

# ANALISIS KUANTITATIF ANDROGRAFOLID DALAM EKSTRAK SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Ness) SECARA KLTKT-DENSITOMETRI

Awal P, Mujahid R, Yuli W.

Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional  
Badan Litbang Kesehatan  
Kem Kes RI

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian penetapan kadar andrografolide dalam ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar andrografolide dalam ekstrak sambiloto dengan menggunakan metode KLTKT-Densitometri.

Proses ekstraksi dilakukan menggunakan etanol 90%. Ekstrak etanol dan baku senyawa andrografolide ditotolkan pada plat KLTKT Silika gel-F<sub>254</sub>, dengan menggunakan Linomat 5, kemudian diekspansi dalam chamber yang berisi campuran CHCl<sub>3</sub>: MeOH (9:1), sebagai fase gerak. Setelah proses elusi, plat kemudian dikeringkan. Deteksi noda serta kuantifikasi dilakukan dengan Densitometer Scanner Camag- Wincat 4.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa panjang gelombang serapan maksimal antara noda ekstrak dan larutan baku adalah sama, yaitu pada panjang gelombang 230 nm. Kadar andrografolide pada ekstrak adalah  $15,54 \pm 0,16$  % b/b dengan KV 1,01%.

Kata kunci: Ekstrak sambiloto, KLTKT-Densitometri, andrografolid

## PENDAHULUAN

Sambiloto merupakan salah satu bahan penyusun ramuan jamu antidiabetes, dan dibuat sediaan bersama-sama simplisia yang lain dalam bentuk serbuk simplisia, pil, kapsul ataupun kaplet (Anonim, 2008). Sambiloto memiliki rasa yang sangat pahit. Rasa pahit ini disebabkan oleh senyawa andrografolid (Arshia dkk., 2007). Rasa pahit sambiloto 2,8 kali rasa pahit dari kuinin HCl (Ameh dkk., 2007).

Andrografolid merupakan senyawa aktif utama dalam sambiloto, dan berkhasiat sebagai antidiabetes (Subramanian dkk., 2008). Andrografolid ditemukan pada bagian akar (Kardono dkk., 2003), batang dan daun (Farnsworth & Bunyapraphatsara, 1992) serta herba (Kulyal dkk., 2010). Andrografolid merupakan kristal tidak berwarna larut dalam metanol, etanol, aseton, piridine, etil asetat, kloroform dan asam asetat, namun sedikit larut dalam air dan tidak larut dalam dietil eter (Qiang, 2007).

Uji kualitatif andrografolid dalam ekstrak dilakukan dengan jalan melarutkan andrografolid ataupun ekstrak dalam etil asetat (Chao & Lin, 2010). Hal ini dilakukan karena etil asetat mampu melarutkan andrografolid, namun tidak melarutkan klorofil yang masih tersisa dalam ekstrak, sehingga dapat meminimalisir kemungkinan terganggunya pengamatan karena adanya klorofil. Uji kualitatif selanjutnya dilakukan dengan jalan membandingkan nilai R<sub>f</sub> kromatogram dari andrografolid baku dan ekstrak, serta mengamati panjang gelombang maksimumnya.

Uji kuantitatif andrografolid dapat dilakukan secara titrimetri, spektrofotometri, HPLC maupun KLTKT (Mamatha, 2011). Namun metode penetapan kadar andrografolid secara spektrofotometri, memiliki kelemahan yaitu pada saat penambahan KOH etanolat

pada larutan andrografolid akan terbentuk warna merah, tetapi warna merah tersebut tidak stabil, cepat memudar (Maiti dkk., 1959). Pada penetapan kadar andrografolid secara HPLC memakan waktu relative lama, serta memerlukan banyak tahap ekstraksi dan purifikasi (Saxena, dkk., 1998; Sharma, dkk., 1992). KLTKT merupakan salah satu metode penetapan kadar yang cukup luas digunakan dengan hasil yang cukup memuaskan. Metode ini sederhana, mudah dilakukan, cukup teliti dan sensitive, serta dapat diterapkan untuk ekstrak kasar (Bhutani, 2000; Srivasta dkk., 2004), sehingga dapat diterapkan untuk penetapan kadar andrografolid dalam ekstrak. KLTKT dimaksudkan untuk mendapatkan pemisahan dan hasil analisis yang lebih baik dibandingkan KLT biasa. Fase diam pada KLTKT memiliki ukuran pori-pori yang sangat halus, serta seragam dengan ketebalan 0,1 mm. Ukuran partikel fase diam yang lebih kecil ini menyebabkan semakin banyak jumlah lempeng pemisah, sehingga pemisahan menjadi lebih efisien (Gandjar & Rohman, 2008). Pada analisis kuantitatif, bercak pada fase diam dapat langsung diukur menggunakan ukuran luas atau dengan teknik densitometri. Densitometri dapat bekerja secara serapan atau fluoresensi. Sistem fluoresensi biasanya lebih disukai karena kelinieran respon dan selektifitasnya lebih tinggi serta gangguan fluktuasi latar belakang lebih rendah (Gandjar dan Rohman, 2008). Bercak yang diukur dengan system fluoresensi, serapan ultraviolet atau sinar tampak dapat ditetapkan lebih teliti daripada bercak yang disemprot dengan pereaksi warna (Gandjar dan Rohman, 2008).

## **METODOLOGI**

### **Bahan dan Alat Penelitian**

Penelitian dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu-Jawa Tengah, dari bulan Juni 2010 hingga November 2010. Baku andrografolid (Sigma-Aldrich), Plat Silikagel F<sub>254</sub> KLTKT, 20x5, aluminium sheet (E-Merck), CHCl<sub>3</sub> (E-Merck), Metanol (E-Merck), Etil asetat (E-Merck), KLT-Densitometri, Wincat 4, Linomat 5.

### **Jalannya Penelitian**

#### **1. Penyiapan larutan baku andrografolid.**

Larutan baku dibuat dengan melarutkan 2,1 mg andrografolid dalam 50 ml etil asetat, sehingga larutan baku andrografolid memiliki konsentrasi 0,042 µg/µL.

#### **2. Penyiapan fase diam dan fase gerak.**

Fase diam menggunakan plat KLTKT Silikagel F<sub>254</sub>, aluminium sheet 20x5. Fase gerak menggunakan campuran CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1). Penjenuhan chamber dilakukan selama 20 menit, jarak eluasi 3,5 cm, deteksi kromatogram dilakukan pada 230 mn.

#### **3. Uji Kualitatif andrografolid dalam Ekstrak Sambiloto.**

Uji kualitatif andrografolid dalam ekstrak dilakukan dengan jalan melarutkan andrografolid ataupun ekstrak dalam etil asetat, ditotolkan pada plat KLTKT, dieluaskan pada fase gerak, diamati harga R<sub>f</sub> kromatogram, dibandingkan dengan standar.

#### **4. Pembuatan kurva linearitas.**

Ditimbang seksama 2,1 mg baku andrografolid, dilarutkan dalam 50 ml etil asetat. Larutan baku andrografolid dalam etil asetat (larutan 1) ditotolkan pada Plat KLTKT ukuran 5 x 20 cm, menggunakan Linomat-5. Penotolan larutan standart sebanyak 5, 10,15,20,25,30 dan 35 µL, dan dieluaskan dalam fase gerak CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1). Jarak

eluasi 3,5 cm. Deteksi dilakukan pada  $\lambda$  230 nm (Aulia, 2008). Dibuat grafik konsentrasi vs luas area. Data yang ada kemudian dimasukkan dalam persamaan regresi hingga diperoleh nilai slope (b), intersep (a) dan koefisien korelasi (r). Sebagai parameter adanya hubungan linier, digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier  $Y = a + bx$ . Hubungan linier ideal dicapai jika  $a = 0$  dan  $r = +1$  atau  $r = -1$ , bergantung pada arah garis persamaan. Rentang konsentrasi sampel menunjukkan batas terendah dan tertinggi analit yang dapat ditetapkan dengan ketepatan, ketelitian dan linearitas yang dapat diterima.

### 5. Penentuan Akurasi dan Presisi Andrographolide.

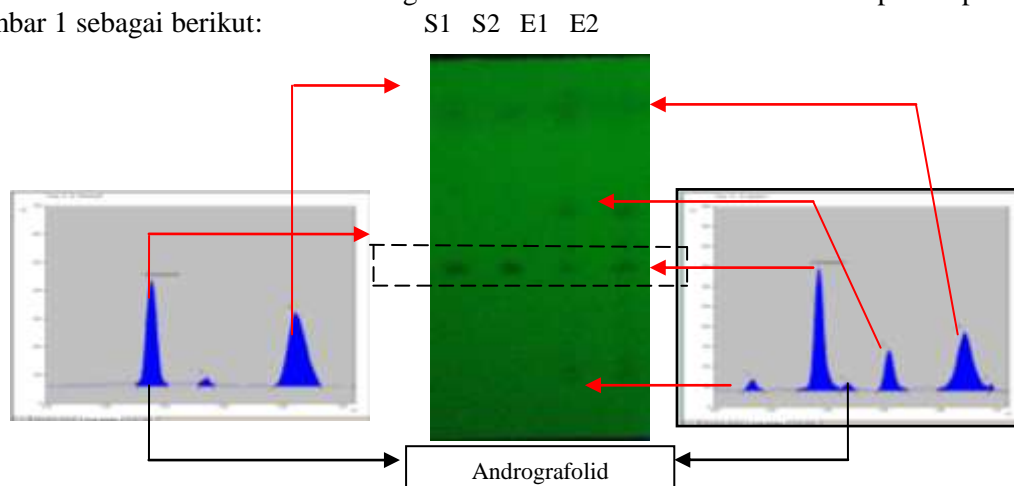
Uji akurasi dilakukan dengan menghitung perolehan kembali analit dalam rentang konsentrasi 80-120% (Harmita, 2004). Uji presisi dilakukan dengan menghitung nilai standar baku relatif atau koefisien variasi (KV). Syarat akseptabilitas akurasi dan presisi adalah nilai perolehan kembali 98-102% dan  $KV = 2\%$  (Nash & Wachter, 2003; Harmita, 2004). Perolehan kembali baku andrografolid dalam etil asetat setelah diekstraksi dengan dapar asetat pH 4,5, menunjukkan efisiensi proses ekstraksi yang dilakukan. Semakin tinggi prosen perolehan kembali, semakin efektif proses ekstraksi. Ditimbang baku andrografolid dengan konsentrasi 80-120%, dilarutkan dalam 50 ml etil asetat (larutan 1). Dipipet 1 ml larutan 1, dimasukkan dalam labu takar 5 ml, ditambah dengan 1,5 ml etil asetat, ditambah larutan dapar asetat pH 4,5, divorteks selama 3 menit, kemudian dibiarkan hingga kedua lapisan memisah. Dipipet fraksi etil asetat, kemudian ditotolkan pada plat KLTKT silikagel GF<sub>254</sub>, sebanyak 15  $\mu$ L. Dihitung perolehan kembali andrografolid.

### 6. Penetapan Kadar Andrografolid dalam ekstrak sambiloto.

Ditimbang ekstrak sambiloto  $\pm$  80,0 mg. Ekstrak dimasukkan dalam labu takar 200 ml, ditambah dengan 1 ml SLS 0,1, ditambah dengan dapar asetat hingga garis tanda (larutan 1), dihomogenkan. Dipipet 2,5 ml larutan 1, dimasukkan dalam labu takar 5 ml, ditambah dengan 2,5 ml etil asetat, divorteks selama 3 menit, kemudian dibiarkan hingga kedua lapisan memisah. Dipipet fraksi etil asetat, kemudian ditotolkan pada plat KLTKT silikagel GF<sub>254</sub>, Dihitung perolehan kembali andrografolid .

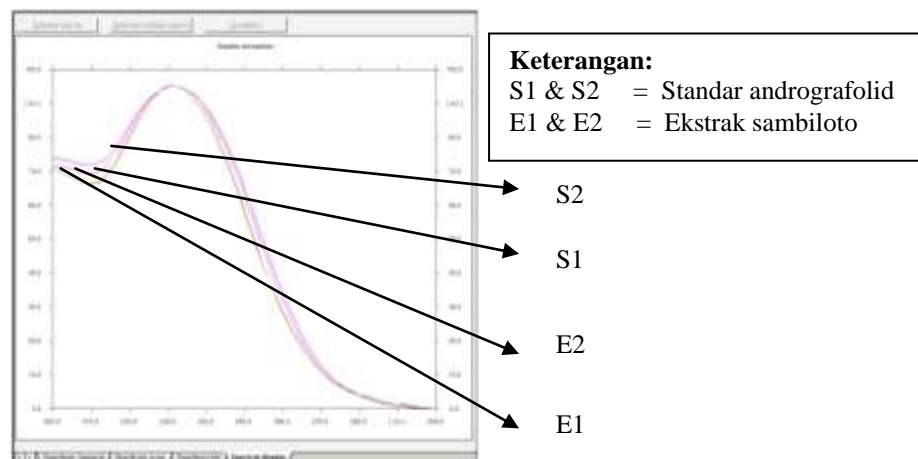
## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil analisa kualitatif andrografolid dalam ekstrak sambiloto ditampilkan pada gambar 1 sebagai berikut:



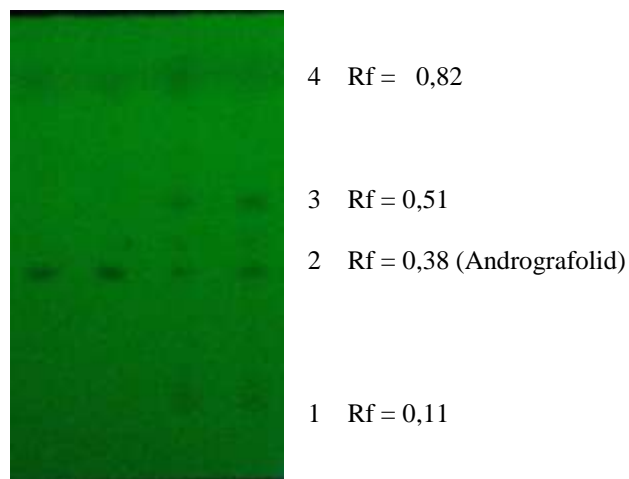
Gambar 1. Profil Kromatogram Baku andrografolid (S) dan ekstrak sambiloto (E), diamati pada UV<sub>254 nm</sub>

Pada gambar 1 terlihat bahwa pengamatan KLTKT dibawah sinar UV<sub>254</sub> nm, menunjukkan adanya pepadaman noda. Hal ini terjadi, karena adanya senyawa seng silikat yang ditambahkan pada fase diam KLTKT. Seng silikat ini akan berfluoresensi saat terpapar sinar UV 254 nm (Gandjar & Rohman, 2008). Sedangkan senyawa yang ditotolkan di atas plat, akan menghalangi masuknya sinar UV menembus plat, sehingga akan tampil sebagai bercak-bercak berwarna gelap, dengan latar belakang pendar hijau muda dari cahaya UV<sub>254</sub> nm (Sherma & Fried, 2003). Hasil pengamatan spectrum panjang gelombang maksimal antara baku andrografolid dan ekstrak sambiloto, ditampilkan pada Gambar 2.



**Gambar 2. Spektrum baku Andrografolid dan ekstrak sambiloto pada  $\lambda$  230 nm**

Dari gambar 2 terlihat bahwa panjang gelombang maksimal baku andrografolid dan ekstrak sambiloto berhimpit pada panjang gelombang 230 nm. Adapun hasil pencatatan Rf kromatogram ditampilkan pada Gambar 3.



**Gambar 3. Nilai Rf baku Andrografolid dan ekstrak sambiloto.**

Berdasarkan data *scanning* panjang gelombang larutan baku andrografolid dan ekstrak sambiloto yang berhimpit pada  $\lambda$  230 nm, serta harga Rf spot yang sama antara baku andrografolid dan ekstrak sambiloto pada nilai Rf = 0,38, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak sambiloto positif mengandung senyawa andrografolid.

Hubungan linier antara konsentrasi andrografolid baku dengan luas area ditentukan dengan membuat seri pengenceran baku andrografolid hingga diperoleh rentang konsentrasi 0,2058 µg/µL sampai 1,4406 µg/µL. Hasil yang diperoleh berupa konsentrasi vs luas area dan selanjutnya dibuat persamaan garis regresi linier serta ditentukan koefisien korelasinya. Dengan nilai koefisien korelasi tersebut, dapat ditentukan, apakah linearitasnya memenuhi syarat atau tidak, yang didasarkan pada nilai r hitung hasil regresi dibandingkan dengan r tabel pada taraf kepercayaan dan derajat bebas tertentu. Jika r hitung lebih besar dari r tabel pada p dan db tertentu, maka dikatakan bahwa linearitasnya baik dan dapat digunakan untuk perhitungan selanjutnya (Miller & Miller, 1988). Hasil terlihat pada Tabel I.

**Tabel I. Hasil uji linearitas metode densitometri berdasarkan luas area untuk pembuatan kurva baku Andrografolid (0,258-1,4406 µg/µL), setelah dieluaskan dengan CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1)**

C andrografolid (µg)	Luas Area	Luas area/10000	Persamaan Regresi
0,2058	1653	0,1653	Y = 0,4195X + 0,1194 r = 0,9901
0,4116	3009	0,3009	
0,6174	4055	0,4055	
0,8232	4881	0,4881	
1,0290	5568	0,5568	
1,2348	6461	0,6461	
1,4406	6906	0,6906	

Persamaan garis regresi (konsentrasi vs luas area)  $Y = 0,4195X + 0,1194$  menunjukkan korelasi yang baik, dilihat dari nilai r hitung lebih besar dari r tabel pada  $p = 0,05$ , db =  $n-2 = 5$  yaitu  $r = 0,754$  (Muhidin & Abdurahman, 2007).

**Tabel II. Hasil uji akurasi dan presisi baku Andrografolid**

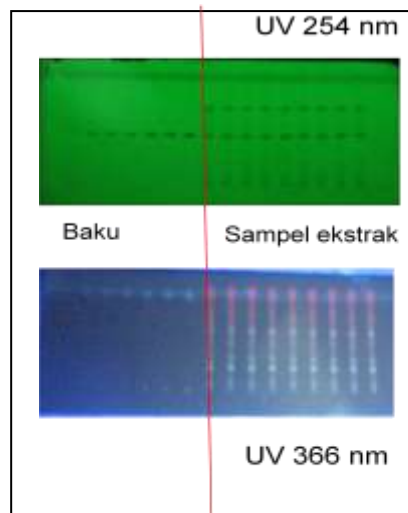
Konsentrasi	Replikasi	Luas Area teoritis/10000	Kadar tesoritis (µg)	Kadar pengamatan (µg)	Perolehan kembali (%)	KV (%)
80%	1	0,3305	1666	1677,15	100,67	1,07
	2	0,3288	1666	1663,93	99,98	
	3	0,3333	1666	1699,44	102,01	
	Rata-rata ± SD = 100,85 ± 1,08					
100%	1	0,3832	2058	2095,98	101,01	1,38
	2	0,3837	2058	2100,11	102,05	
	3	0,3772	2058	2048,50	99,54	
	Rata-rata ± SD = 101,14 ± 1,39					
120%	1	0,4281	2450	2452,78	100,11	0,95
	2	0,4244	2450	2423,61	98,92	
	3	0,4302	2450	2469,80	100,81	
	Rata-rata ± SD = 99,95 ± 0,95					

Hasil akurasi & presisi dapat dilihat pada Tabel II. Uji akurasi (ketepatan) dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui efektifitas proses ekstraksi yang dilakukan. Baku andrografolid konsentrasi 80-120%, dilarutkan dalam etil asetat, kemudian

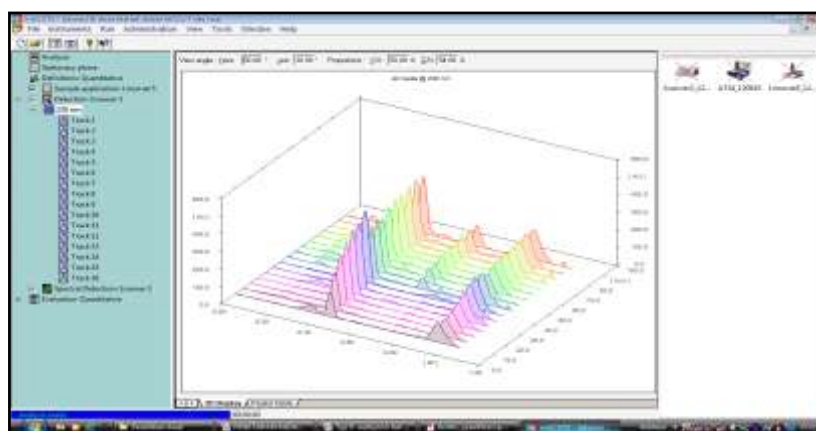
ditambah dengan dapar asetat pH 4,5 divorteks 3 menit., didiamkan hingga terpisah 2 lapisan Selanjutnya lapisan etil asetat ditetapkan kadarnya. Jika etil asetat tidak mampu melarutkan andrografolid, maka kedekatan nilai analisis kadar andrografolid dalam etil asetat setelah proses ekstraksi akan berbeda jauh dengan kadar andrografolid dalam etil asetat sebelum proses ekstraksi. Namun, jika nilai perolehan kembali andrografolid mendekati nilai sebenarnya, maka proses ekstraksi berjalan efektif.

Berdasarkan Tabel II dapat dilihat bahwa prosen perolehan kembali dari proses ekstraksi pada rentang 98,92 -102,05% dengan nilai KV berkisar pada rentang 0,95-1,07% masuk dalam rentang penerimaan data akurasi dan presisi, yaitu untuk konsentrasi analit >10%, nilai perolehan kembali 98-102%, nilai KV= 2% (Nash & Watcher, 2003; Harmita, 2004). Nilai perolehan kembali yang relatif tinggi ini, menunjukkan bahwa proses ekstraksi yang dilakukan berjalan efektif.

Pada penetapan kadar andrografolid dalam ekstrak, dilakukan 9 replikasi, untuk memastikan nilai presisinya. Profil kromatogram pada sinar UV 366 dan UV 254 dapat dilihat pada Gambar 4, sedangkan profil kromatogram hasil scanning menggunakan densitometri ditampilkan pada Gambar 5.



**Gambar 4. Profil kromatogram baku andrografolid dan ekstrak pada  $\lambda$  254 nm dan 366 nm**



**Gambar 5. Profil kromatogram baku andrografolid dan ekstrak berdasarkan densitometry**

Dari hasil pengamatan diatas diperoleh persamaan regresi sbb:  $Y = 0,3794X + 0,1318$  , dengan nilai  $r = 0,9830$ , menunjukkan korelasi yang baik, dilihat dari nilai  $r$  hitung lebih besar dari  $r$  tabel pada  $p = 0,05$ ,  $db = n-2 = 5$  yaitu  $r = 0,754$  (Muhidin & Abdurahman, 2007), sedangkan hasil penetapan kadarnya ditampilkan pada Tabel 3.

**Tabel III. Hasil penetapan kadar Andrografolid dalam ekstrak sambiloto**

Replikasi	Bobot ekstrak (µg)	Luas area/10000	Kadar (%)	Rata-rata (%)	KV (%)
1	80200	0,4613	15,47	15,54	1,01
2	80100	0,4626	15,55		
3	80100	0,4605	15,45		
4	80000	0,4562	15,27		
5	79000	0,4625	15,76		
6	80100	0,4631	15,57		
7	80200	0,4608	15,45		
8	79000	0,4621	15,74		
9	80000	0,4640	15,64		

Berdasarkan Tabel III, terlihat bahwa kadar andrografolid dalam sampel memiliki nilai presisi yang tinggi, ditunjukkan dengan nilai  $KV < 2\%$ , yang berarti bahwa sebaran data hasil analisis tidak saling berjauhan.

## KESIMPULAN

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa nilai  $R_f$  noda ekstrak dan larutan baku adalah sama yaitu 0,38, dengan panjang gelombang serapan maksimal adalah 230 nm, serta kadar andrografolid pada ekstrak adalah  $15,54 \pm 0,16\%$  b/b dengan  $KV 1,01\%$ .

## DAFTAR PUSTAKA

- Ameh., Sunday., Obodozie., Obiageri., Inyang., Uford., Abubakar., Mujibata., Garba., Makaji., 2007, A Normative Study of Nigerian Grown "Maha Tita" (King of Bitters) *Andrographis paniculata* Nees, *Int.J.Drug Dev. & Res.* Vol 2(2): 291-299.
- Anonim, 2008, *Daftar Obat Alam (DOA)* Ed.3, hal:43-45, Semarang
- Arshia, S., Manna,P.K., Paranjothy, K.L.K, Manjula, M, 2007, Entrapment of Andrografolid in Cross-Linked Alginate Pellet: 1. Formulation and evaluation of Associates Release Kinetic, *Pak.J.Pharm. Sci*, Vol 29(1): 1-9
- Aulia, N., 2008, Penetapan Kadar Andrografolida dan Kurkumin dalam Ekstrak campuran Herba Sambiloto dan Rimpang Kunyit dengan Metode KLT- Densitometri, *Skripsi*, Unair (ABSTRAK), <http://210.57.222.58/go.php?id=gdlhub-gdl-S1-2008-nuraniaulia-9207> , disitasi: November 2009.
- Bhutani KK. 2000. Fingerprintings of Ayurvedic drugs. *Eastern Pharmacist*;5:21-24.
- Chao, W,W and Lin, B,F, 2010, Isolation and Identification of Bioactive compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian), *Chin Med*, Vo.13, 5:17.
- Farnsworth, N, R, and Bunyaphrathasara, 1992, *Thai Medicinal Plants*, hal 57-62, Prachachon Co. Ltd.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2008, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 353-377.

- Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode and Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Farmasi*, Vol 1(3): 117-135
- Kardono,L,B,S., Artanti,N., Dewiyanti, I,D., Basuki, T., 2003, Selected Indonesian Medicinal Plants: Monograph and Descriptions Vol.1, 117-153, Grasindo, Jakarta.
- Kulyal, P., Tiwari, U.K., Shukla, A., Gaur,A,K., 2010, Chemical Constituent isolated from *Andrographis paniculata*, *Indian Journal of Chemistry*, Vol. 49B, hal 356-359.
- Maiti, P.C., Kanji, S.K., Chatterje., 1959. Studies in Kalmegh Extract, *Indian Journal of Pharmacy*, 21:169-171
- Mamatha, A., 2011. Quantitative KLTKT Analysis of Andrografolid in *Andrographis paniculata* Obtained from Different Geographical Sources (India), *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2): 42-44
- Miller, J.C. and Miller, J.N., 1988, 108-112, *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd Edition.
- Muhidin, S.A dan Abdurahman, M., 2007, *Analisis Korelasi, Regresi and Jalur dalam* 89-130, Penelitian, Pustaka Setia Bandung
- Nash., R, and Wachter, A., 2003, *Pharmaceutical Process Validation*, page 109-120, Marcel Dekker, New York
- Qiang, Z.Z., 2007, Reactions and Computational Studies of Andrografolid Anagoues with Glutathione and Biological Nucleophiles, *Desertation*, City University of Hong Kong
- Saxena S, Jain DC, Gupta MM, Bhakuni RS, Hari O. 1998 . Analysis of diterpenoid andrografolid from *Andrographis paniculata*. *J liq chromatogr*; 27-123.
- Sharma, A., Lal, K., Handa, S.S., 1992. Standardization of The Indian Crude Drug Kalmegh by High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Andrografolid. *Phytochemical Analysis*, 3:129-131
- Sherma, J and Fried,B., 2003, *Handbook of Thin-Layer Chromatography 3<sup>ed</sup>*, Revised & Expanded, 226-234, Marcel Dekker, New York
- Srivasta, A., Misra, H., Verma, R.K., Gupta, M.M., 2004. Chemical finger printing of *Andrographis paniculata* using HPLC, KLTKT and Densitometry., *Phytochemical Analysis*, 15: 280-285
- Subramanian, R., Azmawi,M,Z., Sadikun, A., 2008, In vitro  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrografolid, *Acta Biochimica Polonia*, Vol.55, 2, hal 391-398.