

Validasi Penetapan Kadar Isolat Andrografolid dari Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) Menggunakan HPLC

(Validation for the quantification of andrographolide
isolated from *Andrographis paniculata* nees plant using HPLC)

Yandi Syukri^{1,5*}, Agung Endro Nugroho², Ronny Martien³, & Endang Lukitaningsih⁴

¹Program Studi Farmasi Universitas Islam Indonesia

²Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

³Bagian Farmasetika, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

⁴Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

⁵Mahasiswa S3 Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

Keywords:
andrographolide,
validation, HPLC,
SNEDDS.

Kata kunci:
andrografolid;
KCKT; validasi;
SNEDDS.

ABSTRACT: The aim of study was to develop quantitative analysis of isolated andrographolide from *Andrographis paniculata* and different solvent for preliminary studies to preparation Self Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) using HPLC. The separation was acquired on Sunfire C18 column with an isocratic mixture of methanol and water at a ratio of 6:4, v/v as a mobile phase. The method to determine the content of isolated andrographolide showed an adequate precision, with a RSD smaller than 1%. The accuracy was analyzed by adding the standard andrographolide, and good recovery values were obtained for all concentrations used. The HPLC method developed in this study showed specificity and selectivity with linearity in the working range and good precision and accuracy, making it very suitable for the quantification of isolated andrographolide. Compared to the standard, the purity of the isolated andrographolide was 95.74 ± 0.29 %. Preliminary study to determine the highest solubility of isolated andrographolide in oil, surfactant and co-surfactant phases for preparation of SNEDDS were obtained 1.226 ± 0.009 of Capryol-90, 2.965 ± 0.014 of tween 20, and 6.074 ± 0.101 mg mL⁻¹ of PEG 400, respectively. Conclusion, this method suitable used to determination solubility of isolated andrographolide for preparation SNEDDS.

ABSTRAK: Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan analisis kuantitatif untuk penentuan kadar isolat andrographolide dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata*) dan pelarut yang berbeda untuk studi awal untuk pembuatan *Self Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) menggunakan KCKT. Pemisahan menggunakan kolom Sunfire C18 dengan campuran isokratik metanol dan air dengan perbandingan 6: 4, v/v sebagai fase gerak. Metode untuk menentukan isolat andrographolide menunjukkan presisi yang memadai, dengan RSD lebih kecil dari 1%. Akurasi dianalisis dengan menambahkan andrografolid standar, dan didapatkan nilai perolehan kembali yang baik untuk semua konsentrasi yang digunakan. Metode HPLC yang dikembangkan dalam penelitian ini menunjukkan spesifisitas dan selektivitas dengan linearitas dalam rentang kerja dan presisi dan akurasi yang baik, sehingga sangat cocok untuk menentukan kandungan isolat andrografolida. Dibandingkan dengan standar, kemurnian isolat andrografolida adalah $95,74 \pm 0,29\%$. Penelitian awal untuk menentukan kelarutan tertinggi isolat andrographolid adalah dalam fasa minyak Capryol-90 $1,226 \pm 0,009$ mg mL⁻¹, surfaktan tween 80 $2,965 \pm 0,014$ mg mL⁻¹ dan co-surfaktan PEG 400 $6,074 \pm 0,101$ mg mL⁻¹. Dapat disimpulkan, metode ini cocok digunakan untuk penentuan kelarutan dari isolat andrographolide untuk pembuatan SNEDDS.

*Corresponding Author: Yandi Syukri (Prodi Farmasi Universitas Islam
Indonesia, Yogyakarta)
email: yandi.sy@gmail.com

Article History:

Received: 3 Oct 2015

Published: 1 Nov 2015

Accepted: 30 Oct 2015

Available online: 30 Dec 2015

PENDAHULUAN

Andrografolid merupakan senyawa bioaktif dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) yang telah memiliki riwayat digunakan sebagai pengobatan di negara-negara Asia seperti anelgesik, antipiretik, antiinflamasi, antikanker, hipoglikemia dan antihiperlipidemia [1,2,3,4]. Dilaporkan bahwa terdapat lebih dari 20 diterpenoid dan 10 flavonoid sebagai senyawa aktif yang diperoleh dari ekstrak etanol atau metanol dari seluruh tanaman, daun dan batang dari *A. paniculata*. Andrografolid ($C_{20}H_{30}O_5$) merupakan diterpenoid utama yang terdapat pada tanaman *A. paniculata*. Diterpenoid utama lainnya adalah deoksiandrografolid, neoandrografolid, 14-deoksi-11,12-didehidroandrografolid dan isoandrografolid [5].

Permintaan tanaman yang berkhasiat sebagai obat yang digunakan sebagai produk kesehatan, suplemen makanan dan kosmetika pada negara maju ataupun berkembang semakin meningkat. Hal ini disebabkan karena adanya pengakuan bahwa produk dari bahan alam tidak toksik, memiliki sedikit efek samping, mudah didapatkan dan harga yang terjangkau. Selain itu juga diperoleh data bahwa produk dari bahan alam memiliki aktifitas biologis yang lebih luas serta batas keamanan lebih tinggi dibandingkan obat sintetik [6].

Sebagai negara kepulauan, Indonesia diberkahi dengan keanekaragaman hayati yang kaya dan unik. Luas hutan tropis Indonesia mencakup sekitar 143 juta hektar dan ditumbuhi sekitar 80% dari tanaman obat di dunia dan diperkirakan terdapat 28.000 spesies tanaman tumbuh pada hutan tropis Indonesia [7]. Pengembangan obat dari tumbuhan membutuhkan isolasi dan pemurnian senyawa yang berkhasiat dari campuran multi-komponen kompleks untuk menghasilkan produk dengan kemurnian tinggi. Sampai saat ini

penggunaan isolat andrographolide sebagai bahan baku obat sangat jarang ditemukan, padahal sudah banyak dikaji aktivitas farmakologinya. Selain itu kemurnian isolat andrografolid juga diperlukan untuk memastikan efek farmakologinya. Dengan demikian, penentuan kadar isolat andrographolide harus dapat ditentukan menggunakan KCKT yang tervalidasi.

Validasi metode analisis harus memenuhi semua persyaratan aplikasi analisis yang menjamin keandalan dari hasil analisis. Untuk itu pengujian harus menunjukkan spesifisitas, linearitas, presisi, sensitifitas, akurasi dan batas kuantitasi yang memadai untuk analisis [8]. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan analisis kuantitatif untuk penentuan kadar isolat andrographolide dari tanaman sambiloto dan pelarut yang berbeda untuk studi awal untuk pembuatan SNEDDS menggunakan KCKT.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat andrografolid, andrografolid standar (Sigma-Aldrich, kemurnian 98 %), pelarut untuk fase gerak seperti metanol dan air serta bahan untuk pembuatan SNEDDS seperti Myritol 318 (Phapros Tbk), Capryol 90 (PT. Menjangan Sakti), Labrasol (PT. Menjangan Sakti), Labrafil M1944 (PT. Menjangan Sakti), Chremophore RH 40 (PT. Bahtera Adi Jaya), asam oleat (PT. Brataco), isopropil miristat (PT. Brataco), tween 80 (PT. Brataco), tween 20 (PT. Brataco), PEG 400 (PT. Brataco), dan propilen glikol (PT. Brataco).

Cara Kerja

Analisis kuantitatif isolat andrografolid

Kondisi kromatografi : Kandungan isolat andrografolid dianalisis menggunakan KCKT (WATERS e2695, dengan detektor UV-Vis 2486).

Data diperoleh dengan perangkat lunak Empower 3.0. Pemisahan dilakukan dengan menggunakan kolom C18 sunfire (150 mm x 4,6 mm, ukuran partikel 5 μ m) menggunakan campuran isokratik metanol dan air dengan perbandingan 6 : 4 v/v sebagai fase gerak. Volume injeksi 20 μ L, kecepatan alir fase gerak 0,8 mL/menit dan detektor diatur pada panjang gelombang 229 nm [9].

Pembuatan larutan standar

Larutan stok standar dengan konsentrasi 200 μ g/mL dibuat menggunakan andrografolid standar dengan pelarut metanol kualitas KCKT. Dengan menggunakan larutan stok, suatu seri larutan standar kerja dibuat untuk penentuan kurva baku pada jarak konsentrasi tertentu.

Kesesuaian sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk menjamin pengukuran menggunakan kromatografi sesuai dengan analisis yang diharapkan. Parameter kromatografi meliputi area puncak, waktu retensi, plat teoritis dan faktor tailing diukur dan ditetapkan standar deviasinya (RSD) masing-masing [9,10].

Parameter validasi

Metode validasi sesuai dengan pedoman ICH yang meliputi linearitas, presisi, akurasi, selektifitas, batas deteksi dan batas kuantitasi. Analisis regresi linear digunakan untuk menghitung slope, intersep, dan koefisien regresi (r^2) untuk plot kalibrasi. Evaluasi ini berdasarkan area puncak. Penentuan presisi dilakukan dengan 3 konsentrasi berbeda dari larutan isolat andrografolid yang diinjeksikan sebanyak 3 replikasi pada 3 waktu yang berbeda pada hari yang sama dan pengulangan yang sama pada 3 hari yang berbeda untuk memperoleh variasi *intra-day* dan *inter-day*. Akurasi ditentukan dari uji perolehan kembali (*recovery*) dengan menambahkan sejumlah yang telah diketahui pada konsentrasi 80, 100 dan 120 % pada plasebo dengan

analisis kuantitatif replikasi dengan metode yang diusulkan. Batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung berdasarkan respon terhadap *signal to noise* dengan rasio 3 : 1 dan 10 : 1 yang secara eksperimental diverifikasi dengan mengencerkan konsentrasi larutan standar sampai respon rata-rata dengan 6 kali replikasi [11,12,13].

HASIL DAN DISKUSI

Penentuan kandungan andrografolid pada isolat andrografolid

Kesesuaian sistem

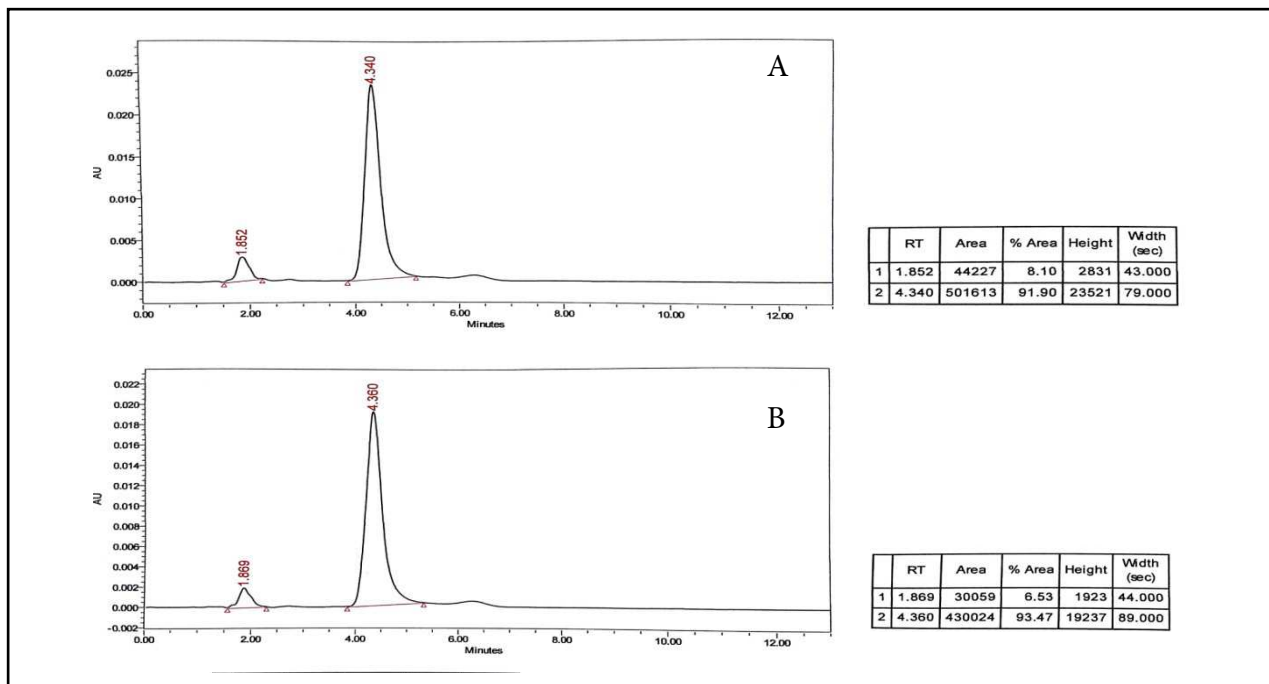
Hasil analisis yang diperoleh dari metode yang dikembangkan hanya valid jika kriteria kesesuaian sistem terpenuhi. Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar yang mengandung andrografolid 10 μ g/mL sebanyak 6 kali sehingga diperoleh kromatogram pada gambar 1.

Dari kromatogram tersebut terlihat bahwa andrografolid standar memiliki AUC 501613 dengan waktu retensi 5,340 menit, sedangkan isolat andrografolid memiliki AUC 430024 dan waktu retensi 4,360 menit. Sedangkan parameter kesesuaian sistem dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Parameter kesesuaian sistem (n = 6)

| No | Parameter | Data yang diperoleh | RSD (%) | Persyaratan |
|----|----------------------------|---------------------------|---------|-------------|
| 1 | AUC | 501675,500 \pm 1337,985 | 0,267 | RSD < 1 |
| 2 | Waktu retensi | 4,337 \pm 0,004 | 0,098 | RSD < 1 |
| 3 | Faktor tailing | 1,232 \pm 0,023 | | T \leq 2 |
| 4 | Resolusi | 4,890 \pm 0,157 | | Rs > 2 |
| 5 | Faktor retensi (kapasitas) | 2,414 \pm 0,004 | | k \geq 2 |

Dari tabel diperoleh bahwa nilai RSD untuk AUC 0,267 dan 0,098 untuk waktu retensi. Nilai yang diperoleh kurang dari 2 sehingga membuktikan bahwa reproduibilitas dari parameter ini sangat baik. Puncak asimetri yang



Gambar 1. Kromatogram andrografolid standar (A) dan isolat andrografolid (B) pada panjang gelombang 229 nm

baik dari andrografolid dinyatakan dengan nilai RSD $1,232 \pm 0,023$ dari faktor tailing. Resolusi yang diperoleh $4,890 \pm 0.157$ dengan nilai yang lebih dari 2 serta faktor retensi (kapasiltas) $2,414 \pm 0,004$ (lebih dari 2) menunjukkan kesesuaian sistem yang baik.

Parameter validasi untuk penetapan kadar andrografolid

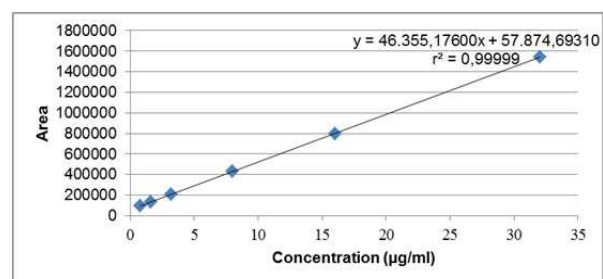
Metode yang diusulkan telah divalidasi untuk penentuan kadar andrografolida diisolasi dari sambiloto seperti yang ditunjukkan dalam tabel 2.

Tabel 2. Parameter validasi untuk penetapan kadar andrografolid

| No | Parameter | Data yang diperoleh |
|----|---|---------------------|
| 1 | Linearitas (koefisien korelasi) | 0,9999 |
| 2 | Jarak kadar ($\mu\text{g/mL}$) | 0,8 - 32 |
| 3 | Presisi <i>intra-day</i> (% RSD, n = 6) | 0,267 |
| 4 | Presisi <i>inter-day</i> (% RSD, n = 6) | 0,558 |
| 5 | Batas deteksi (μg) | 0,09 |
| 6 | Batas kuantitasi (μg) | 0,31 |

Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan membuat kurva baku untuk menilai kemampuan suatu metode analisis untuk mendapatkan hasil yang proporsional terhadap konsentrasi andrografolid dalam sampel. Linearitas dihitung dengan menggunakan 6 konsentrasi larutan dari standar andrografolid. Kurva baku yang diperoleh dengan memplotkan antara konsentrasi dan AUC dari larutan standar pada panjang gelombang 229 nm. Respon linearitas dari jarak konsentrasi dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Kurva baku andrografolid pada 229 nm.

Gambar 2 diperoleh nilai r^2 0,9999 dan ini menunjukkan linearitas yang baik.

Presisi

Presisi dari sistem dilakukan dengan melakukan injeksi 6 kali pada vial yang sama dari isolat andrografolid yang dinyatakan dengan persen relatif standar deviasi (%RSD) dari AUC. Presisi *intra-day* yang diperoleh adalah 0,267 % dan *inter-day* 0,558 %. Nilai % RSD yang rendah (kurang dari 2 %) menunjukkan bahwa metode ini memenuhi persyaratan presisi.

Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi standar andrografolid dilakukan dengan menggunakan kurva baku linear yang memberikan hasil 0,09 µg/ml LOD dan 0,31 µg/ml LOQ.

Akurasi

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar andrografolid yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan dengan persen perolehan kembali isolat andrografolid yang ditambahkan.

Tabel 3. Hasil penentuan perolehan kembali

| Parameter | Data yang diperoleh | | |
|---|---------------------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Konsentrasi awal isolat andrografolid (µg/ml) | 3.97 | 4.75 | 5.58 |
| Konsentrasi yang ditambahkan (µg/ml) | 7.39 | 7.39 | 7.39 |
| Konsentrasi total (µg/ml) | 11.36 | 12.14 | 12.97 |
| Konsentrasi yang diperoleh (µg/ml) | 11.41 | 12.30 | 13.05 |
| RSD (%) (n=3) | 0.704 | 1.635 | 1.138 |
| Perolehan kembali (%) | 101.09 | 103.17 | 101.34 |
| Rata-rata perolehan kembali (%) | 101.87 | | |

Pengukuran akurasi dilakukan dengan menambahkan standar dengan konsentrasi tertentu pada isolat andrografolid dengan konsentrasi tertentu juga. Berikut dibandingkan hasilnya dengan penjumlahan dari masing-masing standar dan isolat andrografolid. Hasil penentuan perolehan kembali dapat dilihat pada tabel 3.

Hasil recovery yang diperoleh adalah 101,09 - 103,17 %. Hasil ini menunjukkan hasil akurasi yang baik karena masuk ke dalam jarak 95-105%.

Penetapan kadar isolat andrografolid

Berikut adalah hasil penetapan kadar isolat andrografolid.

Tabel 4. Hasil penetapan kadar isolat andrografolid

| Replikasi | AUC | Kadar (µg/ml) | Kadar (%) |
|-----------|--------|---------------|-----------|
| 1 | 502757 | 9,60 | 95,97 |
| 2 | 499484 | 9,53 | 95,27 |
| 3 | 501504 | 9,57 | 95,70 |
| 4 | 501613 | 9,57 | 95,73 |
| 5 | 503358 | 9,61 | 96,10 |
| 6 | 501337 | 9,57 | 95,67 |
| Rata-rata | | 9,57 | 95,74 |
| SD | | 0,03 | 0,29 |
| RSD | | 0,30 | 0,30 |

Dari tabel di atas terlihat bahwa kandungan andrografolid yang terdapat pada isolat adalah $95,74 \pm 0,29$ % yang dihitung terhadap standar andrografolid. Data menunjukkan bahwa isolat andrografolid mengandung jumlah andrografolid dengan tingkat kemurnian yang tinggi.

Uji kelarutan dan pemilihan minyak, surfaktan dan kosurfaktan untuk sediaan SNEDDS

Minyak, surfaktan dan kosurfaktan yang cocok pada sediaan SNEDDS harus memiliki kapasitas penglarutan yang tinggi (*high solubilizing capacity*) pada obat yang dipilih dalam upaya untuk mendapatkan loading obat yang optimum. Uji kelarutan isolat andrografolid dalam berbagai pembawa meliputi minyak, surfaktan dan

ko-surfaktan dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji kelarutan andrografolid dalam fase minyak, surfaktan dan ko-surfaktan

| No | Bahan | Fungsi | Kelarutan (mg/ml) |
|----|--------------------|--------------|-------------------|
| 1 | Myritol 318 | Minyak | 0,123 ± 0,002 |
| 2 | Capryol 90 | Minyak | 1,226 ± 0,009 |
| 3 | Asam oleat | Minyak | 0,208 ± 0,022 |
| 4 | Isopropil miristat | Minyak | 0,018 ± 0,001 |
| 5 | Labrasol | Surfaktan | 2,536 ± 0,026 |
| 6 | Labrafil M1944 | Surfaktan | 0,241 ± 0,008 |
| 7 | Chremophore RH 40 | Surfaktan | 0,383 ± 0,074 |
| 8 | Tween 20 | Surfaktan | 2,965 ± 0,014 |
| 9 | Tween 80 | Surfaktan | 2,498 ± 0,042 |
| 10 | Propilenglikol | Ko-surfaktan | 5,991 ± 0,830 |
| 11 | PEG 400 | Ko-surfaktan | 6,074 ± 0,101 |

Tabel diatas menunjukkan bahwa untuk fasa minyak kelarutan yang tertinggi pada Capryol 90 dengan nilai $1,226 \pm 0,009$, surfaktan pada tween 20 sebesar $2,965 \pm 0,014$ dan untuk ko-surfaktan PEG 400 sebesar $6,074 \pm 0,101$. Dengan demikian untuk pembuatan SNEDSS terpilih Capryol 90 untuk fasa minyak, tween 20 untuk surfaktan dan PEG 400 untuk ko-surfaktan.

KESIMPULAN

Metode KCKT dapat dikembangkan untuk menentukan kadar isolat andrografolid dari tanaman sambiloto yang memenuhi persyaratan validasi dengan kemurnian andrografolid $95,74 \pm 0,29$ % terhadap standar andrografolid. Studi awal untuk pembuatan SNEDDS dengan menentukan kelarutan isolat andrografolid dalam fase minyak, surfaktan dan ko surfaktan diperoleh kelarutan tertinggi pada fasa minyak Capryol-90 dengan konsentrasi andrografolid yang terlarut $1,226 \pm 0,009$ mg/ml, surfaktan tween 20 dengan konsentrasi andrografolid terlarut $2,965 \pm 0,014$ mg/ml dan ko surfaktan PEG 400 dengan konsentrasi andrografolid terlarut sebesar $6,074 \pm 0,101$ mg/ml.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat dan Laboratorium Farmasi Universitas Islam Indonesia atas bantuan fasilitas dan biaya penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Chellampillai, B., & Pawar, A. P. (2011). Improved bioavailability of orally administered andrographolide from pH-sensitive nanoparticles. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 35(3-4), 123-129.
- Sermkaew, N., Ketjinda, W., Boonme, P., Phadoongsombut, N., & Wiwattanapatapee, R. (2013). Liquid and solid self-microemulsifying drug delivery systems for improving the oral bioavailability of andrographolide from a crude extract of *Andrographis paniculata*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(3), 459-466.
- Nugroho, A. E., Rais, I. R., Setiawan, I., Pratiwi, P. Y., Hadibarata, T., Tegar, M., & Pramono, S. (2014). Pancreatic effect of andrographolide isolated from *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17(1), 22-31.
- Nugroho, A. E., Andrie, M., Warditiani, N. K., Siswanto, E., Pramono, S., & Lukitaningsih, E. (2012). Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees and andrographolide in high-fructose-fat-fed rats. *Indian journal of pharmacology*, 44(3), 377-381.
- Chao, W. W., & Lin, B. F. (2010). Review Isolation and identification of bioactive compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian). *growth*, 5(17).
- Kataky, A., & Handique, P. J. (2010). A brief overview on *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees., a high valued medicinal plant: Boon over synthetic drugs. *Asian J Sci Technol*, 6, 113-118.
- Elfahmi, Woerdenbag, H. J., & Kayser, O. (2014). Jamu: Indonesian traditional herbal medicine towards rational phytopharmacological use. *Journal of Herbal Medicine*, 4(2), 51-73.
- Urban, M. C. C., Mainardes, R. M., & Gremião, M. P. D. (2009). Development and validation of HPLC method for analysis of dexamethasone acetate in microemulsions. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 45(1), 87-92..
- Gao, J. (2004). Bioanalytical method validation for studies on pharmacokinetics, bioavailability and bioequivalence: Highlights of the FDA's Guidance. *Asian J Drug Metab Pharmacokinet*, 4(1), 5-13.
- Shabir, G. A. (2004). A practical approach to validation of HPLC methods under current good manufacturing practices. *Journal of validation technology*, 10, 210-218.

11. Bhope, S., Kuber, V., Nagore, D., Gaikwad, P., & Patil, M. (2012). Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous analysis of andrographolide, phyllanthin, and hypophyllanthin from herbal hepatoprotective formulation. *Acta Chromatographica*, 25(1), 159-169.
12. Ravikanth, K., Kanaujia, A., Singh, P., & Thakur, D. (2013). Validated RP-HPLC method for the quantification of andrographolide in Toxiroak premix, a polyherbal mycotoxin inhibitor. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(7), 2623-2628.
13. Rukoyah, U., & Fidrianny, I. (2015). Method development for simultaneous analysis of marker scopoletine, andrographolide, quercetin, and luteolin in antihypertension jamu formulation using RP-HPLC. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 332-336.