **J. Nantn. Sci. Coun. Sri Lanka** 19 (2), p. 177-180.
- BPOM RI. 2010. **Acuan Sediaan Herbal**, volume kelima, edisi pertama, Jakarta: Direktorat OAI, Badan POM RI. hal. 3.
- Cocco, Giuseppe., Chu, David C.C., dan Pandolfi, Stefano., 2010. Colchicine in clinical medicine. A guide for internist. **European Journal of Internal Medicine**, p. 503-508.
- Florey, K., 1981. **Analytical Profil of Drug Substances**, Volume 10. London : Academic Press, Inc, p.130-182.
- Khandel, A.K., Ganguly, S., Bajaj, A., and Khan, S., 2012. New Records, Ethno-pharmacological Applications & Indigenous Uses of Gloriosa superba L. (Glory lily). **Nature and Science**, 10(5), p. 23-48.
- Kumar, S., 2006. **Organic Chemistry, Spectroscopy of Organic Compounds**. Amritsar: Guru Nanak Dev University, p. 1-17.
- Kunle., Folashade, O., Egharevba, O., Henry, A., dan Ochugu, P., 2012. Standardization of herbal medicines - A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation** Vol. 4(3), pp. 101-112. ISSN 2141-243X, p. 101-112.
- O'Neil, M., 2006. **The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Fourtenth Edition**. New Jersey: Merck&Co. Inc. p. 415.
- USP convention, 2009. **United States Pharmacopeia 32nd Ed**. New York: Food and Drug Administration, p. 549.