



Pengembangan Metode Analisis Andrografolid pada Obat Tradisional Menggunakan Metode HPLC-PDA

(Development of Andrographolide Analysis Method in Herbal Drug using HPLC-PDA)

Evieta Rohana^{1*}, Fadia Nur Azizah¹, Indah Saraswati²

¹ Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

² Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

*Corresponding author : evietarohana@lecturer.undip.ac.id

Abstract. *Andrographolide is a diterpenoid compound that is often found in sambiloto. This plant is widely used as the main ingredient in traditional medicine preparations in Indonesia, so it is necessary to analyze the levels of the compounds contained in it, especially andrographolide. Analysis of andrographolide using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) has not yet been widely carried out and needs further development. The use of HPLC with a Photodiode Array (PDA) detector is able to produce sensitive and accurate analysis for analyzing andrographolide levels in herbal medicine preparations. The optimum conditions obtained by analysis for andrographolide using the HPLC PDA detector were the isocratic mobile phase of air methanol (55:45) with a flow rate of 1 ml/minute, wavelength of 226 nm and injection volume of 20 µL. Under these conditions the peak of andrographolide appeared at the 5th minute. The validation results of the analytical method showed an intraday precision value of %RSD of 1.6 and interday 0.02, a recovery value of 95.03%; LOD and LOQ 5.95 ppm and 18.04 ppm*

Keywords. *Andrographolide, HPLC, Herbal medicine, Method Validation*

Abstrak. Andrografolid merupakan senyawa golongan diterpenoid yang banyak ditemukan pada tanaman sambiloto. Tanaman ini banyak digunakan sebagai bahan utama sediaan obat tradisional di Indonesia, sehingga perlu dilakukan analisis kadar senyawa yang terkandung di dalamnya, terutama andrografolid. Analisis andrografolid dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) masih belum banyak dilakukan dan perlu pengembangan lebih lanjut. Penggunaan HPLC dengan detektor Photodiode Array (PDA) mampu menghasilkan analisis yang sensitive dan akurat untuk menganalisis kadar andrografolid dalam sediaan obat herbal. Kondisi optimum yang didapatkan untuk analisis andrografolid menggunakan KCKT detector PDA adalah fase gerak isokratik metanol air (55:45) dengan laju alir 1 ml/menit, panjang gelombang 226 nm dan volume injeksi 20 µL. Pada kondisi tersebut puncak andrografolid muncul pada menit ke 5. Hasil validasi metode analisis tersebut menunjukkan nilai presisi intraday %RSD 1,6 dan interday 0,02, nilai rekoverti 95,03%; LOD dan LOQ 5,95 ppm dan 18,04 ppm.

Kata Kunci. Andrografolid; KCKT; Obat Herbal; Validasi Metode.

1. Pendahuluan

Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) merupakan salah satu tanaman empiris Indonesia dengan berbagai manfaat. Andrografolid tergolong diterpenoid utama dalam tanaman sambiloto.[1] Deoksiandrografolid, neo andrografolid, 14-deoksi-11,12-didehidro andrografolid dan isoandrografolid merupakan diterpenoid lain yang terkandung dalam tanaman tersebut.[2]

Senyawa andrografolid dan turunannya memiliki beberapa khasiat yang berpotensi teruji, antara lain terhadap sistem imun[3], antioksidan [4], antiinflamasi [5] dan antidiabetes [6]. Obat tradisional dengan sambiloto tunggal atau yang dikombinasikan dengan tanaman lain banyak beredar di pasar Indonesia. Obat tradisional sebagai salah satu terapi pengobatan memiliki efek samping yang dapat ditetrapkan[7].

Pengembangan obat tradisional dalam hal ini jamu, OHT dan fitofarmaka telah banyak dilakukan. Dalam proses pengembangan obat tradisional, tanaman kandidat obat harus memenuhi aspek standarisasi dan persyaratan mutu [8]. Kadar senyawa aktif dalam tanaman obat merupakan salah satu parameter standar mutu yang harus diperhatikan. Analisis dengan metode yang tepat dan tervalidasi merupakan hal yang perlu dilakukan. Metode analisis yang dikembangkan harus memenuhi parameter validasi metode analisis menurut United

States Pharmacopeia (USP) yang meliputi spesifisitas, akurasi, presisi, linearitas, LOD dan LOQ.[9] Beberapa pengembangan metode analisis andrografolid dalam ekstrak telah dilakukan antara lain dengan metode spektrofotometri, kemiluminesen, elektroanalisis, dan KCKT.[10]

Metode KCKT adalah suatu teknik kromatografi cair dengan tujuan untuk pemisahan, identifikasi, dan kuantifikasi senyawa tertentu baik dalam bentuk tunggal ataupun campuran.[11]. Resolusi tinggi, kecepatan analisis tinggi, sensitivitas, dan reproduksifitas merupakan keuntungan dari KCKT[12]. Oleh karena itu metode KCKT merupakan salah satu pilihan yang tepat untuk menganalisis andrografolid dalam sediaan obat herbal, sehingga perlu dikembangkan suatu metode analisis yang valid dan dapat diaplikasikan dengan mudah.

2. Metodologi

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain instrument KCKT dengan detector PDA 2990 (Waters Alliance), kolom C18 4,6 x 150 mm (Sunfire), ultrasonikator (Branson), timbangan analitik, mikropipet, *syringe filter*, dan alat gelas. Bahan yang digunakan adalah baku standar andrografolid, placebo obat tradisional, methanol, dan aquabidest

2.2 Alur Penelitian

Sebelum Penelitian ini diawali dengan proses preparasi, optimasi kondisi KCKT, dan validasi metode analisis.

2.2.1. Preparasi

2.2.1.1. Pembuatan fase gerak

Sebanyak 1000 mL aquabidest dan 1000 mL metanol HPLC grade diukur dengan labu ukur 1000 mL. dilakukan penghilangan gelembung udara dengan proses ultrasonikasi

2.2.1.2. Pembuatan fase gerak

Larutan baku andrografolid dibuat dengan konsentrasi 250 ppm. Dari larutan baku tersebut dipipet 4 ml dan diencerkan dengan methanol pada labu takar 10 ml (100 ppm). Larutan andrografolid yang didapatkan kemudian disonikasi untuk menghilangkan gelembung udara.

2.2.2. Optimasi Kondisi KCKT

Pada tahapan ini dilakukan penentuan panjang gelombang optimum untuk andrografolid. Setelah didapatkan panjang gelombang optimum dilakukan optimasi komposisi fase gerak, pelarut, volume injek dan dan laju alir

2.2.3. Validasi Metode Analisis

2.2.3.1. Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menginjeksikan 20 μ L larutan uji ke dalam system KCKT yang telah dioptimasi. Kemudian diamati faktor resolusi (R_s) yang menunjukkan pemisahan dari puncak yang berdekatan (R_s), tailing factor yang menunjukkan kesimetrisan dari

Rohana, *et.al.*

puncak yang diamati, dan jumlah lempeng teoritis (N) yang menunjukkan efisiensi kolom [13].

2.2.3.2. Spesifitas

Spesifisitas dilakukan dengan menginjeksikan fase gerak, placebo, baku andrografolid, dan pelarut metanol. Parameter spesifisitas diukur dengan membandingkan hasil kromatogram antara tiap larutan.[14]

2.2.3.3. Akurasi

Spesifisitas parameter akurasi dilakukan dengan metode spike placebo dengan tiga konsentrasi andrografolid, yaitu 80, 100, dan 120 ppm. Setiap seri konsentrasi diuji/dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Hasil dari uji ini kemudian dihitung nilai % recovery nya.

2.2.3.4. Presisi

Presisi intraday dilakukan dengan cara menginjeksikan enam larutan uji dengan konsentrasi 100 ppm dihari yang sama. Presisi interday dilakukan dengan menginjeksikan konsentrasi yang sama pada tiga hari yang berbeda. Dihitung nilai RSD dengan syarat penerimaan dari nilai RSD (%) adalah ≤ 2

2.2.3.5. Linearitas

Parameter linearitas diperoleh dengan membuat lima seri konsentrasi sampel (80, 90, 100, 110, 120 ppm). Kemudian dihitung nilai R dengan syarat penerimaan lebih dari sama dengan 0,999.

2.2.3.6. LOD dan LOQ

LOD dan LOQ didapatkan secara perhitungan berdasarkan persamaan regresi linear.

2.3 Analisis Data

Pada Data yang diperoleh pada penelitian ini terdiri dari puncak analit pada kromatogram yang kemudian dianalisis secara kualitatif dengan membandingkan antara puncak andrografolid baku standar dengan andrografolid pada sampel. Sedangkan analisis kuantitatif dengan menghitung AUC puncak analit. Data dari analisis kuantitatif kemudian dihitung dengan statistika.

3. Hasil dan Pembahasan

Kondisi optimal system KCKT merupakan bagian pertama yang harus ditentukan. Metanol dan air dipilih sebagai kombinasi eluen pada penelitian ini. Kondisi kromatografi optimum berdasarkan hasil optimasi yaitu fase gerak isokratik metanol-air (55:45); laju alir 1 mL/menit; volume injeksi 20 µl dan panjang gelombang 226 nm. Pada kondisi tersebut, andrografolid membentuk puncak yang simetris dan memenuhi syarat pada lempeng teoritis

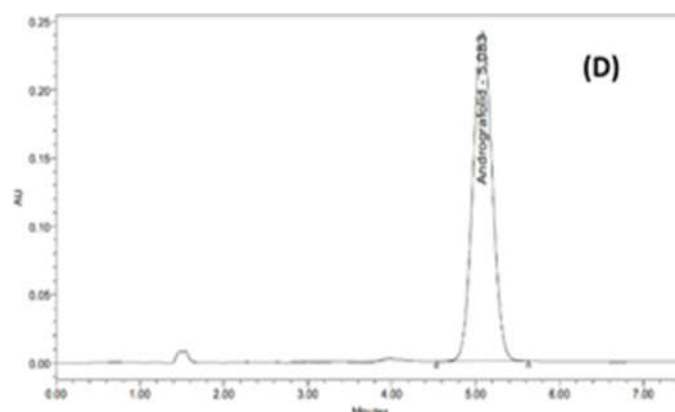
($N=2500$), tailing factor ($T_f=1$), serta resolusi ($R_s=2,25$)³. Retention time puncak andrografolid yang didapatkan yaitu pada menit ke 5.

Uji kesesuaian sistem telah dilakukan dan menunjukkan nilai % RSD ≤ 2 . Uji tersebut dilakukan untuk system yang telah dilakukan memberikan hasil puncak analit yang memenuhi persyaratan resolusi dan reprodusibilitas metode kromatografi yang sesuai untuk analisis.[14]

Validasi terhadap kondisi optimal yang dihasilkan dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa metode tersebut telah sesuai dan memastikan setiap parameter telah memenuhi syarat. Pengujian validasi yang dilakukan antara lain spesifisitas, presisi, akurasi, linearitas, LOD dan LOQ.

3.1 Spesifitas

Spesifisitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan metode dalam mengukur respon analit.[16] Tidak ditemukan kemunculan peak pada waktu retensi yang sama dengan andrografolid yang menunjukkan bahwa senyawa lain tidak memengaruhi respon analitik.[17]



Gambar 1. Kromatogram Andrografolid

3.2. Presisi

Pengujian presisi bertujuan untuk mengetahui nilai kedekatan dalam satu seri pengukuran. Nilai %RSD yang dihasilkan dari presisi intraday sebesar 1,60% dan presisi interday sebesar 0,02%. Hal sudah memenuhi syarat untuk uji presisi [18]

3.3. Linearitas

Pengujian linearitas dilakukan dengan tujuan melihat korelasi antara konsentrasi andrografolid dengan luas area pada kromatogram.[19] Hasil uji linearitas memberikan persamaan regresi linear $y = 39527x - 41630$, dengan koefisien determinasi (R^2) yang diperoleh yaitu 0,9990, hal ini menunjukkan uji linearitas memenuhi persyaratan pengujian kadar senyawa aktif ($R \geq 0,999$). Hubungan yang linear ditunjukkan dengan peningkatan kontinu yang sebanding antara luas area kromatogram dengan konsentrasi andrografolid.

3.4. LOD dan LOQ

Nilai LOD merupakan konsentrasi terendah dari suatu analit yang masih dapat memberikan respon berupa

puncak terkecil dan bukan termasuk noise. Sedangkan LOQ adalah konsentrasi terendah dari analit yang tidak hanya dapat terdeteksi namun untuk beberapa tujuan dapat terukur dengan keterulangan dan akurasi yang sesuai [20]. Pengujian LOD dan LOQ menunjukkan sensitivitas dari metode pengujian. LOD dan LOQ yang diperoleh secara berturut-turut adalah 5,95 ppm dan 18,04 ppm. Nilai LOD dan LOQ ini lebih besar daripada nilai LOD dan LOQ dari penelitian yang telah dilakukan oleh Da'i dkk, yang mendapatkan nilai LOD sebesar 0,102 ppm dan LOQ sebesar 0,339 ppm. [21]

3.5. Akurasi

Keakuratan suatu pengukuran diartikan sebagai kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang sebenarnya yang dihitung dengan nilai recovery.[22] Hasil dari pengujian akurasi andrografolid adalah recovery sebesar 95,03%. Syarat recovery berdasarkan konsentrasi analit yang ditambahkan adalah 85-110%.

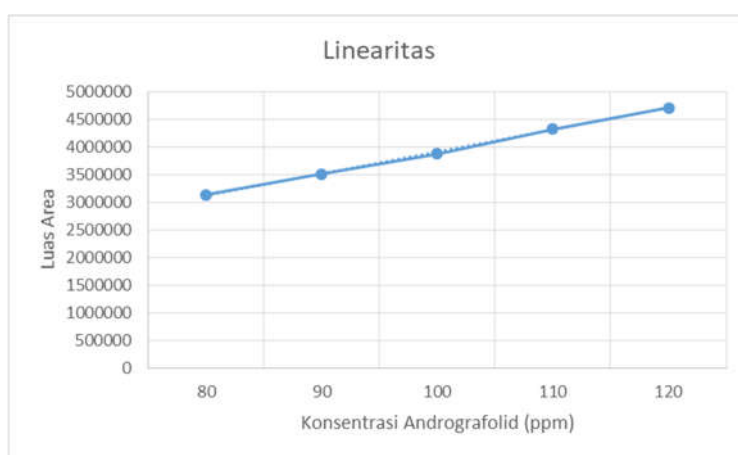
Tabel 1. Hasil Uji Presisi Intraday

Sampel	AUC				Kadar (%)
	I	II	III	Rata-rata	
1	3741214	3769456	3782399	3764356,33	101,13
2	3767886	3757452	3792879	3772739,00	101,35

3	3821146	3806449	3886446	3838013,67	103,10
4	3725117	3716095	3726152	3722454,67	100,00
5	3841156	3897880	3797265	3845433,67	103,30
6	3880497	3875276	3898852	3884875,00	104,36
Rata-rata				3804645,40	102,21
%RSD				1,60	

Tabel 2. Hasil Uji Presisi Interday

Hari ke-	AUC Sampel				Kadar (%)
	I	II	III	Rata-rata	
1	3886446	3821146	3806449	3838013,67	100,02
2	3829150	3843032	3844121	3838767,67	100,04
3	3830543	3836446	3844870	3837286,33	100,00
Rata-rata				3838022,56	100,02
%RSD				0,02	



Gambar 2. Grafik Uji Linearitas

Tabel 3. Hasil Uji Akurasi

Konsentrasi (ppm)	Rataan Luas Area	Konsentrasi terukur (ppm)	Rataan konsentrasi (ppm)	Recovery (%)	Recovery rata-rata (%)
80	2762492,33	73,51	72,38	91,89	90,47
	2695951,67	71,74		89,68	
	2701221,33	71,88		89,85	
100	3741500,00	99,56	98,47	99,56	98,47
	3729736,00	99,52		99,25	

	3629801,67	96,59		96,59	
	4353126,67	115,84		96,53	
120	4339237,00	115,47	115,37	96,23	96,14
	4313802,33	114,79		95,66	

4. Kesimpulan

Kesimpulan Metode analisis andrografolid menunjukkan hasil yang cepat, mudah, dan akurat. Dengan kondisi optimal KCKT adalah fase gerak methanol:air (55:45), laju alir 1 mL/menit, volume injeksi 20 µl dan panjang gelombang 226 nm. Waktu retensi puncak 5 menit, dengan resolusi 2,25 dan tailing factor 1,0. Metode tersebut menunjukkan hasil yang baik secara linier, akurat, presisi, selektif dan spesifik untuk analisis andrografolid. Nilai LOD dan LOQ masing-masing sebesar 5,95 ppm dan 18,04 ppm.

Daftar Pustaka

[1] Ahuja,S., Dong, M., 2005. Hanbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. Elsevier Academic Press: New York.

[2] Abu-Ghefreh,A.A.,Canatan, H., Ezeamuzie, C.I.,2009. “In vitro and In vivo Anti-inflammatory Effects of Andrographolide,” International Immunopharmacology, 9:313-318.

[3] Da’I, M., SWika, E.R.,Suhendi, A., Hairunisa, I. 2015. “Validated HPLC Method for Determination of Andrographolide in Mixed Herbal Extract”. Int.J.Pharm. Sci. Rev.Res, 35(2).

[4] Dirjen Kefarmasian dan Alat Kesehatan. 2017. Farmakope Obat Herbal Indonesia. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia: Jakarta.

[5] Dolan,J.W., 2002.” Peak Tailing and Resolution: How Does Peak Tailing

Affect Resolution?(LC Troubleshooting).” Intellisphere,LLC.

[6] Donepudi, S. Achanta,S.,2018. “Validated HPLC-UV Method for Simultaneous Estimation of Linagliptin and Empagliflozin in Human Plasma.” IJAP. 10(3)

[7] European Medicines Agency. 2005. Validation of Analytical Prosedures: Text and Methodology Q2(R1). International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

[8] FDA. 1994. Review Guidance Validation of Chromatographic Methods. Food Drug Administration 21(6)

[9] FDA. 2018. United State Pharmacopeia 41 NF 36. The United State Pharmacopeial Convention

[10] Horwitz, W., 2013. “Comparison of The Effectiveness of Solid-Phase and Ultrasound Mediated Liquid-Liquid Extractionsto Determine the the Volatile Coumpound of Wine”. Talanta 76(9)

[11] Komalasari, T., Harimurti, S., 2015. “A Review on The Anti-diabetic Activity of Andrographis paniculata (Burm.f.) Ness based In-vivo Study,” IJPHS Vol. 4 No.4.

[12] Kowalska,M. 2022.”Management of Validation of HPLC Method for Determination of Acetylsalicylic Acid Impurities in a New Pharmaceutical Product.” Scientific Reports, 12(1) <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99269-x>

[13] Klimek-Turek, A.,2020. “Comparison of the Retention and Separation Selectivity of Aromatic Hydrocarbons with Polar Groups in RP-HPLC Systems with Different Stationary Phases and Eluents.” Molecules, 25(21):5070

- <https://doi.org/10.3390/molecules25215070>
- [14] Le, T.H.H., Phung T.H., Le, D.C., 2019. "Development and Validation of an HPLC Method for Simultaneous Assay of Potassium Guaiacolsulfonate and Sodium Benzoate in Pediatric Oral Powder." *J.Anal..Methods. Chem.* <https://doi.org/10.1155/2019/6143061>
- [15] 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 J Pharmacol.* 44(3)
- [16] Patil, R., Jain, V., 2020. "Andrographolide: A Review of Analytical Methods." *JCS.* <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa091>
- [17] Priyani, R. 2020. "Review : Manfaat Tanaman Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Ness) Terhadap Sistem Imun Tubuh," *JIKK* Vol. 7, No.3.
- [18] Raut, R., Shaji, J., 2021. "HPLC Method Validation for Quantification of Tetrahydrocurcumin in Bulk Drug and Formulation." *FJPS*, 42.
- [19] Ranstam, J.2008. "Methodological Note: Accuracy, Precision, and validity. *Acta Radiologica.*49(1). <https://doi.org/10.1080/02841850701772706>
- [20] Sumayyah,S.,Salsabila,N., 2017."Obat Tradisional: Antara Khasiat dan Efek Sampingnya,"*Majalah Farmasetika*, Vo.2 No.5
- [21] Yunita, E. 2021." Mekanisme Kerja Androgafolid dari Sambiloto Sebagai Senyawa Antioksidan," *Herb-Medicine Journal* Vol.4 No.1
- [22] Zhang, H., Li, S., Si, Y., Xu, H., 2021. "Andrographolide and its Derivats: Current Achievements and Perspectives.European" *Journal of Medicinal Chemistry*, 224. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113710>