



UJI KEMURNIAN ISOLAT ANDROGRAFOLID DENGAN HPLC FASE TERBALIK

Wirasuta, I.M.A.G.¹⁾, Astuti, N.M.W.¹⁾, Dharmapradnyawati, N.N.P.¹⁾, Wiputri, N.M.C.A.¹⁾
Warditiani N.K.¹⁾, Indriani, N. P. W.¹⁾, Widjaja, I.N.K.¹⁾,

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

Korespondensi:

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana
Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp./Fax. 703837
Email: gelgel.wirasuta@unud.ac.id

Abstrak

Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) telah dimanfaatkan secara tradisional sebagai obat. Andrografolid yang diisolasi dari herba sambiloto memiliki beberapa aktivitas farmakologi. Standarisasi isolat andrografolid penting dilakukan untuk kontrol kualitas. Profil sidik jari sebagai standar utama dari bahan baku obat herbal atau produk herbal menunjukkan kandungan kimia yang tuah dari bahan baku obat herbal maupun produk herbal. Dengan demikian, uji kemurnian isolat andrografolid perlu dilakukan bertujuan untuk mengetahui profil sidik jari isolat andrografolid sehingga dapat dijadikan kontrol kualitas terhadap isolat andrografolid. Metode *HPLC* dengan kolom Luna 5u C₁₈ (150 x 4,6 mm i.d, 5µm) dan detektor diode array (*DAD*) dimanfaatkan memperoleh profil sidik jari sebagai identitas isolat andrografolid.

Pemisahan isolat andrografolid dengan sistem *HPLC* fase gerak asetonitril 28% dalam air dan fase gerak campuran asetonitril 15% dan metanol-air (60:40) 85% memberikan masing-masing enam puncak kromatogram. Berdasarkan parameter kromatogram, uji kemurnian isolat andrografolid untuk profil sidik jari memberikan hasil yang terbaik pada panjang gelombang 230 nm dengan sistem kromatografi menggunakan fase gerak asetonitril 28% dalam air. Sistem ini sangat baik digunakan untuk uji deteksi sidik jari kandungan andrografolid dalam isolat.

Kata Kunci: *Isolat Andrografolid, Standarisasi, Profil Sidik Jari, HPLC.*

1. PENDAHULUAN

Kristalisasi andrografolid dari ekstrak metanol panas dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat. Uji kemurnian kristal yang diperoleh dengan menggunakan sistem Farmakope Indonesia diperoleh satu noda dengan in-situ UV spektra dan Rf sesuai dengan standar pembanding [Warditiani, 2014]. Metode ekstraksi berpengaruh pada konstituen senyawa penyusunnya dan kandungan andrografolid [Laksmiani, 2015]. Uji kemurnian sebaiknya dilakukan dengan lebih dari satu metode.

HPLC telah digunakan untuk mengidentifikasi turunan andrografolid hasil isolasi daun sambiloto. Pemisahan menggunakan kolom *reverse phase* dengan elusi secara isokratik dengan fase gerak terdiri dari 28% asetonitril dalam air dengan laju alir 1,2 mL/menit, diperoleh turunan andrografolid 14-deoksi-11,12-didehidroandrografolid,

neoandrografolid, dan 14-deoksiandrografolid [Pholphana *et al.*, 2013]. Pemisahan senyawa turunan andrografolid tersebut dari penelitian Kumar *et al.* (2014) menggunakan elusi secara isokratik pada kolom RP-C₁₈ dengan campuran fase gerak asetonitril (15% pelarut A) dan metanol – air, 60 : 40 (85% pelarut B). Profil kromatogram *HPLC* dapat digunakan sebagai sidik jari kromatografi isolat andrografolid, yang mana sidikjari ini dapat digunakan dalam kontrol kualitas hasil kristalisasi. Pada penelitian ini dilaporkan identifikasi kemurnian isolat hasil kristalisasi andrografolid dengan metode yang dikembangkan oleh [Warditiani, 2014] menggunakan metode *HPLC* fase balik dengan kolom RP-C₁₈.

2. BAHAN DAN METODE**2.1 Bahan**

Isolat andrografolid dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) yang diperoleh di Laboratorium Biologi Farmasi, Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika

dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana. Pelarut yang digunakan dalam *HPLC* yakni: metanol, asetonitril, dan *Water for Injection (WFI)*. Alat yang digunakan yakni seperangkat instrumen *HPLC* dengan menggunakan kolom Luna 5u C₁₈ (150 x 4,6 mm i.d, 5µm) dan detektor *diode array (DAD)*.

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1 KLT Preparatif Isolat Andrografolid

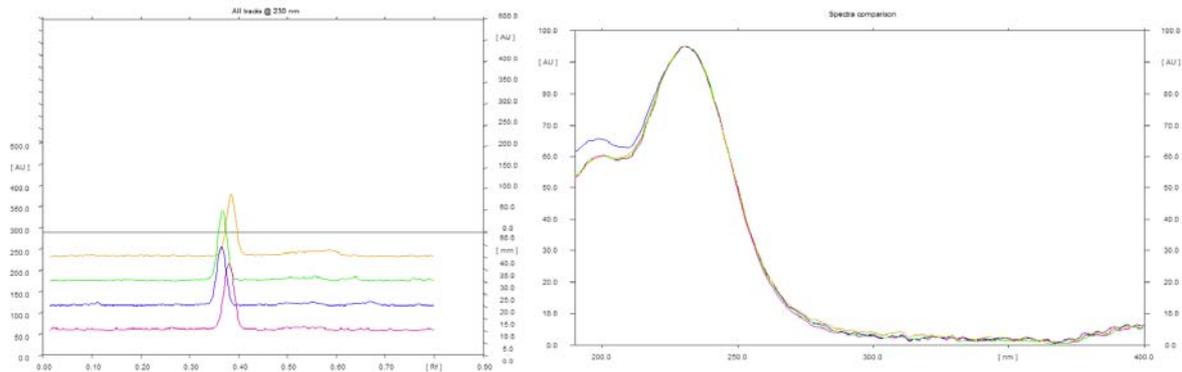
Plat kaca KLT Si G₆₀F₂₅₄ berukuran 5 x 10 cm yang telah dicuci dan diaktivasi ditotolkan isolat dengan konsentrasi 25 µg/mL, berbentuk pita sebanyak 70µL. Plat dielusi dengan campuran kloroform dan air dengan perbandingan 9 : 1 (v/v) dan dikeringkan pada oven 60 °C selama 5 menit. Plat kemudian dipindai dengan panjang gelombang 230 nm

pada empat bagian, puncak andrografolid dibaca spektrumnya pada rentang 200-600 nm.

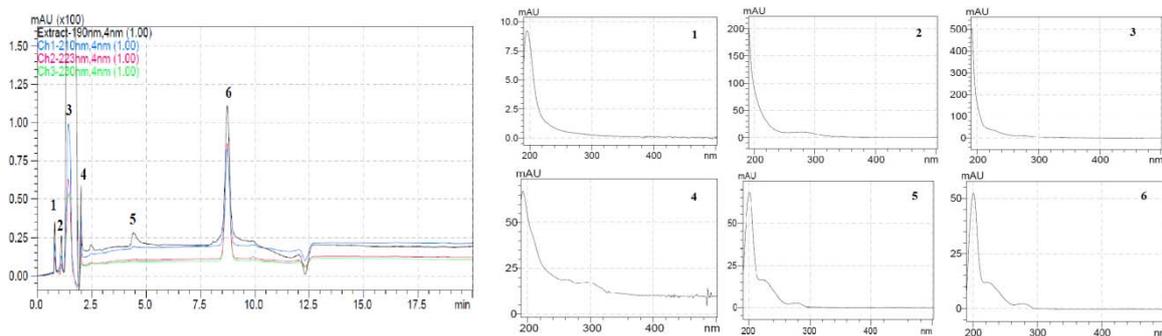
2.2.2 Analisis Komponen dalam Isolat Andrografolid dari Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees)

Analisis andrografolid dan derivat dalam sampel menggunakan dua sistem fase gerak diantaranya (1) asetonitril 28% dalam air; dan (2) asetonitril 15% dan metanol-air (60:40) 85% v/v, dengan laju alir 1,2 mL/menit. Temperatur kolom diatur pada suhu 25°C dan deteksi menggunakan detektor *diode array* pada panjang gelombang deteksi terpilih. Diulang injeksi sebanyak 3 kali. Dicatat spektrum dan dibandingkan waktu retensi (t_R) dengan pustaka acuan.

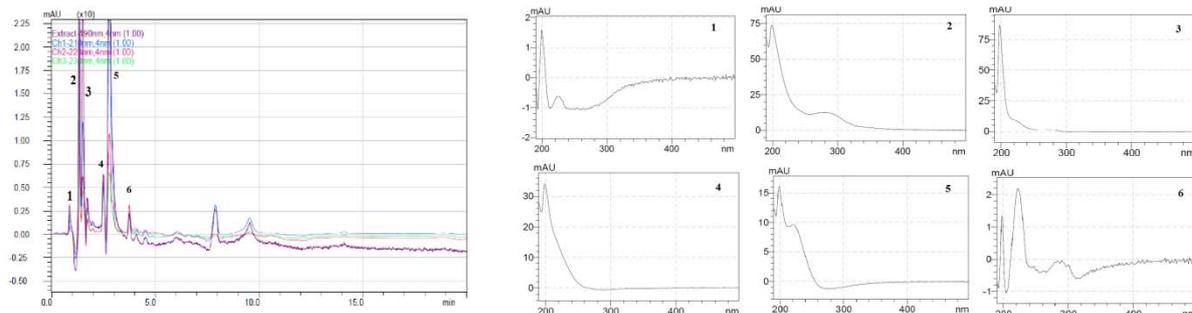
3. HASIL



Gambar 1. Densitogram KLT Preparatif dan in-situ Spektrum Andrografolid. Densitogram menggambarkan satu puncak dengan Rf 0,38.



Gambar 2. Kromatogram Pemisahan Isolat dan Standar dengan Fase Gerak Asetonitril 28% dalam Air pada Deteksi pada Panjang Gelombang 210, 223, dan 230 nm serta Spektrum masing-masing Puncak



Gambar 3. Kromatogram pemisahan isolat dan standar dengan fase gerak campuran asetonitril 15% dan metanol-air (60:40) 85% pada deteksi pada panjang gelombang 210, 223, dan 230 nm serta spektrum masing-masing puncak

Tabel 1 Parameter kromatografi metode pemisahan dengan fase gerak asetonitril 28% dalam air

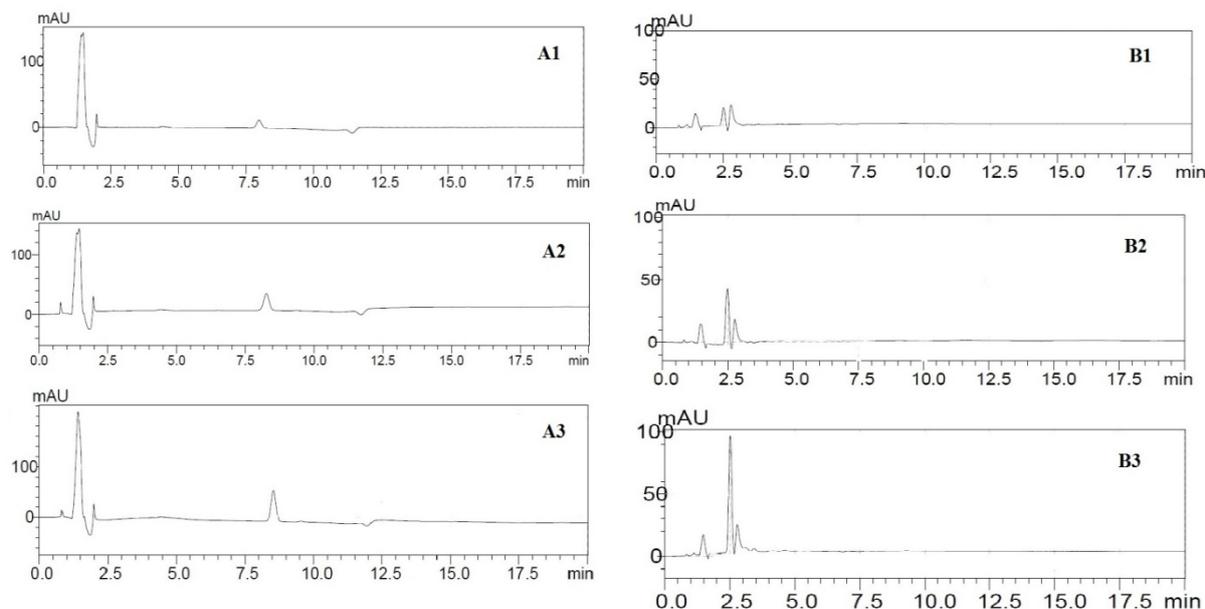
No	Panjang gelombang deteksi (nm)	Rt (menit)	Tailing factor	A			
				dengan puncak sebelumnya	dengan puncak setelahnya	dengan puncak sebelumnya	dengan puncak setelahnya
1	210	0.835	2.09	-	2.99	-	1.92
2		1.248	1.02	2.99	1.41	1.92	0.8
3		1.504	1.43	1.41	1.56	0.8	1.5
4		1.993	1.27	1.56	8.71	1.5	10.38
5		12.53	3.25	8.71	1.23	10.38	2.33
6		15.313	0.64	1.23	-	2.33	-
1	223	0.832	1.6	-	5.92	-	2.74
2		1.250	0.98	5.92	1.51	2.74	1.03
3		1.505	0.94	1.51	1.64	1.03	2.09
4		1.992	0.97	1.64	9.47	2.09	24.82
5		12.539	1.27	9.47	1.24	24.82	5.56
6		15.302	0.95	1.24	-	5.56	-
1	230	0.831	1.25	-	1.51	-	1.29
2		1.251	0.67	1.51	1.2	1.29	0.75
3		1.506	0.94	1.2	1.32	0.75	1.95
4		1.992	1.15	1.32	6.29	1.95	40.18
5		12.539	1.65	6.29	1.23	40.18	5.12
6		15.299	0.69	1.23	-	5.12	-

Tabel 2 Parameter kromatografi metode pemisahan dengan fase gerak asetonitril 15% dan metanol-air (60:40) 85% v/v

No.	Panjang gelombang deteksi (nm)	Rt (menit)	Tailing factor	A		Resolusi	
				dengan puncak sebelumnya	dengan puncak setelahnya	dengan puncak sebelumnya	dengan puncak setelahnya
1	210	0.826	1.57	-	11.41	-	1.57
2		1.305	0.74	11.41	1.34	1.57	0.66
3		1.483	1.51	1.34	1.35	0.66	1.31
4		1.732	1.05	1.35	1.14	1.31	0.86
5		2.901	0.95	1.14	1.12	0.86	1.02
6		3.16	1	1.12	1.08	1.02	0.93
1	223	0.815	1.18	-	1.59	-	2.59
2		1.296	0.98	1.59	1.14	2.59	0.76
3		1.477	1.80	1.14	1.17	0.76	0.80
4		2.9	1.03	1.20	1.15	3.4	1.43
5		3.326	0.94	1.15	1.49	1.43	4.49
6		4.573	1.04	1.49	-	4.49	-
1	230	0.813	1.48	-	1.60	-	2.58
2		1.297	0.88	1.60	1.14	2.58	0.73
3		1.478	1.67	1.14	1.96	0.73	5.60
4		2.9	0.99	1.96	1.15	5.60	1.23
5		3.324	0.82	1.15	1.49	1.23	3.53
6		4.573	1.16	1.49	-	3.53	-

Tabel 3. Persentase AUC Puncak Kromatogram Isolat Andrografolid pada Panjang Gelombang 230 nm

Fase Gerak	Rt	%AUC
Asetonitril 28% dalam air	0,835	1,561
	1,248	0,995
	1,504	19,846
	1,993	15,539
	12,530	6,577
	15,313	55,480
Asetonitril 15% dan metanol-air (60:40) 85%	0,821	4,039
	1,294	32,894
	1,477	17,902
	1,730	4,317
	2,898	22,662
	3,305	18,183



Gambar 4. Profil kromatogram isolat andrografolid pada variasi konsentrasi injeksi (keterangan: A = sistem fase gerak asetonitril 28% dalam air, diantaranya A1 = konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$, A2 = konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$, A3 = konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$; dan B = sistem fase gerak asetonitril 15% dan metanol-air (60:40) 85% v/v diantaranya B1 = konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$, B2 = konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$, B3 = konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$)

4. PEMBAHASAN

Pengaruh panjang gelombang (λ) deteksi terhadap kromatogram isolat andrografolid yang mana pada panjang gelombang 190 nm memberikan puncak dengan AUC tertinggi. Hal ini dapat dijelaskan karena ke-6 senyawa memberikan absorptivitas molar yang tinggi pada λ tersebut. Hal yang berbeda didapatkan pada kromatogram dengan λ 230 nm, serapan optimum hanya diberikan oleh senyawa dengan inti andrografolid. Deteksi pada λ 230 nm pada fase gerakasetonitril 28% dalam air, diperoleh 6 puncak, sedangkan pada fase gerak campuran asetonitril 15% dan metanol-air (60:40) 85% diperoleh 6 puncak dengan % AUC 0,995%-55,480%.

Sistem uji kemurnian diharapkan dapat mendeteksi semua komponen senyawa yang ada dalam isolat andrografolid. Pada kedua sistem, deteksi pada λ 210 atau 190 nm memberikan puncak yang lebih detail untuk ke-6 senyawa dalam isolat andrografolid. Permasalahan deteksi pada λ tersebut umumnya adalah pengotor yang bukan dari isolat akan ikut terdeteksi. Sehingga detektor DAD belum dapat membedakan antara pengotor isolat atau pengotor bukan dari isolat. Pengotor yang bukan berasal dari isolat dapat dibedakan jika menggunakan detektot MS.

Senyawa andrografolid memberikan puncak serapan pada 230 nm. Turunan

andrografolid yang telah dilaporkan [Pholphana *et al.*, 2013] memiliki inti kromofor yang sama dengan andrografolid. Puncak 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 memberikan puncak spektrum pada λ 230 nm. Berdasarkan kedekatan gugus kromofor dan bentuk spektrum dari puncak-puncak tersebut dapat diduga bahwa puncak-puncak andrografolid tersebut adalah turunan andrografolid. Deteksi kromatogram pada λ 230 nm mampu menunjukkan turunan andrografolid yang terkandung dalam isolat. Fase gerak asetonitril 28% dalam air memberikan puncak andrografolid yang simetris pada deteksi semua λ . Hal yang sama juga diberikan oleh puncak-puncak turunan andrografolid lainnya. Sistem ini sangat baik digunakan untuk uji deteksi sidik jari kandungan andrografolid dalam isolat.

5. KESIMPULAN

Uji kemurnian untuk profil sidik jari isolat andrografolid terbaik dilakukan pada panjang gelombang 230 nm dan sistem kromatografi dengan fase gerak asetonitril 28% dalam air.

DAFTAR PUSTAKA

- Laksmiani, N. P. L., Susanti, N.M.P., Widjaja, I. N. K., Rismayanti, A. A. M. I., Wirasuta IM.A.G, 2015, Pengembangan metode refluks untuk ekstraksi andrografolid dari herba

- sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees), *Jurnal Farmasi Udayana*, Vol 4 (2):82-90.
- Pholphana, N., N. Rangkadilok, J. Saehun, S. Ritruetchai, and J. Satayavivad. 2013. Changes in The Contents of Four Active Diterpenoids at Different Growth Stages in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees (Chuanxinlian). *Chinese Medicine*. Vol. 8: 1-12.
- Warditiani, N.K., Widjaja, I.N.K., Noviyanti, N. W. R., 2014, Isolasi Andrografolid dari *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Ness menggunakan metode purifikasi dan kristalisasi, *Jurnal Farmasi Udayana*. Vol 3 (1): 31-34.