

Validasi Metode RP-HPLC untuk Penentuan Kadar Andrografolid Sebagai Senyawa Penanda pada Campuran Ekstrak

Anisyah Is Purwati*, Prasetyawan Yuniato, Agus Supriyono

Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Gedung 611, Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang, 15314

*Penulis korespondensi: anisyah.ispurwati@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v5.n3.16056>

Abstrak: Andrografolid merupakan senyawa bioaktif dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang berpotensi sebagai bahan obat. Kadar andrografolid dapat ditentukan menggunakan RP-HPLC. Penelitian ini bertujuan mengembangkan dan memvalidasi metode RP-HPLC untuk menentukan kadar andrografolid sebagai senyawa penanda untuk standarisasi formula obat herbal terstandar (OHT) dari campuran ekstrak tanaman sambiloto dan binahong (*Andrographis cordifolia*). Metode RP-HPLC dikembangkan menggunakan kolom Sunfire C18 (150 × 4,6 mm, 5µm) dengan fase gerak asetonitril dan campuran 0,1% asam trifloroasetat dan metanol (90:10) secara elusi gradien serta laju alir fase gerak 1 mL/menit. Deteksi menggunakan detektor PDA pada panjang gelombang 230 nm. Andrografolid dielusi pada waktu retensi 9,77 dengan resolusi puncak 2,14. Respon dari standar andrografolid linear pada rentang konsentrasi 0,031-0,5 mg/mL dengan $r^2=0,9999$. Akurasi dari metode ini, yaitu 94,46% dengan nilai RSD 1,73%. Presisi, limit deteksi (LOD), dan limit kuantisasi (LOQ) yang diperoleh masing-masing, yaitu 3,46%, 0,028 mg/mL, dan 0,096 mg/mL. Metode yang divalidasi ini dapat digunakan sebagai referensi untuk penentuan kadar andrografolid dalam standarisasi obat herbal terstandar dari campuran ekstrak tanaman.

Kata kunci: andrografolid, HPLC, sambiloto (*Andrographis paniculata*), validasi

Abstract: *Andrographolide is a bioactive compound from sambiloto herbs which have potential effect as a drug ingredient. Andrographolide assay could be determined using RP-HPLC. The objective of this research was to develop and validate RP-HPLC method in determining andrographolide assay as a marker compound for standardization of standardized herbal medicine formula from mixture of sambiloto extract (Andrographis paniculata) and binahong extract (Andrographis cordifolia). The RP-HPLC method was performed using Sunfire C18 (150 × 4.6 mm, 5µm) columns with mobile phase were acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid (90): methanol (10) gradient elution and flow rate 1 mL / minute. PDA detector was used for detection at a wavelength of 230 nm. Andrographolide was eluted at retention time of 9.77 with a peak resolution of 2.14. Standard response from andrographolide linear at concentration range 0.031-0.5 mg / mL with $r^2 = 0.9999$. Accuracy of this method is 94.46% with RSD value 1.73%. Precision, limit of detection (LOD), and limit of quantitation (LOQ) obtained 3.46%, 0.028 mg / mL, and 0.096 mg / mL, respectively. This validated method can be used as a reference method for determining andrographolide assay in standardized herbal medicine (OHT) formula from mixture of herbal extracts.*

Keywords: *andrographolide, HPLC, sambiloto (Andrographis paniculata), validation*

PENDAHULUAN

Meningkatnya minat masyarakat terhadap obat tradisional sebagai obat alternatif memacu banyaknya penelitian mengenai obat bahan alam yang meliputi budidaya tanaman obat, analisis kandungan kimia, toksisitas, farmakodinamik, formulasi, dan uji klinik. Dalam rangka pengembangan obat tradisional Indonesia menjadi obat herbal terstandar (OHT) dan fitofarmaka, standarisasi dan persyaratan mutu tanaman obat merupakan hal yang perlu diperhatikan (Dewoto 2007). Kadar zat aktif atau zat penanda dalam tanaman obat merupakan salah satu parameter standar mutu yang harus distandarisasi agar dapat menimbulkan khasiat dan keamanan tanaman obat sebagai OHT.

Tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata*) merupakan salah satu tanaman obat yang sudah banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat herbal. Tanaman Sambiloto mengandung zat penanda, yaitu andrografolid yang memiliki aktivitas biologi. Aktivitas andrografolid dalam tanaman sambiloto sebagai bahan obat diantaranya sebagai antikanker (Kumar *et al.* 2004), antidiabetes dan antihiperlipidemia (Nugroho *et al.* 2012), serta antimalaria (Mishra *et al.* 2009). Kadar andrografolid dalam tanaman sambiloto dapat dianalisis secara kuantitatif menggunakan metode RP-HPLC. Penggunaan metode RP-HPLC tersebut telah banyak dilakukan oleh beberapa peneliti diantaranya menggunakan sistem elusi isokratik asetonitril:0,1%

asam fosfat dengan rasio 40:60 v/v (Da'i *et al.* 2015; Vijaykumar 2007), sistem elusi isokratik metanol:air dengan rasio 60:40 v/v (Syukri *et al.* 2016), sistem elusi isokratik metanol:air dengan rasio 65:35 v/v (Sajeeb *et al.* 2015), sistem elusi gradien 1% asam format:metanol (Fidrianny *et al.* 2015).

Metode RP-HPLC yang digunakan harus tervalidasi agar memberikan hasil yang dapat dipercaya. Selain itu, menurut Shabir (2004), metode yang divalidasi perlu dilakukan uji kesesuaian sistem untuk menjamin pengukuran menggunakan kromatografi sesuai dengan analisis yang diharapkan. Oleh karena itu, pada penelitian ini metode RP-HPLC yang divalidasi dilakukan pula uji kesesuaian sistem. Penelitian ini bertujuan mengembangkan dan memvalidasi metode RP-HPLC untuk menentukan kadar andrografolid sebagai senyawa penanda untuk standarisasi formula OHT dari campuran ekstrak tanaman sambiloto dan binahong (*Androdera cordifolia*).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan, yaitu campuran ekstrak tanaman sambiloto dan daun binahong (Formula BPPT), standar Andrographolide 98% (Sigma Aldrich), asetonitril (grade HPLC, Merck), metanol (grade HPLC, Merck), dan asam trifluoroasetat (Merck).

Penyiapan sampel

Campuran ekstrak ditimbang 50 mg kemudian dilarutkan dalam 5 mL asetonitril:metanol = 9:1. Larutan dilakukan sonikasi selama 30 menit untuk meningkatkan kelarutan. Setelah itu, larutan disaring dengan membran PTFE ukuran 0,45 µm.

Penyiapan larutan induk andrografolid

Standar andrografolid sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 5 mL asetonitril:metanol = 9:1 sehingga diperoleh konsentrasi 10 mg/mL. Selanjutnya dengan menggunakan larutan induk andrografolid tersebut dibuat seri larutan standar untuk penentuan kurva kalibrasi pada jarak konsentrasi tertentu.

Kondisi Kromatografi

Pemisahan dilakukan pada kolom Sunfire C18 (150 × 4.6 mm, 5µm). Fase gerak yang digunakan, yaitu asetonitril sebagai %A dan campuran 0.1% asam trifluoroasetat:methanol = 90 : 10 sebagai %B. Fase gerak dielusi secara gradien dengan komposisi %A sebesar 10% dan %B sebesar 90% hingga menit ke 5 kemudian elusi menjadi isokratik dengan komposisi %A sebesar 30% dan %B sebesar 70% hingga waktu akhir elusi. Volume injeksi contoh 20 µL dengan laju alir fase gerak 1 mL/menit dan deteksi menggunakan detektor PDA (*Photodiode Array*) pada panjang gelombang 230 nm.

Kesesuaian sistem

Kinerja kesesuaian sistem menurut Shabir (2004) ditentukan berdasarkan parameter kromatografi yang meliputi area puncak, waktu retensi, teori pelat, dan faktor tailing dengan menginjeksikan larutan standar andrografolid 0,125 mg/mL sebanyak 6 kali.

Parameter validasi

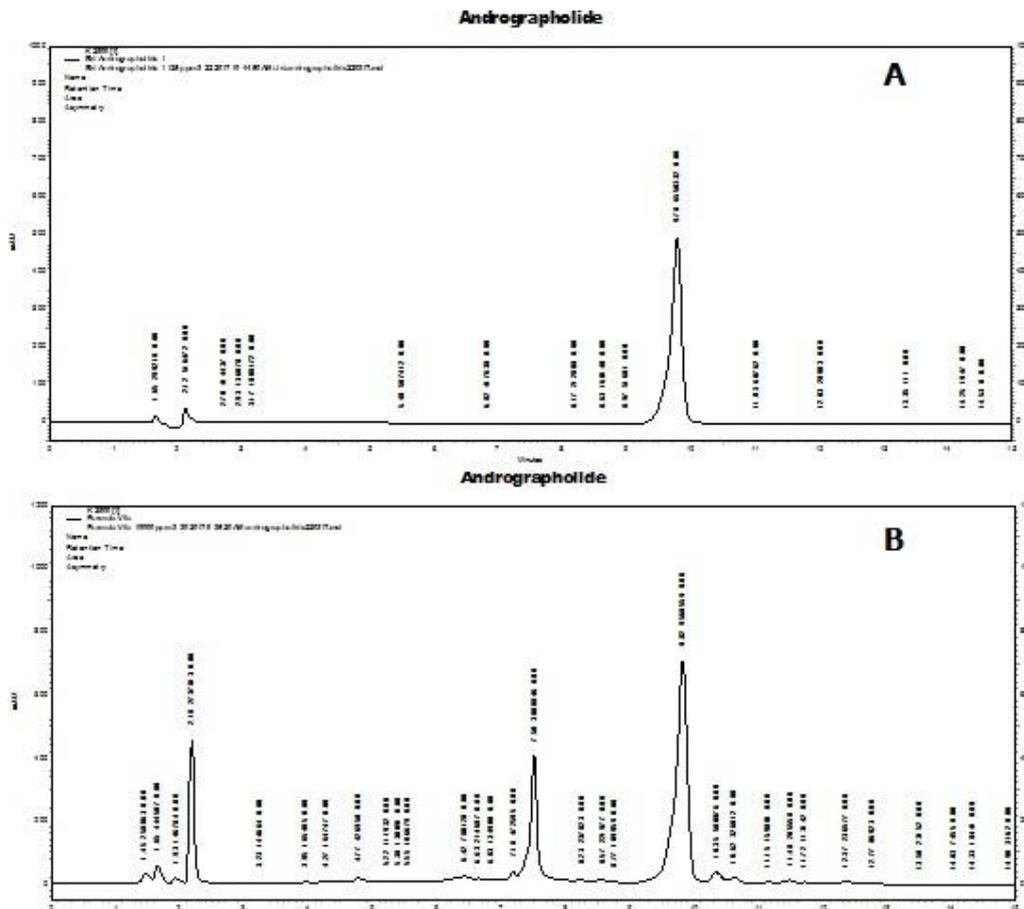
Metode validasi sesuai dengan pedoman ICH (2005) yang meliputi linearitas, presisi, akurasi, selektivitas, batas deteksi (LOD), dan batas kuantisasi (LOQ). Uji linearitas dilakukan dengan membuat kurva kalibrasi dari 5 deret konsentrasi standar andrografolid pada rentang konsentrasi 0.031-0.5 mg/mL. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan antara konsentrasi (sumbu x) dan luas area puncak (sumbu y) sebagai respon dari HPLC.

Presisi dilakukan dengan melakukan injeksi 6 kali pada vial yang sama dari contoh pada hari yang sama (keterulangan). Presisi dinyatakan dengan %RSD dari luas area puncak. Akurasi dilakukan dengan menambahkan larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya kedalam contoh (spike). Spike contoh pada pengujian dilakukan sebanyak 3 kali ulangan dengan konsentrasi 0,2695 mg/mL dan standar andrografolid yang ditambahkan 0,1250 mg/mL (rasio 1:1) sehingga konsentrasi total 0,1972 mg/mL.

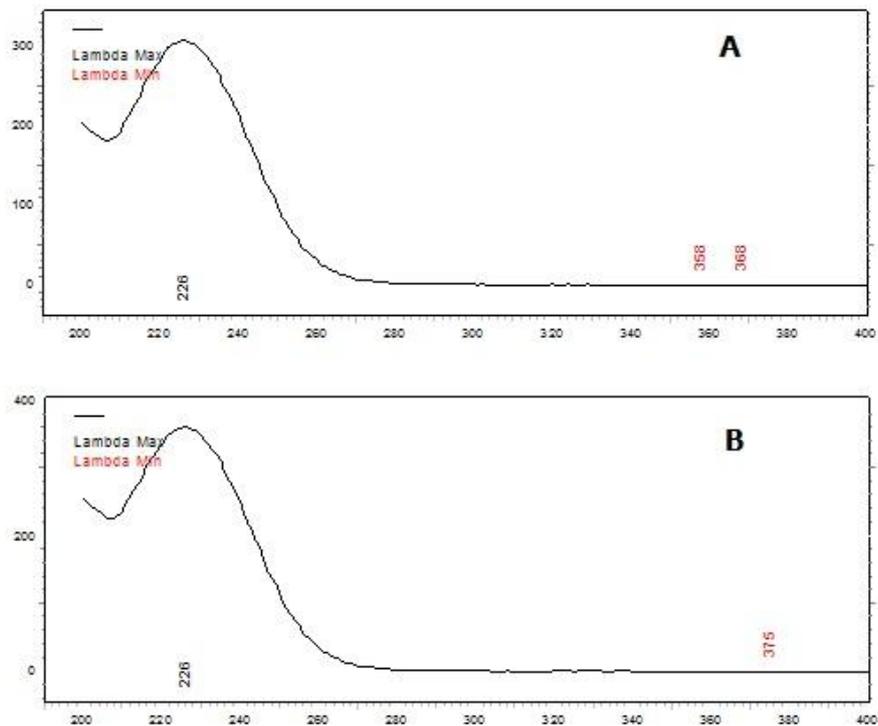
Selektivitas metode ditentukan melalui perhitungan resolusi antara dua puncak yang berdekatan (R_s) sedangkan LOD dan LOQ ditentukan berdasarkan nilai simpangan baku dari respon terhadap kemiringan (slope) kurva kalibrasi standar. Nilai LOD ialah 3 kali dari nilai simpangan baku respon terhadap kemiringan (slope) sedangkan nilai LOQ ialah 10 kali dari nilai simpangan baku respon terhadap kemiringan (slope).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam pengembangan metode RP-HPLC pemilihan fase gerak yang sesuai merupakan hal yang perlu diperhatikan. Pemilihan sistem elusi gradien pada penelitian ini disebabkan contoh yang digunakan berupa campuran ekstrak tanaman sambiloto dan binahong, senyawa dalam ekstrak binahong cenderung bersifat polar, sehingga dengan digunakannya elusi gradien pada awal waktu elusi maka akan terjadi pemisahan dengan senyawa-senyawa polar. Komposisi fase gerak HPLC yang digunakan pada penelitian ini memberikan resolusi dan bentuk puncak yang baik (Gambar 1). Nilai Resolusi (R_s) puncak andrografolid yang diperoleh, yaitu 2,14. Resolusi yang lebih dari 1,5 menunjukkan dua puncak yang terpisah dengan baik (AOAC 2002). Hal ini menunjukkan metode memiliki selektivitas yang baik. Gambar 1 juga menunjukkan standar andrografolid memiliki waktu retensi 9,77 serta contoh campuran ekstrak tanaman sambiloto dan binahong pada waktu retensi 9,82 terdapat senyawa andrografolid. Puncak andrografolid dalam



Gambar 1. Kromatogram standar andrografolid (A) campuran ekstrak sambiloto dan binahong (B)



Gambar 2. Spektrum panjang gelombang senyawa standar andrografolid (A) andrografolid pada campuran ekstrak tanaman sambiloto dan binahong (B).

contoh dipastikan melalui spektrum panjang gelombang yang diperoleh dari detektor PDA, sesuai dengan standar andrografolid (Gambar 2).

Syukri dkk. (2015) menyatakan hasil analisis yang diperoleh dari metode yang dikembangkan hanya valid jika kriteria kesesuaian sistem terpenuhi. Hasil uji beberapa parameter kesesuaian sistem yang diperoleh ditunjukkan pada Tabel 1.

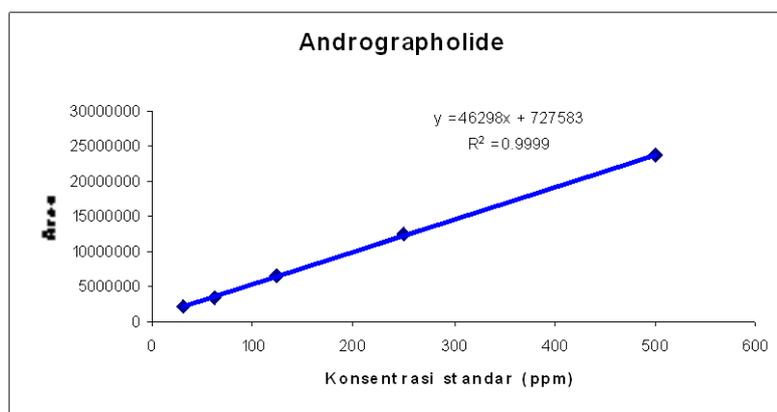
Tabel 1. Parameter kesesuaian sistem standar andrografolid (n=6)

Parameter	Hasil	%RSD
Area	6559427 ± 141245,9204	2
Waktu retensi	9,77 ± 0,0041	0,04
Faktor tailing	0,7497 ± 0,007	0,94
Pelat teoritis	18044,17 ± 168,491	0,93

Persentase RSD yang diperoleh ≤ 2 , nilai faktor tailing (T) < 2 , dan nilai pelat teoritis (N) > 5000 (Shabir 2004). Hal ini menunjukkan metode yang digunakan memiliki kesesuaian sistem yang baik. Pengujian linearitas menghasilkan kurva kalibrasi standar dengan persamaan regresi $y = 46298x +$

727583 dan koefisien korelasi 0,9999 (Gambar 3). Nilai intersep (a) dari persamaan garis dapat menunjukkan adanya pengaruh matriks dari larutan uji. Nilai intersep yang diperoleh sebesar 727583. Nilai yang semakin besar menunjukkan pengaruh gangguan matriks dari larutan semakin besar pula (IUPAC 2002). Nilai kemiringan garis (b) menunjukkan sensitivitas suatu metode. Nilai slope yang diperoleh sebesar 46298. Semakin besar nilai slope maka sensitivitasnya terhadap perubahan konsentrasi akan semakin besar. Artinya, apabila terjadi sedikit perubahan konsentrasi maka akan mampu mengubah sinyal yang dihasilkan detektor. Nilai r yang diperoleh dari persamaan garis mendekati 1. Hal ini menunjukkan metode memiliki linearitas yang baik (IUPAC 2002).

Akurasi dinyatakan dengan persen perolehan kembali. Pengukuran akurasi dilakukan dengan menambahkan standar dengan konsentrasi tertentu pada contoh dengan konsentrasi tertentu juga. Hasil penentuan perolehan kembali dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil perolehan kembali yang diperoleh adalah 94,46% dengan nilai RSD 1,73%. Hasil ini menunjukkan hasil akurasi yang baik karena masuk dalam syarat keberterimaan persen perolehan kembali pada jarak 92-105 % (AOAC 2002).



Gambar 3. Kurva hubungan konsentrasi dengan luas area standar andrografolid

Tabel 2. Perolehan kembali Andrografolid dalam campuran ekstrak tanaman sambiloto dan binahong

Ulangan	[Andrografolid] standar (mg/mL)	Spike contoh (mg/mL)	[Andrografolid] teori (mg/mL)	Area	[Andrografolid] terukur (mg/mL)	%Perolehan Kembali
1	0,125	0,2695	0,1972	9541590	0,1904	96,29
2	0,125	0,2695	0,1972	9255314	0,1842	93,16
3	0,125	0,2695	0,1972	9325530	0,1857	93,93
Rerata						94,46
SD						1,6309
%RSD						1,73

Presisi dari sistem dilakukan dengan cara keterulangan (*repeatability*), yaitu ketelitian yang dihasilkan oleh analisis yang sama dalam satu periode kerja laboratorium, menggunakan larutan-larutan dan peralatan yang sama. Hasilnya dinyatakan dengan %RSD dari luas area yang diperoleh sebagai respon kromatografi. Menurut Harmita (2004), ketelitian suatu metode dikatakan memenuhi kriteria jika nilai $RSD \leq 2\%$. Namun nilai tersebut dapat berubah bergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah contoh, dan kondisi laboratorium. Presisi yang diperoleh, yaitu 3,46%. Nilai %RSD yang rendah menunjukkan bahwa metode ini memiliki presisi yang baik. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantisasi (LOQ) dapat digunakan untuk memperkirakan sensitivitas suatu metode (Vijaykumar 2007). Nilai LOD yang diperoleh yaitu 0,028 mg/mL, artinya andrografolid pada konsentrasi tersebut masih dapat terdeteksi tetapi tidak dapat digunakan dalam kuantisasi karena dapat menyebabkan bias dalam perhitungan. Sedangkan nilai LOQ yang diperoleh 0,096 mg/mL. Konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi terkecil yang tidak menimbulkan bias dalam perhitungan sehingga masih dapat digunakan. Tabel 3 menunjukkan hasil uji parameter validasi metode yang telah dilakukan.

Tabel 3. Parameter Validasi Metode RP-HPLC Andrografolid

Parameter	Hasil
Linieritas (koefisien korelasi)	0,9999
Selektivitas (Rs)	2,14
Presisi (%RSD, n=6)	3,46
Batas Deteksi (mg/mL)	0,028
Batas Kuantisasi (mg/mL)	0,096
Akurasi (%)	94,46

KESIMPULAN

Presisi dari sistem dilakukan dengan cara keterulangan (*repeatability*), yaitu ketelitian yang dihasilkan oleh analisis yang sama dalam satu periode kerja laboratorium, menggunakan larutan-larutan dan peralatan yang sama. Hasilnya dinyatakan dengan %RSD dari luas area yang diperoleh sebagai respon kromatografi. Menurut Harmita (2004), ketelitian suatu metode dikatakan memenuhi kriteria jika nilai $RSD \leq 2\%$. Namun nilai tersebut dapat berubah bergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah contoh, dan kondisi laboratorium. Presisi yang diperoleh, yaitu 3,46%. Nilai %RSD yang rendah menunjukkan bahwa metode ini memiliki presisi yang baik. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantisasi (LOQ) dapat digunakan untuk memperkirakan sensitivitas suatu metode (Vijaykumar 2007). Nilai LOD yang diperoleh yaitu

0,028 mg/mL, artinya andrografolid pada konsentrasi tersebut masih dapat terdeteksi tetapi tidak dapat digunakan dalam kuantisasi karena dapat menyebabkan bias dalam perhitungan. Sedangkan nilai LOQ yang diperoleh 0,096 mg/mL. Konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi terkecil yang tidak menimbulkan bias dalam perhitungan sehingga masih dapat digunakan. Tabel 3 menunjukkan hasil uji parameter validasi metode yang telah dilakukan.

Metode RP-HPLC yang dikembangkan untuk menentukan kadar andrografolid sebagai senyawa penanda pada campuran ekstrak memenuhi persyaratan validasi dengan kesesuaian sistem, selektivitas, dan sensitivitas yang baik. Respon dari standar andrografolid linear pada rentang konsentrasi 0,031-0,5 mg/mL dengan $r^2=0,9999$. Akurasi yang diperoleh, yaitu 94,46% dengan nilai RSD 1,73%. Presisi, limit deteksi (LOD), dan limit kuantisasi (LOQ) yang diperoleh masing-masing, yaitu 3,46%, 0,028 mg/mL, 0,096 mg/mL. Metode yang divalidasi ini dapat digunakan sebagai referensi untuk penentuan kadar andrografolid dalam standarisasi obat herbal terstandar dari campuran ekstrak tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Analytical Communities. (2002). Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. [internet] [diacu 2017 April 4]. Tersedia dari: <http://www.aoc.org>.
- Da'i, M., Wikantyasning, E.R., Suhendi, A., & Hairunisa, I. (2015). Validated HPLC Method for Determination of Andrographolide in Mixed Herbal Extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 35(2): 140-143.
- Dewoto, H.R. (2007). Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 57(7): 205-211.
- Fidrianny, I., Rukoyah, U., & Ruslan, K. (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.
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Verifikasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3): 117-135.
- [ICH] International Conference on Harmonisation. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). [internet] [diacu 2017 April 4]. Tersedia dari: <http://www.ich.org>.
- [IUPAC] International Union Of Pure And Applied Chemistry. (2002). Harmonized Guidelines For Single Laboratory Validation Of Methods Of Analysis (IUPAC Technical Report). [internet]

- [diacu 2017 April 4]. Tersedia dari: <http://www.iupac.org>.
- Kumar, R.A., Sridevi, K., Kumar, N.V., Nanduri, S., & Rajagopal, S. (2004). Anticancer and Immunostimulatory Compounds from *Andrographis paniculata*. *Journal of Ethnopharmacology*. 92(2-3): 291-295.
- Mishra, K., Dash, A.P., Swain, B.K. & Dey, N., 2009. Anti-malarial Activities of *Andrographis paniculata* and *Hedyotis corymbosa* Extracts and Their Combination with Curcumin. *Malaria Journal*. 8(1): 26.
- Nugroho, A.E., Andrie, M., Warditiani, N.K., Siswanto, E., Pramono, S. & Lukitaningsih, E. (2012). Antidiabetic and Antihiperlipidemic Effect of *Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees and Andrographolide in High-fructose-fatted Rats. *Indian Journal of Pharmacology*. 44(3): 377-381.
- Sajeeb, B.K., Kumar, U., Halder, S. & Bachar, S.C., (2015). Identification and Quantification of Andrographolide from *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees by RP-HPLC Method and Standardization of Its Market Preparations. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 14(1): 71-78.
- Shabir, G.A. (2004). A Practical Approach to Validation of HPLC Methods under Current Good Manufacturing Practices. *Journal of Validation Technology*. 10: 210-218.
- Syukri, Y., Nugroho, A.E., Martien, R., Lukitaningsih, E. (2015). Validasi Penetapan Kadar Isolat Andrografolid dari Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Nees Menggunakan HPLC. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*. 2(1): 8-14.
- Syukri, Y., Martien, R., Lukitaningsih, E. & Nugroho, A.E. (2016). Quantification of Andrographolide Isolated from *Andrographis paniculata* Nees Obtained from Traditional Market in Yogyakarta Using Validated HPLC. *Indonesian Journal of Chemistry*. 16(2): 190-197.
- Vijaykumar, K., Murthy, P.B.S., Kannababu, S., Syamasundar, B. & Subbaraju, G.V. (2007). Estimation of Andrographolide in *Andrographis paniculata* Herb, Extract, and Dosage Forms. *International Journal of Applied Science and Engineering*. 5(1): 27-39.
-