

PENGEMBANGAN METODE REFLUKS
UNTUK EKSTRAKSI ANDROGRAFOLID DARI HERBA SAMBILOTO
(*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees)

Laksmiani, N. P. L.¹, Susanti, N.M.P.¹, Widjaja, I. N. K.¹, Rismayanti, A. A. M. I.¹ Wirasuta IM.A.G.¹

¹ Jurusan Farmasi – Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam – Universitas Udayana

Korespondensi: Ni Putu Linda Laksmiani

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 0361-703837

Email: lindalaksmiani@gmail.com

ABSTRAK

Refluks merupakan metode ekstraksi dengan bantuan pemanasan. Faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi diantaranya jumlah pelarut dan waktu ekstraksi. Penelitian ini bertujuan mengetahui jumlah pelarut dan waktu ekstraksi andrografolid yang optimum menggunakan metode refluks.

Optimasi jumlah pelarut dalam ekstraksi andrografolid menggunakan metode refluks dengan perbandingan jumlah pelarut etanol 96% sebanyak 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 dan 1:6. Optimasi waktu ekstraksi dengan variasi waktu 3, 6, 9 dan 12 jam. Penentuan jumlah pelarut dan waktu ekstraksi optimum dilakukan dengan perhitungan kadar andrografolid menggunakan metode KLT-spektrofotodensitometri yang tervalidasi. Fase diam plat silika gel 60 GF₂₅₄ dielusi dengan campuran pelarut kloroform dan metanol (9:1) v/v kemudian dipindai menggunakan *TLC Scanner 3 (CAMAG)*.

Seluruh parameter telah memenuhi persyaratan validasi yaitu rata-rata perolehan kembali 85,68% (80-110%); rentang linieritas dengan $r = 0,9938$ ($r > 0,95$); nilai LOD 133,273 ng/ μ L; nilai LOQ 444,122 ng/ μ L; presisi <2%; spesifisitas dengan kemurnian puncak >0,99 dan nilai $R_s > 1,5$. Jumlah pelarut optimum yaitu pada perbandingan 1:3 dan waktu ekstraksi optimum yaitu 6 jam.

Kata kunci: refluks, andrografolid, jumlah pelarut, waktu ekstraksi, KLT- Spektrofotodensitometri

1. PENDAHULUAN

Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) merupakan salah satu tanaman yang saat ini penggunaannya sedang berkembang dalam pengobatan tradisional. *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees mengandung diterpen lakton yang terdiri dari andrografolid, neoandrografolid, 14-deoksiandrografolid, deoksi-11-oksoandrografolid (Chao, 2010; Niranjan, 2010; Sudarsono, 2006). Andrografolid merupakan komponen mayor dari *Andrographis paniculata* yang telah dilaporkan memiliki beragam efek farmakologi (Chao, 2010). Andrografolid dapat diambil atau dipisahkan dari tanamannya melalui proses yang disebut dengan ekstraksi (Depkes, 1986; Pratiwi, 2010). Refluks merupakan metode ekstraksi dengan bantuan pemanasan dan mampu mengekstraksi andrografolid yang merupakan senyawa tahan panas (Pratiwi,

2010; Mohan, 2013). Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi proses ekstraksi diantaranya jumlah pelarut dan waktu ekstraksi. Jumlah pelarut menjadi faktor kritis dalam ekstraksi karena pada prinsipnya volume pelarut harus mencukupi untuk melarutkan senyawa yang akan diekstraksi. Dengan demikian, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengembangan metode refluks dengan variasi jumlah pelarut dan waktu pemanasan untuk ekstraksi andrografolid dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) sehingga diperoleh kadar andrografolid yang optimal dengan jumlah pelarut dan waktu yang lebih efisien.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan

Sampel tanaman yang digunakan adalah serbuk kering herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) yang diperoleh dari Kulonprogo, Yogyakarta. Bahan kimia dan pelarut yang digunakan pada penelitian ini yaitu etanol 96% (*Brataco*), metanol p.a. (*Merck*) dan kloroform p.a. (*Merck*) sebagai fase gerak, standar andrografolid dengan kemurnian 98% (*Sigma-Aldrich*) serta fase diam yang digunakan adalah plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ (*Merck-Germany*).

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1 Determinasi tanaman sambiloto

Determinasi tanaman dilakukan dengan cara membandingkan sampel sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) yang akan digunakan dengan data pustaka acuan. Determinasi tanaman dilakukan di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Eka Karya Bali-LIPI.

2.2.2 Penetapan kadar air serbuk sambiloto

Lebih kurang 1 gram herba sambiloto ditimbang menggunakan botol timbang yang telah diketahui beratnya. Serbuk yang telah ditimbang kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit. Kemudian dinginkan dalam desikator dan ditimbang. Selanjutnya dilakukan pemanasan kembali dalam oven selama 30 menit, dinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Dilakukan pekerjaan yang sama sampai berat konstan yaitu perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (DepKes RI, 1986).

2.2.3 Ekstraksi andrografolid dengan metode maserasi

Ekstraksi andrografolid dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 1 kg serbuk sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) dimaserasi dengan 5 L etanol 96% selama 2 hari. Kemudian disaring dan ampasnya diremaserasi sebanyak dua kali dengan 2,5 L etanol 96% masing-masing selama 1 hari. Maserat dijadikan satu kemudian diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental.

2.2.4 Pemilihan jumlah pelarut dalam ekstraksi andrografolid dengan metode refluks

Ekstraksi andrografolid dilakukan dengan metode refluks menggunakan pelarut etanol 96%. Dilakukan ekstraksi menggunakan perbandingan serbuk herba sambiloto dengan jumlah pelarut sebanyak 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 dan 1:6 pada suhu 70°C selama 3 jam. Hasil ekstraksi disaring dengan kertas saring kemudian ditera dengan etanol 96% hingga diperoleh volume sesuai dengan masing-masing jumlah pelarut. Diambil sebanyak 5 mL dan disimpan dalam vial untuk dianalisis.

2.2.5 Pemilihan waktu ekstraksi andrografolid dengan metode refluks

Ekstraksi andrografolid dilakukan dengan metode refluks menggunakan pelarut etanol 96%. Dilakukan ekstraksi dengan variasi waktu selama 3, 6, 9 dan 12 jam pada suhu 70°C. Hasil ekstraksi disaring dengan kertas saring kemudian ditera dengan etanol 96% hingga diperoleh volume sesuai dengan jumlah pelarut yang digunakan. Diambil sebanyak 5 mL dan disimpan dalam vial untuk dianalisis.

2.2.6 Validasi metode penetapan kadar andrografolid dengan KLT-Spektrofotodensitometri

a. Rentang dan Linieritas Dibuat rentang larutan konsentrasi 50 ng, 100 ng, 200 ng, 400 ng, 800 ng dan 1000 ng. Ditotolkan pada plat KLT silika gel 60 F₂₅₄. Dielusi dengan fase gerak kloroform:metanol (9:1). Di scan pada panjang gelombang maksimum andrografolid pada 230 nm. Dibuat kurva kalibrasi hubungan antara AUC dengan Rf. Dibuat persamaan regresi linier dari larutan seri konsentrasi andrografolid $y = bx + a$.

b. Akurasi Dibuat larutan sampel yang ditambahkan dengan standar andrografolid dengan konsentrasi 500 ng kemudian ditotolkan diatas plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ dengan volume 10 µL. Dielusi dengan fase gerak kloroform:metanol (9:1). Di scan pada panjang gelombang maksimum andrografolid pada 230 nm. Dilakukan penetapan kadar andrografolid. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan dapat ditemukan.

c. LOD dan LOQ Dimasukkan nilai AUC ke dalam persamaan regresi linier, $y=bx+a$. Ditentukan nilai LOD dan LOQ.

d. Presisi Dilakukan uji presisi dengan membuat larutan dengan konsentrasi 100 ng, 400 ng dan 800 ng. Ditotolkan pada plat KLT silika gel 60 F₂₅₄. Setelah dielusi dengan fase gerak kloroform:metanol (9:1), discan pada panjang gelombang maksimum andrografolid pada 230 nm. Dilakukan pengulangan penotolan pada masing-masing konsentrasi sebanyak 3 kali pada plat KLT silika gel 60 F₂₅₄. Dilakukan perhitungan standar deviasi (SD) dan koefisien variasi (KV) berdasarkan perolehan nilai AUC pada masing-masing konsentrasi.

e. Selektivitas/Spesifisitas Selektivitas dapat dilakukan dengan menganalisis standar andrografolid dan sampel hasil ekstraksi menggunakan parameter resolusi (Rs). Spot andrografolid pada sampel dikonfirmasi dengan membandingkan nilai R_f pada spot dan standar. Kemurnian puncak andrografolid diuji dengan membandingkan spektrum pada tingkat yang berbeda yaitu posisi *peak start* (S), *peak apex* (M) dan *peak end* (E).

2.2.7 Penetapan kadar andrografolid dengan metode KLT-Spektrofotodensitometri
Identifikasi andrografolid dilakukan dengan menggunakan KLT Spektrofotodensitometri. Digunakan plat KLT silika gel 60 F₂₅₄, kemudian plat dicuci dengan metanol dan diaktivasi pada suhu 110°C selama 30 menit. Sampel dan standar andrografolid ditotolkan

pada masing-masing plat dengan volume penotolan sebanyak 10 µL menggunakan penotol *automatic TLC sampler* 4. Plat dielusi pada chamber yang telah jenuh dengan fase gerak campuran kloroform:metanol (9:1). Plat yang telah dielusi kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 60°C selama 5 menit untuk menghilangkan pelarut pada plat. Diamati pemisahan tiap bercak pada plat secara visual, di bawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Plat *discan* dengan menggunakan densitometer CAMAG *TLC Scanner* 4 pada panjang gelombang maksimum andrografolid dan rentang panjang gelombang 200-400 nm. Dilakukan penetapan kadar dengan membuat kurva kalibrasi dari larutan seri konsentrasi andrografolid dan persamaan regresi linier $y = bx + a$, dan ditentukan nilai r, dimana y adalah nilai AUC dan x adalah kadar.

3. HASIL

3.1 Determinasi Tanaman

Tanaman herba sambiloto dan serbuk kering herba sambiloto yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Kulonprogo, Yogyakarta. Sampel yang telah terkumpul dideterminasi di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Eka Karya Bali-LIPI untuk mengetahui kebenaran spesies tanaman yang diteliti. Hasil determinasi menyatakan bahwa sampel yang digunakan benar spesies *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees.

Tabel 1. Penetapan kadar air serbuk simplisia herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees)

Persentase Kadar Air				
Percobaan			Rata-Rata	Standar Deviasi (SD)
1	2	3		
9,78 %	10,15 %	9,33 %	9,75 %	0,41%

Tabel 2. Data %recovery dengan metode standar adisi menggunakan larutan standar andrografolid

Kadar sampel (ng)	Kadar analit yang ditambahkan (ng)	Replikasi	Kadar terukur (ng)	%recovery	Rata-rata %recovery
382,531	500	1	779,800	79,45%	85,68%
		2	789,772	81,44%	
		3	863,296	96,15%	

Tabel 3. Data %KV pada standar andrografolid

Konsentrasi analit (ng)	AUC			SD	KV
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3		
100	1184,9	1193,3	1170,7	11,423	0,965%
400	3412,1	3447,5	3455,9	23,245	0,676%
800	5971,3	5974	5974,7	1,795	0,03%

Keterangan: AUC = luas area puncak; SD = standar deviasi; KV = koefisien variasi

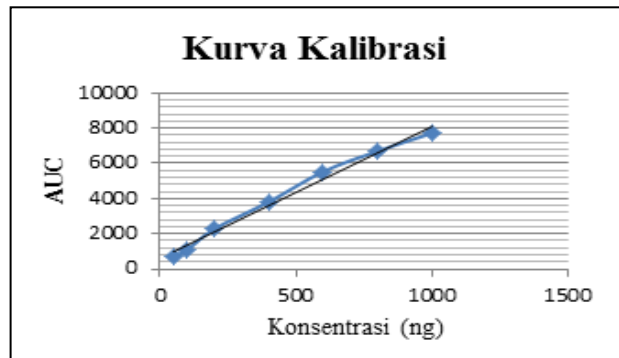
Tabel 4. Data nilai resolusi standar andrografolid

Replikasi	X	Y	Z	Rs ₁	Rs ₂
1	0	0,41	0,85	13,6	5,1
2	0	0,39	0,85	15,6	5,7
3	0,04	0,37	0,8	6,6	9,5

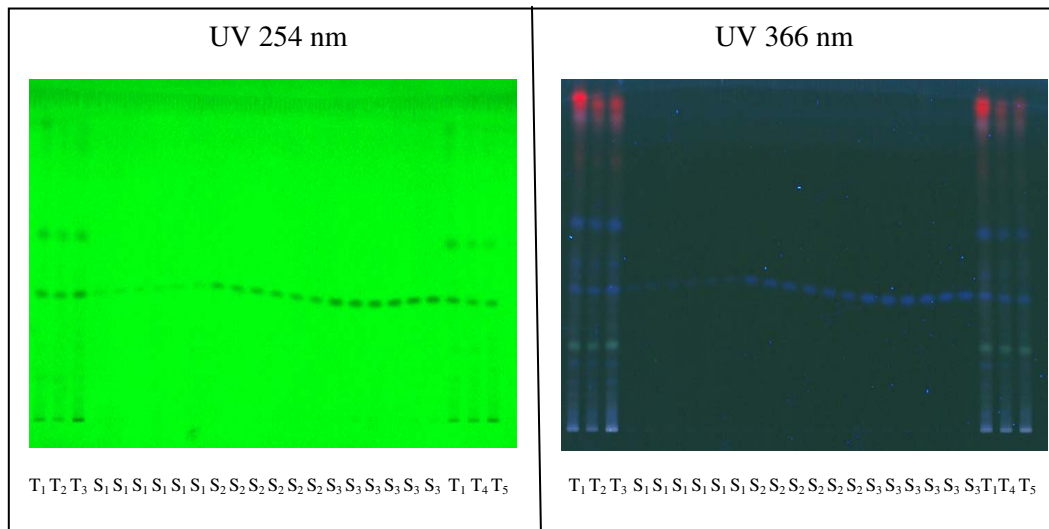
Tabel 5. Data nilai resolusi sampel

Replikasi	X	Y	Z	Rs ₁	Rs ₂
1	0,01	0,4	0,6	8,6	3,6
2	0,07	0,41	0,61	6,1	2,6
3	0,01	0,41	0,52	11,4	2

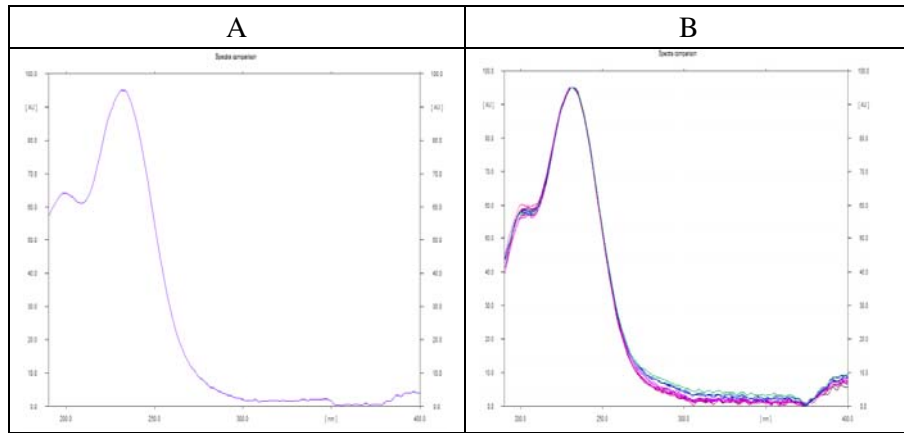
Keterangan: x: Rf puncak sebelum puncak andrografolid; y: Rf andrografolid; z: Rf puncak setelah puncak andrografolid; Rs₁: Resolusi andrografolid dengan puncak sebelumnya; Rs₂: Resolusi andrografolid dengan puncak setelahnya



Gambar 1. Kurva kalibrasi andrografolid dalam penentuan linearitas



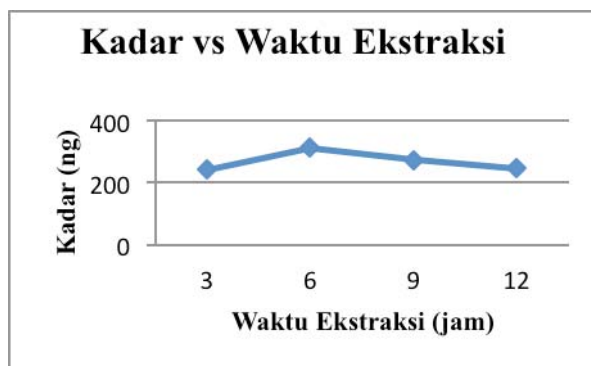
Gambar 2. Hasil pemisahan standar andrografolid dan sampel pada UV 254 dan 366 nm. T₁= sampel ekstraksi dengan maserasi; T₂, T₃, T₄, T₅ = sampel ekstraksi dengan refluks selama 3, 6, 9 dan 12 jam; S₁ = standar andrografolid 100 ng; S₂ = standar andrografolid 400 ng; S₃ = standar andrografolid 800 ng



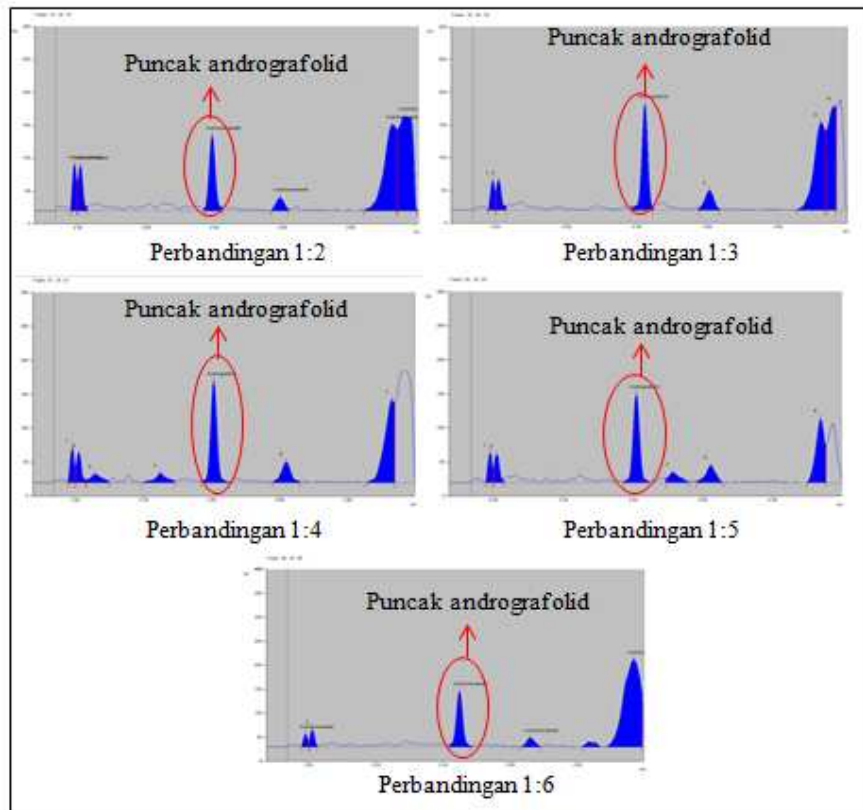
Gambar 3. Perbandingan spektrum standar andrografolid dan spektrum sampel pada panjang gelombang 230 nm. Keterangan: A = spektrum standar andrografolid; B = spektrum sampel hasil ekstraksi dengan maserasi dan refluks pada variasi jumlah pelarut dan waktu ekstraksi



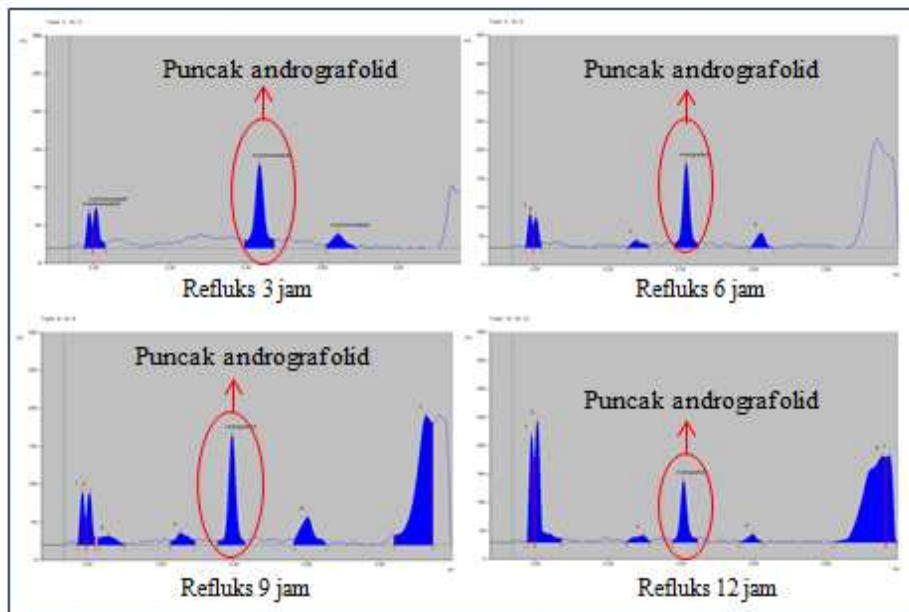
Gambar 5. Grafik hubungan antara perbandingan jumlah pelarut dan kadar andrografolid



Gambar 6. Grafik hubungan antara waktu ekstraksi dan kadar andrografolid



Gambar 7. Kromatogram ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees pada variasi jumlah pelarut



Gambar 8. Kromatogram ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees pada variasi waktu ekstraksi

4. PEMBAHASAN

4.1 Validasi Metode Penetapan Kadar Andrografolid dengan KLT-Spektrofotodensitometri

a. Rentang dan linearitas Hasil yang diperoleh menyatakan bahwa konsentrasi andrografolid tersebut memenuhi parameter akurasi, presisi, dan linearitas, sehingga diperoleh rentang pada konsentrasi 50-1000 ng. Dari kurva kalibrasi seri larutan standar perbandingan andrografolid diperoleh persamaan regresi linearnya yaitu $y = 7,5513x + 572,79$ dengan nilai koefisien regresi linear (r) = 0,9938 seperti yang terlihat pada gambar 1.

b. Akurasi Pada penelitian ini diperoleh *%recovery* pada konsentrasi 500 ng dari adisi larutan standar andrografolid yang dilakukan sebanyak 3 kali replikasi dengan rata-rata perolehan kembali sebesar 85,68%, nilai tersebut menunjukkan *%recovery* telah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan (tabel 2).

c. LOD & LOQ Hasil perhitungan menunjukkan bahwa nilai LOD adalah 133,273 ng/ μ L dan LOQ adalah 444,122 ng/ μ L.

d. Presisi Dalam penelitian ini *%KV* pada konsentrasi standar andrografolid yang ditentukan pada 3 replikasi menunjukkan bahwa seluruh konsentrasi memenuhi kriteria penerimaan seperti terlihat pada tabel 3.

e. Spesifisitas/Selektivitas Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa nilai resolusi yang diperoleh >1,5 (tabel 4 dan 5). Hal ini menunjukkan bahwa metode dapat memisahkan senyawa dengan matriks lainnya dalam suatu larutan sehingga memenuhi parameter selektivitas. Spesifisitas dilakukan dengan membandingkan spektra pada posisi awal (s), tengah (m) dan akhir puncak (e) menunjukkan korelasi > 0,99, hal ini dapat dikatakan bahwa noda/puncak kromatogram murni dan memenuhi parameter spesifisitas.

4.2 Penetapan Kadar Andrografolid dengan Metode KLT-Spektrofotodensitometri

Gambar 2 menunjukkan hasil pemisahan andrografolid pada plat KLT yang diamati pada UV 254 dan 366 nm dengan nilai R_f sampel 0,37-0,39 dan R_f pada standar 0,38-0,41. Nilai R_f sampel dan R_f pada standar

andrografolid ditandai dengan warna spot keabu-abuan seperti yang terlihat pada UV 366 nm. Kromatogram yang diperoleh kemudian dilakukan *scan* pada panjang gelombang 230 nm untuk dapat mengetahui kemiripan spektrum antara senyawa standar dan sampel ekstrak seperti pada gambar 3. Gambar 3 menunjukkan nilai korelasi spektrum sampel dengan standar andrografolid sebesar 0,991.

a. Jumlah pelarut optimum dalam ekstraksi andrografolid dengan metode refluks

Hasil menunjukkan bahwa semakin besar perbandingan jumlah pelarut maka kadar andrografolid yang terdapat pada bahan akan semakin meningkat, akan tetapi setelah mencapai jumlah pelarut yang optimum komponen yang terambil dari bahan mengalami penurunan (Gambar 4). Gambar 6 menunjukkan pada kromatogram adanya penambahan satu puncak mulai dari jumlah pelarut dengan perbandingan 1:4 hingga 1:6 disertai dengan nilai AUC pada puncak andrografolid yang semakin berkurang dan mengakibatkan penurunan kadar andrografolid. Hal ini dapat disebabkan oleh komponen-komponen yang terdapat dalam bahan jumlahnya terbatas dan pelarut yang digunakan memiliki batas kemampuan untuk melarutkan bahan yang ada meskipun dilakukan penambahan jumlah pelarut.

b. Waktu ekstraksi andrografolid optimum dengan metode refluks

Hasil menunjukkan kadar andrografolid yang dihasilkan berbeda dalam berbagai waktu ekstraksi. Kelarutan komponen dalam sampel secara perlahan sebanding dengan peningkatan waktu ekstraksi, akan tetapi setelah mencapai waktu optimum jumlah komponen yang terambil dari bahan akan mengalami penurunan (Gambar 5). Gambar 7 menunjukkan bahwa adanya penambahan puncak senyawa yang terbentuk ketika dilakukan peningkatan waktu ekstraksi. Pada kajian ini, diduga senyawa andrografolid mempunyai kelarutan yang lebih besar jika dibandingkan dengan kelarutan senyawa lainnya, namun dengan bertambahnya waktu, jumlah senyawa lain yang terlarut semakin

bertambah sehingga dapat memperkecil jumlah senyawa andrografolid yang mampu terekstraksi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan jumlah optimum andrografolid yang mampu terekstraksi adalah pada perbandingan serbuk herba sambiloto dan jumlah pelarut 1:3 dengan waktu ekstraksi selama 6 jam.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kepada DIKTI atas bantuan dana pada hibah bersaing serta seluruh dosen pengajar, serta staf pegawai di Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Udayana atas dukungan yang telah diberikan.

PUSTAKA

- Chao, W., dan B. Fong Lin. 2010. Review Isolation and Identification of Bioactive Compounds in *Andrographis paniculata* (*Chuanxinlian*). *Chinese Medicine*. Vol. 5: 17.
- DepKes RI. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes RI. 2010. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Mohan, M., S. Khanam, B.G. Shivananda. 2013. Optimization of Microwave Assisted Extraction of Andrographolide from *Andrographis paniculata* and its Comparison with Refluxation Extraction Method. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* Vol. 2. 342-348.
- Niranjana, A., Tewari, S.K., Lehry, A. 2010. Biological Activities of Kalmegh (*A. Paniculata* Nees) and Its Active Principles. *Indian J. of Nat. Prod. And Res.* 1(2): 125-135.
- Nurasiah, E. S. 2010. "Pengoptimuman Ekstraksi Andrografolida dari Sambiloto dengan Rancangan Fraksional Faktorial" (Skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Pratiwi, E. 2010. "Perbandingan Metode Maserasi, Remaserasi, Perkolasi dan

Reperkolasi dalam Ekstraksi Senyawa Aktif *Andrographolide* dari Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.F.) Nees)" (Skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Sudarsono, Puidjoarinto, A. Gunawan, D. Wahyuono, S. Donatus, I.A. Drajad, M. Wibowo, S. Ngatidjan. 2006. *Tumbuhan Obat 1*. Pusat Penelitian Obat Tradisional, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Hal 25-28.