

PENGUJIAN VALIDASI ANALISIS KADAR ANDROGRAFOLID SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT) DENGAN ELUASI GRADIEN TERHADAP EKSTRAK HERBA SAMBILOTO (*ANDROGRAPHIS PANICULATA* NEES)

Toetik Aryani

Bagian Ilmu Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

ABSTRACT

Andrographolide of Andrographis paniculata Nees have been isolated and determined Extraction was carried out by maceration with ethanol as solvent. The concentration of Andrographolide was determined by HPLC method. The elution was carried by out gradiently using methanol: water as an eluent and UV spectrophotometer at maks 228 as detector. The result of HPLC analysis are selectivity >1.2–1.5; r was 0.9937; precision was KV < 10%; accuracy > 90%; DL was 0.075; QL was 0.50 and PW < F table. Andrographolide content of Andrographis paniculata Nees from Banyuwangi was 6.25%, Kediri was 14.69% and Surabaya was 6.83%

Key words: *andrographis paniculata Nees, andrographolide, HPLC*

PENDAHULUAN

Andrographis paniculata Nees. yang dikenal dengan nama sambiloto pada umumnya digunakan untuk pengobatan keracunan, obat tonsil, borok, thypus, demam. kencing manis, obat radang telinga, radang usus dan gigitan ular berbisa (Heyne, 1987).

Dari penelitian yang telah dilakukan diketahui bahwa herba sambiloto mengandung senyawa kimia antara lain: *Diterpen laktan* yang terdiri *andrographolida, neo-andrographolida, deoksi-andrographolida, dehidro-andrographolida, flavonoid, tanin, saponin* (Madsuda *et al.*, 1994).

Bioaktivitas tumbuhan ini antara lain bersifat imunostimulan pada tikus, efek penghancur batu empedu dan mempunyai aktivitas hepatoprotektif terhadap galaktosamin, parasetamol serta karbon tetraklorida yang bersifat toksis pada hepar tikus secara *in vivo* (Visen *et al.*, 1993).

Studi klinis membuktikan bahwa andrografolid mempunyai aktivitas menginduksi diferensiasi sel *myoloid leukemia* dalam ekstrak metanol batang *Andrographis paniculata* Nees (Madsuda *et al.*, 1994). dan mempunyai aktivitas terhadap karsinoma dan *melignan hidatifidorm mole* serta dengan kadar 5 ppm – 100 ppm mempunyai efek pada mutagenesis HCl.

Untuk mencapai keajegan khasiat, sediaan bahan alam hendaknya memenuhi kriteria kualitas mutu yang baik, aman, dan berkhasiat secara farmakologis. Untuk memenuhi kriteria tersebut, maka dilakukan standardisasi bahan baku, proses pembuatan dan produk akhir sediaan fitofarmaka, sebagai salah satu upaya pemenuhan dari produk akhir

sediaan fitofarmaka, yang telah ditetapkan terlebih dahulu dalam materia medika Indonesia (Djtmiko dan Santoso, 1994)

Salah satu langkah awal untuk membuat suatu sediaan fitofarmaka yang memenuhi kriteria, berkualitas, aman, dan berkhasiat secara farmokologis adalah standardisasi bahan baku. Bahan baku tidak hanya berarti simplisia saja namun mencakup bahan dasar sediaan fitofarmaka yaitu ekstrak tanaman yang memiliki kandungan zat aktif berkhasiat dengan kadar terapeutik.

Herba sambiloto mengandung metabolit sekunder golongan turunan laktan yaitu andrografolid sebagai komponen utama dan turunannya sampai mencapai 18 komponen, baik dalam senyawa bebas maupun senyawa glikosida. Andrografolid dengan BM 350 merupakan komponen utama. Untuk keperluan standardisasi deteksi adanya andrografolid sebagai komponen utama merupakan hal yang penting. Adanya kemiripan struktur andrografolid dan derivatnya menyebabkan kemiripan sifat fisika kimia sehingga untuk memisahkannya diperlukan metode analisis yang optimal dan mempunyai validitas tinggi untuk tujuan spesifikasi bahan, validasi internal dan penetapan kadar. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan salah satu metode analisis yang memiliki sensitivitas yang relatif tinggi dibanding metode lain karena dilakukan pada kondisi yang mendekati ideal. Salah satu cara untuk mencapai resolusi tinggi dibutuhkan eluasi gradien, dengan program pengurangan efek polaritas.

Pembuatan “sidik jari” kromatogram KCKT ditujukan untuk menentukan golongan kandungan zat tertentu misalnya sidik jari andrographolida dan turunannya (Santosa. 1991)

Apabila komponen lakton dapat dipisahkan maka pada penelitian selanjutnya dapat dilakukan penentuan kadar masing-masing komponen dengan menggunakan standar masing-masing komponen tersebut.

Adapun tahapan penelitian yang akan dilaksanakan adalah pembuatan ekstrak herba sambiloto. Identifikasi komponen andrographolida dengan metode spektroskopi Infra merah, kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi cair kinerja tinggi, validasi metode kromatografi cair kinerja tinggi dan menentukan kadar andrographolida dalam ekstrak herba sambiloto dari masing-masing sumber dengan metode KCKT eluasi gradien.

Berdasarkan latar belakang di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

Apakah metode KCKT yang telah divalidasi (parameter limit deteksi, kuantitas, linearitas serta akurasi dan presisi) dapat digunakan untuk penetapan kadar komponen Andrografolid dalam ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

Tujuan umum penelitian ini adalah 1) mengembangkan metode KCKT gradien dengan validitas optimal untuk penetapan kadar zat aktif andrografolid dalam ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees); 2) menentukan profil kromatogram ekstrak sambiloto dengan metode KCKT

Tujuan khusus penelitian ini adalah 1) mengukur beberapa parameter validasi KCKT antara lain: selektivitas, linieritas, akurasi, presisi LOD, LOQ, dalam rangka penentuan kadar zat aktif andrografolid dalam ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees); 2) menghasilkan sidik jari kromatogram andrografolid.

Dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh metode yang tervalidasi untuk menentukan kadar zat aktif andrografolid ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dengan metode KCKT sebagai syarat untuk memperoleh bahan baku simplisia yang berkualitas aman, dan berkhasiat secara farmakologis.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan: Herba sambiloto yang berasal dari Kediri, Banyuwangi dan Surabaya yang sudah dikeringkan dan dijadikan serbuk. andrografolid, zat pembanding (ex. Sigma); Metanol pro HPLC (E. Merck); Aquabidestilata (ex); Asam Fosfat pa. (E. Merck).

Alat: Seperangkat alat HPLC Perkin Elmer PE 2000 system; kolom HPLC ODS 25 cm × 0,5 cm, dengan prekolum 5 cm × 0,5 cm; *Injektor Rheodyne* dengan sampel loop 20 ml.

Preparasi sampel KCKT: Andrografolid pembanding dilarutkan dalam metanol pa; Herba sambiloto 0,5 g ditambah 5,0 ml metanol pa, dikocok dengan penggetar “ultrasonic” selama 15 menit, saring dengan filter “Whatman” 0,2 mm.

Kondisi Alat KCKT: Eluasi dilakukan gradien pada kondisi awal solvent A (As-fosfat 0,1 N dalam aquabidest): solven B (Metanol pro HPLC) = 90 10; kemudian program gradien linier selama 35 menit menuju 100% Metanol, dilanjutkan 15 menit metanol 100%, kemudian diakhiri kembali ke kondisi awal dalam 5 menit biarkan selama 5 menit; kromatogram direkam selama total waktu 60 menit.

Rancangan kerja validasi KCKT: Rancangan kerja validasi KCKT meliputi (i) pengujian selektivitas, dilakukan dengan sampel ekstrak herba sambiloto berbagai konsentrasi, dihitung linieritasnya dari puncak andrografolid; (ii) Penentuan DI (limit deteksi), LK (limit kuantitas) dan linieritas limit; (iii) Penentuan akurasi dengan metode adisi mulai dari prosedur ekstraksi herba sambiloto, dihitung beberapa *recovery*nya; (iv) Penentuan kadar andrografolid dalam sampel ekstrak herba sambiloto untuk penentuan presisi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum andrografolid 228 nm. Pada penentuan selektivitas berdasarkan penelitian identifikasi dengan KCKT gradien dengan pelarut pengembang 5 menit dengan komposisi awal sama (isokratik) dan langsung pelarut pengembang dengan cara eluasi gradien yaitu 10% metanol sampai 100% metanol mempunyai harga Rs yang berbeda. Di mana harga resolusi dengan cara langsung lebih besar sehingga selanjutnya dipakai eluen tersebut di atas. Profil ekstrak pada maks 228 nm mempunyai luas area lebih tinggi dari pada profil ekstrak pada maks 260 nm dan λ maks 275 nm selanjutnya analisis dengan KCKT dipakai λ maks 228 nm.

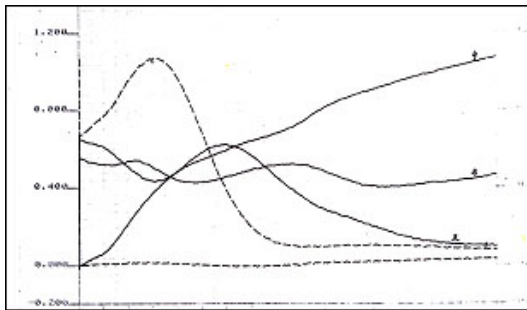
Pada penentuan linieritas 5 macam konsentrasi yaitu konsentrasi 12–100 ppm. Kelima konsentrasi di atas masing-masing dieluasi dengan eluen metanol: air (H_2PO_4) 0,15 N secara gradien dengan komposisi 10% metanol sampai 100% metanol. Pengukuran dilakukan pada λ maks 228 nm dengan kecepatan alir 1 ml/menit. Dari perhitungan koefisien regresi diperoleh harga r 0,9937 > 0,99 sehingga garis yang diperoleh linier dan valid.

Pada penentuan homogenitas menunjukkan data yang diperoleh adalah homogen di mana nilai PW yang diperoleh lebih dari F tabel yaitu 11,653 < 29,46. Pada penentuan

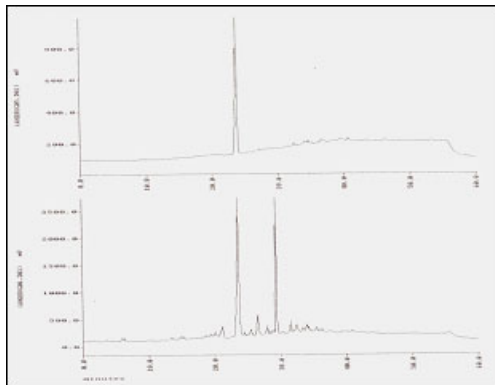
presisi atau derajat keterulangan di antara hasil uji individual jika prosedur diaplikasikan berulang-ulang terhadap sampel homogen koefisien variasi rata-rata yang didapat adalah 3,22%.

Pada penentuan akurasi dilakukan dengan cara menimbang 100 mg sampel dan selanjutnya diekstrak dengan 1 ml etanol, ekstrak ditampung, ekstraksi diulang sampai beberapa kali dimana setiap kali ekstrak ditampung dan dianalisis dengan cara KCKT sampai ekstrak bebas andrografolid, *recovery* yang didapat adalah 100%.

Kadar andrografolid yang didapat dari ekstrak etanol 96% herba sambiloto yang berasal dari Banyuwangi 6,25%, dari Kediri 14,69%, dan Surabaya 6,83%.



Gambar 1. Spektrum ekstrak sambiloto dengan metode Densitometri



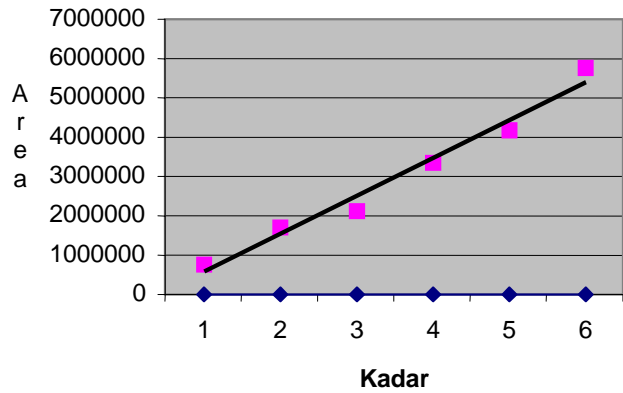
Gambar 2. Profil standar andrografolid dan ekstrak herba sambiloto pada λ 228 nm

Tabel 1. Linieritas kadar andrografolid vs. area

No.	Kadar (µg/ml)	Luas Area
1	12	782614
2	24	1705094
3	35	2135339
4	48	3356615
5	70	4187584
6	100	5768480

Persamaan garis Y = 297222,65 + 55890,23x

KURVA REGRESI



Gambar 3. Grafik hubungan antara kadar andrografolid standart dengan area

Tabel 2. Hasil penentuan limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ) standar andrografolid (sigma) secara KCKT

No	Kadar (µg/ml)	Tinggi puncak (mm)
1	Blanko	3
2	0,5	9
3	0,75	12
4	2,5	56
5	5	106

Persamaan garis y = -0,2030 + 21,37 x

$$S_b = \frac{Np-p}{5} \frac{4,80}{5} = 0,6$$

$$\text{Slope} = \frac{y_1 - y_2}{x_1 - x_2} = \frac{12 - 9}{0,75} = 0,5$$

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot S_b}{S} = \frac{3 \cdot 0,6}{24} = 0,075$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot S_b}{S} = \frac{10 \cdot 0,6}{24} = 0,25$$

Tabel 3. Area konsentrasi terkecil dan terbesar dari andrografolid standar untuk perhitungan homogenitas

No	Kadar (µg/ml)	Luas Area
1	100 ppm	4591557
	100 ppm	4754151
	100 ppm	4663720
	100 ppm	4509708
	100 ppm	4682927
	100 ppm	4595274
2	10 ppm	583667
	10 ppm	582548
	10 ppm	553812
	10 ppm	539162
	10 ppm	528505

KV = 1,48-4,486 % < 10%

PW = 11,6532 < F table (0,01-3,3)

Tabel 4. Hasil penentuan kadar andrografolid pada ekstrak metanol herba sambiloto yang berasal dari Banyuwangi, Kediri dan Surabaya

	PB	PK	PS
	6,7186	14,8594	6,9232
	6,2657	14,8405	6,7186
	5,7516	14,3639	6,8563
Jumlah	18,736	44,0633	20,4981
MEAN	6,2453	14,6879	6,8327
% KV	5,63	0,67	1,53

Identifikasi ekstrak dengan kromatografi lapis tipis menghasilkan tiga noda masing masing memperoleh panjang gelombang λ_{maks} 228 nm λ_{maks} 260nm dan λ_{maks} 275. Noda yang mempunyai harga Rf sama dengan pembanding mempunyai λ_{maks} 228 nm.

Validasi metode dalam penentuan kadar andrografolid pada ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) menghasilkan data yang cukup tervalidasi sesuai persyaratan dalam literatur yaitu nilai dalam selektivitas $> 1,2-1,5$ dalam homogenitas F hitung $< F$ tabel; r hitung $0,9937 > r$ tabel $0,666$ dalam linieritas; presisi menghasilkan KV $< 10\%$; akurasi $> 90\%$; limit deteksi dan limit kuantitasi yang diperoleh kecil sehingga cukup sensitif untuk kadar yang kecil.

Kadar yang diperoleh dari beberapa tempat dengan ekstraksi etanol 96% yang berasal dari Banyuwangi 6,25%, dari kediri 14,69% dan Surabaya 6,83%.

KEPUSTAKAAN

- Djarmiko W, Santoso MH. Strategi Pemanfaatan Sumber Daya Alam Tumbuhan Indonesia untuk Pengembangan Fitoterapeutik, *Prosiding Pendidikan Berkelanjutan Apoteker, Profesionalisme Farmasi Wiraswasta dalam pengembangan Produk Filofarmaka*, FFUA ISFI Surabaya, 17-20.
- Heyne K, 1987 *Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid III*. Badan Penelitian dan Pengembangan dan Kehutanan, Departemen Kehutanan, Jakarta, 1756.
- Madsuda T, Kuroyanagi M, Sugiyama S, Umehara K, Ueno A, Nishi K, 1994. Cell Differentiation Inducing Diterpenes from *Andrographis paniculata* Nees, in *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Pharmaceutical Society of Japan 2(6):1216-1225.
- Mulya M dan Suharman, 1995. *Analisis Instrumental*, Airlangga University Press, Surabaya, hal 236-267, 374-406.
- Mulya HS, 1999. *Ekstraksi dan Standardisasi dalam Pengembangan Produk Obat Tradisional untuk Terapi Hepatitis dari Tanaman Obat Sambiloto, Meniran, Daun urat*.
- Visen PK, Shukla B, Patnaik GK, Dhawan BN, 1993. Andrographolide Pritec rat Hepatocytes Againt Paracetamol-Induced Damage. *Journal Ethnopharmacol* 40(2): 131-136.