

**ISOLASI ANDROGRAFOLIDA DARI DAUN SAMBILOTO
(*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) DAN PENETAPAN
KADARNYA DENGAN HPLC**

SKRIPSI



Oleh :

**NOVA HERMANTO
K 100 060 065**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2010**

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Penggunaan obat dari sumber bahan alam (tumbuhan) sekarang ini berkembang dengan pesat. Telah banyak dilakukan penelitian tentang uji aktivitas farmakologi bahan alam terhadap berbagai penyakit. Tumbuhan yang mempunyai aktivitas biologis tertentu, akan dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kandungan kimia (zat aktif) di dalam tumbuhan tersebut dan akhirnya akan diperoleh *lead compound* (senyawa penuntun) untuk dikembangkan menjadi obat baru.

Untuk memperoleh *lead compound*, salah satu metode yang digunakan yaitu dengan teknologi *high throughput screening* (HTS) dimulai dari skrining terhadap ekstrak-ekstrak tanaman sebagai *chemical library* dengan menggunakan metode penapisan. Proses penemuan obat melalui HTS dilakukan dengan penapisan tahap kedua dalam bentuk penapisan tingkat fraksi dari ekstrak dan dilanjutkan dengan isolasi dan identifikasi dari senyawa bioaktif (senyawa *lead compound*) tersebut dan uji farmakologi (Sudoyo, 1997; Wahyuningsih, 2003).

Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) merupakan salah satu tanaman obat di Indonesia yang digunakan untuk mengobati berbagai penyakit. Pada berbagai jaringan tumbuhan ini, telah ditemukan suatu senyawa diterpen lakton yaitu andrografolida, yang merupakan kandungan kimia utama tumbuhan ini yang rasanya pahit (Fujita *et al.*, 1984).

Pada berbagai penelitian senyawa andrografolida mempunyai potensi sebagai *lead compound* untuk dikembangkan sebagai obat baru. Dilaporkan bahwa senyawa andrografolida memperlihatkan aktivitas menghambat proliferasi sel-sel tumor *in vitro*, yang mewakili berbagai jenis kanker, dengan cara menghentikan siklus sel pada fase G0-G1 dan mengurangi ekspresi CDK-4 (*cyclin dependent kinase 4*) (Rajagopal, 2003; Satyanarayana, 2004). Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa senyawa andrografolida memiliki potensi sebagai antikanker melalui mekanisme apoptosis terhadap sel kanker HeLa dengan harga IC₅₀ sebesar 109,90 µg/mL (Sukardiman *et al.*, 2005). Andrografolida mempunyai aktivitas sebagai antihepatotoksik yaitu memperlihatkan proteksi terhadap *hepatic microsomal lipid peroxidation* yang diinduksi alkohol dan karbon tetraklorid (Evans, 2002). Andrografolida juga mempunyai aktivitas antiviral yaitu mampu menghambat siklus *lytic* dari *Epstein-Barr virus* dengan kadar 5 µg/ mL (Lin *et al.*, 2008).

Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan isolasi senyawa andrografolida dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees, Acanthaceae). Metode isolasi yang digunakan pada penelitian tersebut yaitu: pembuatan ekstrak dengan cara soxhletasi menggunakan alat soxhlet dengan pelarut aseton selama 20 jam, dilanjutkan dengan pemekatan ekstrak, filtrasi dan pencucian dengan aseton. Pemurnian isolat kasar menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel 60 (0,063 – 0,2 mm) dan fase gerak n-heksana-etil asetat (1:5). Hasil penelitian diperoleh isolat yang mempunyai titik leleh, R_f, spektra ultraviolet dan inframerah yang merupakan karakteristik andrografolida

(Sukrasno *et al.*, 2004). Pada penelitian yang lain, telah diisolasi andrografolida dengan metode Matsuda (1994). Serbuk herba sambiloto dimaserasi dengan metanol pada suhu 60°C selama 24 jam, dan maserasi diulang sampai 5 kali. Dilanjutkan filtrasi dan pemekatan ekstrak, kemudian dipartisikan dengan air dan etil asetat. Pemurnian kristal andrografolida dilakukan dengan rekristalisasi dengan metanol panas atau kromatografi kolom dengan eluen kloroform: metanol, sehingga diperoleh kristal andrografolida (Sukardiman *et al.*, 2005). Dari kedua metode tersebut dapat digunakan sebagai acuan untuk mengisolasi andrografolida dengan memodifikasi pengekstraksi awal menggunakan solven aseton atau metanol.

Berdasarkan uraian tersebut jelas senyawa andrografolida mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai obat baru. Hal ini yang mendorong peneliti untuk melakukan isolasi senyawa andrografolida dari daun sambiloto (*Andrographis paniculata*), sehingga memungkinkan penyediaan senyawa andrografolida untuk uji aktivitas farmakologi, senyawa marker untuk industri herbal dan senyawa pemandu untuk ekstraksi di industri.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimanakah isolasi andrografolida dari daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) dengan memodifikasi pengekstraksi awal menggunakan solven aseton atau metanol?

2. Berapa kemurnian senyawa andrografolida dari daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) yang diukur dengan menggunakan metode HPLC?

C. Tujuan Penelitian

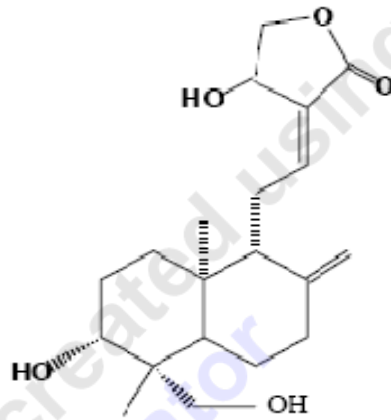
Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengisolasi senyawa andrografolida dari daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) dengan pengesktraksi menggunakan solven aseton atau metanol.
2. Menentukan kemurnian senyawa andrografolida yang diisolasi dari daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) dengan menggunakan *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC).

D. Tinjauan Pustaka

1. Andrografolida

Andrografolida (Gambar 1) merupakan bahan aktif utama *Andrographis paniculata*. Senyawa tersebut menyumbangkan 1% dari berat ekstrak kering *A. paniculata* (Calabrese *et al.*, 2000). Kandungan andrografolida pada setiap bagian tanaman berbeda. Pada daun, kandungan andrografolida lebih tinggi (2,6%) dari pada bahagian batang (0,1-0,4%). Kandungan andrografolida sebelum berbunga (2%) lebih tinggi dari pada kandungan setelah berbunga yaitu (0,5%) (Calabrese *et al.*, 2000).



Gambar 1. Stuktur andrografolida

Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan isolasi senyawa andrografolida dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees, Acanthaceae). Metode yang digunakan yaitu sebagai berikut, pembuatan ekstrak dengan cara soxhletasi menggunakan alat soxhlet dengan pelarut aseton selama 20 jam. Dilanjutkan dengan pemekatan ekstrak, filtrasi dan pencucian dengan aseton. Diperoleh isolat kasar dengan kemurnian 92,6% dan rendemen 2,5%, yang selanjutnya dimurnikan secara kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel 60 (0,063 – 0,2 mm) dan fase gerak n-heksana-etil asetat (1:5). Hasil penelitian diperoleh isolat yang mempunyai titik leleh, Rf, spektra ultraviolet dan inframerah yang merupakan karakteristik andrografolia (Sukrasno *et al.*, 2004).

Pada penelitian yang lain, telah diisolasi andrografolida dengan metode Matsuda (1994). Serbuk herba sambiloto dimaserasi dengan metanol pada suhu 60°C selama 24 jam, dan maserasi diulang sampai 5 kali. Hasil maserasi kemudian disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental metanol. Ekstrak kental metanol ini selanjutnya dipartisikan dengan

air dan etil asetat sama banyak dan dikocok dengan corong pisah. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan diuapkan dengan rotavapour untuk mendapatkan andrografolida yang masih kotor. Pemurnian kristal andrografolida dilakukan dengan rekristalisasi dengan metanol panas atau kromatografi kolom dengan eluen kloroform: metanol, sehingga diperoleh kristal andrografolida (Sukardiman *et al.*, 2005).

Senyawa andrografolida telah diteliti aktivitasnya, diantaranya yaitu senyawa andrografolida memiliki potensi sebagai antikanker melalui mekanisme apoptosis terhadap sel kanker HeLa dengan harga IC_{50} sebesar 109,90 $\mu\text{g/mL}$ (Sukardiman *et al.*, 2005). Pada aktivitas antihepatotoksik senyawa diterpen lakton andrografolida memperlihatkan proteksi terhadap *hepatic microsomal lipid peroxidation* yang diinduksi alkohol dan karbon tetraklorid (Evans, 2002). Andrografolida juga mempunyai aktivitas antiviral yaitu mampu menghambat siklus *lytic* dari *Epstein-Barr Virus* dengan kadar 5 $\mu\text{g/mL}$ (Lin *et al.*, 2008).

2. Uraian Tentang Tanaman Sambiloto

a) Klasifikasi Tanaman

Divisi : Spermatophyta
Sub Divisi : Angiospermae
Classis : Dicotyledonae
Sub Classis : Asteridae
Ordo : Scrophulariales
Familia : Acanthaceae
Genus : Andrographis

Species : *Andrographis paniculata* Nees

(Anonim^a, 2009)

b) Kandungan Kimia

Tanaman *Andrographis paniculata* mengandung senyawa diterpen yaitu andrografolida yang merupakan kandungan kimia utama (Fujita *et al*, 1984), andrografisida merupakan glikosida andrografolida (Hu, 1982). Fraksi yang larut etil asetat dari ekstrak metanol herbal *Andrographis paniculata* ditemukan senyawa sejenis yaitu 14-*epi*- andrografolida dan isoandrografoida (Matsuda *et al*, 1994). *Andrographis paniculata* juga mengandung flavonoid yaitu orozilin, wogonin, andrografidine A dan andandrografidine B, C, D, E dan F (Tang dan Eisenbrand, 1992).

c) Kegunaan Tanaman

Andrographis paniculata atau sambiloto, adalah tumbuhan obat yang mempunyai sifat menyembuhkan berbagai penyakit. Di Indonesia, sambiloto lazimnya dikenal sebagai obat tradisional yang mempunyai sifat hepatoprotektif, antiinflamasi, antipiretik atau meredakan demam, dan untuk penawar racun atau detoksikasi. Seluruh bagian tumbuhan sambiloto, atau bersama-sama dengan kumis kucing (*orthosiphon stamineus*), digunakan pula untuk menyembuhkan sakit gula atau kencing manis atau diabet. Daun *Andrographis paniculata* yang rasanya pahit digunakan sebagai tonikum, menumbuhkan nafsu makan, untuk pengobatan radang tenggorokan, demam, malaria, tifus, sakit perut, disentri, difteri, gatal-gatal, eksema, radang usus buntu, gonorea atau kencing nanah, sifilis, dan epilepsi atau ayun. Daun *Andrographis paniculata* digunakan pula

untuk menyembuhkan luka karena gigitan ular berbisa atau racun binatang lainnya. Herbal sambiloto *Andrographis paniculata* juga digunakan untuk menurunkan tekanan darah dan mengatur menstruasi. Herbal *Andrographis paniculata* atau sambiloto resmi terdaftar dalam Materia Medika Indonesia, Jilid III, tahun 1979, dan digunakan sebagai diuretik dan antipiretik (Sjamsul *et al.*, 2007).

3. Maserasi

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewan menurut cara yang cocok, diluar pengaruh cahaya matahari langsung (Anonim, 1979). Ekstraksi atau penyarian merupakan peristiwa perpindahan zat aktif yang semula berada di sel di tarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif larut dalam cairan hayati (Anonim, 1986).

Ekstraksi adalah penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan dapat larut. Bahan mentah obat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan ataupun hewan tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan atau dikeringkan. Tiap-tiap bahan mentah obat disebut ekstrak, tidak mengandung hanya satu unsur saja tetapi berbagai unsur, tergantung pada obat yang digunakan dan kondisi dari ekstraksi (Ansel, 1989).

Maserasi adalah cara ekstraksi yang paling sederhana. Bahan simplisia yang dihaluskan sesuai dengan syarat-syarat farmakope (umumnya terpotong-potong atau berupa serbuk kasar) disatukan dengan bahan pengestraksi. Selanjutnya rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya (mencegah reaksi

yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna) dan diaduk kembali. Waktu maserasi pada umumnya 5 hari. Setelah waktu tersebut, artinya keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk dalam cairan telah tercapai. Dengan pengadukan dijamin keseimbangan konsentrasi bahan lebih cepat dalam cairan. Keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi absolut (Voigt, 1994).

4. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari kandungan yang lain. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar dan senyawa non polar akan masuk ke pelarut non polar (Harborne, 1987).

Metode fraksinasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan partisi. Dasar pemisahan dengan cara partisi adalah perbedaan kelarutan, dan syarat pelarut yang digunakan dalam partisi adalah bahwa dua pelarut yang digunakan tidak saling bercampur. Dua pelarut yang tidak saling bercampur misalnya *n*-heksana-metanol, kloroform-air, dan etil asetat-air.

5. Isolasi

Faktor paling utama yang harus dipertimbangkan sebelum merancang sebuah prosedur isolasi adalah sifat alami senyawa target yang terdapat dalam suatu ekstrak atau fraksi. Gambaran umum sifat molekul yang akan diisolasi sangat membantu dalam menentukan proses isolasi meliputi kelarutan (hidrofobisitas atau hidrofilitas), sifat asam basa, stabilitas, dan ukuran molekul.

Jika mengisolasi suatu senyawa yang sudah diketahui atau dari sumber yang baru, dapat dicari informasi dari literatur mengenai sifat kromatografi senyawa target tersebut, sehingga mudah untuk menentukan metode isolasi yang sesuai. Penentuan prosedur isolasi untuk ekstrak dengan kandungan senyawa yang sama sekali belum diketahui tipe senyawanya dapat menimbulkan kesulitan. Oleh karena itu, disarankan untuk dilakukan uji kualitatif untuk mengetahui tipe senyawa seperti: fenolik, steroid, alkaloid, flavanoid, dan sebagainya dengan menggunakan kromatografi lapis tipis atau profil kromatografi cair kinerja tinggi (Sarker *et al.*, 2006).

6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatogram pada KLT merupakan noda-noda yang terpisah setelah visualisasi fisika atau kimia. Visualisasi fisika dengan cara melihat noda kromatogram yang mengadsorpsi radiasi ultraviolet (UV) atau berfluoresensi dengan radiasi UV (254 nm atau 366 nm). Visualisasi kimia adalah dengan mereaksikan kromatogram dengan pereaksi warna yang memberikan warna atau fluoresensi spesifik yaitu dengan penyemprotan atomizer atau memberikan uap zat kimia (Mulja dan Suharman, 1995). Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram dinyatakan dengan *retardation factor* (Rf) atau hRf. Angka Rf diperoleh dengan membandingkan jarak bercak dari titik awal penotolan dengan jarak yang ditempuh fase gerak dan hRf diperoleh dengan mengalikan angka Rf dengan faktor 100 (h), menghasilkan nilai berjarak 0 – 100 (Stahl, 1985).

Parameter pada kromatografi lapis tipis adalah faktor retensi (Rf), merupakan perbandingan jarak yang ditempuh solute dengan jarak yang ditempuh fase gerak. Adapun rumusnya sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solute (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak (cm)}}$$

(Sumarno, 2001)

Keuntungan dari penggunaan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dalam analisis adalah:

- a. Peralatan yang digunakan relatif lebih murah.
- b. Waktu yang diperlukan dalam pemisahan senyawa obat relatif lebih cepat apabila dibandingkan dengan kromatografi kertas.
- c. Jumlah cuplikan yang digunakan relatif sedikit.

(Sastrohamidjojo, 2004)

7. High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia. KCKT termasuk metode analisis terbaru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fasa gerak cairan dan fasa diam cairan atau padat. Banyak kelebihan metode ini jika dibandingkan dengan metode lainnya (Done dkk, 1974; Snyder dan Kirkland, 1979; Hamilton dan Sewell, 1982; Johnson dan Stevenson, 1978). Kelebihan itu antara lain :

- a. Mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran
- b. Mudah melaksanakannya

- c. Kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi
- d. Dapat dihindari terjadinya dekomposisi/kerusakan bahan yang dianalisis
- e. Resolusi yang baik
- f. Dapat digunakan bermacam-macam detektor
- g. Kolom dapat digunakan kembali
- h. Mudah melakukan "*sample recovery*"

(Putra, 2004)

E. Keterangan Empiris

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat diisolasi senyawa andrografolida dengan metode partisi menggunakan air-etil asetat dan rekristalisasi menggunakan metanol panas, dan diperoleh isolat dengan kemurnian yang tinggi setelah diukur dengan HPLC.