

**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR ISOLAT
ANDROGRAFOLID DARI TANAMAN SAMBILOTO
(*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Ness) DALAM SAMPEL
PLASMA SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI – ULTRAVIOLET**

SKRIPSI

**IRMA IRWANDA
A191111**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2023**

**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR ISOLAT
ANDROGRAFOLID DARI TANAMAN SAMBILOTO
(*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Ness) DALAM SAMPEL
PLASMA SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI – ULTRAVIOLET**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**IRMA IRWANDA
A191111**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2023**

**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR ISOLAT ANDROGRAFOLID
DARI TANAMAN SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Ness)
DALAM SAMPEL PLASMA SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI – ULTRAVIOLET**

**IRMA IRWANDA
A191111**

Agustus 2023

Disetujui oleh :

Pembimbing

Pembimbing

Apt. Melvia Sundalian, M.Si.

Dr. apt. Mulyana, M.Kes.

Kutipan atau saduran baik sebagian ataupun seluruh naskah, harus menyebut nama pengarang dan sumber aslinya, yaitu Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Skripsi ini adalah persembahan kepada kedua orang tua Bapak (Alm. Wanda) dan Ibu (Ade Hodijah) yang selalu memberikan kasih sayang, doa, dan dukungan tanpa henti. Adik dan keluarga besar, sahabat-sahabat terbaik terima kasih atas dukungan, dan semangat, dan untuk semua pihak yang turut membantu.

ABSTRAK

Andrografolid merupakan kandungan utama yang terdapat dalam sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Ness) yang mempunyai berbagai aktivitas farmakologis seperti antioksidan dan antiinflamasi. Obat erat kaitannya dengan efektivitas obat didalam tubuh dan salah satu parameternya adalah penetapan kadar obat. Tujuan penelitian ini dilakukan optimasi kondisi analisis dan validasi untuk menentukan metode penetapan kadar Andrografolid dalam plasma darah dengan menggunakan metode. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Andrografolid diekstraksi dari plasma dengan pengendapan protein menggunakan metanol. Metanol dicampurkan ke dalam plasma dengan perbandingan 1:1 kemudian dikocok menggunakan vortex selama 20 detik, dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 selama 10 menit. Sistem kromatografi terdiri dari kolom Zorbax Eclipse C18 (4,6 x 150mm, 5 μ m), fase gerak metanol dan air dengan perbandingan 65:35 v/v; laju alir 1 mL/menit, deteksi pada panjang gelombang 223 nm. Hasil dari penelitian yang telah dilakukan ini menunjukkan linieritas pada rentang konsentrasi 0,5-25 ppm dengan nilai koefisien korelasi (r) 0,989 dengan batas kuantitasi 11,535 μ g/mL dan batas deteksi 3,086 μ g/mL. Uji Akurasi (%*Recovery* berada direntang 107,78-112,71) dan presisi (intra hari dan inter hari dengan % RSD \leq 15% (kecuali pada konsentrasi 1 ppm). Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa Andrografolid dalam plasma dapat dianalisis menggunakan KCKT.

Kata Kunci: Andrografolid, KCKT, validasi metode

ABSTRACT

Andrografolid is the main content found in sambiloto (Andrographis paniculata (Burm.f.) Ness) which has various pharmacological activities such as antioxidants and anti-inflammatory. Drug development is closely related to the effectiveness of drugs in the body and one of the parameters is the determination of drug levels in plasma. The purpose of this study was to optimize analytical conditions and validation to determine the method of determining Andrografolid levels in blood plasma using the High Performanc Liquid Chromatography (HPLC) method. Andrografolid was extracted from plasma by protein precipitation using methanol. Methanol was mixed into plasma in a ratio of 1:1 then shaken using a vortex for 20 seconds, and centrifuged at 3000 speed for 10 minutes. The chromatography system consisted of a Zorbax Eclipse C18 column (4.6 x 150mm, 5 μ m), a mobile phase of methanol and water with a ratio of 65:35 v/v; flow rate of 1 mL/min, detection at a wavelength of 223 nm. The results of this research showed linearity in the concentration range of 0.5-25 ppm with a correlation coefficient (r) of 0.989 with a limit of quantitation of 3.336 μ g/mL and a limit of detection of 1.310 μ g/mL. Accuracy test (%Recovery is in the range of 107.78-112.71) and precision (intra-day and inter-day with % RSD \leq 15% (except at a concentration of 1 ppm). Based on this study, it can be concluded that Andrografolid in plasma can be analyzed using KCKT.

Keywords: *Andrographolide, KCKT, validation method*

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala berkah rahmat dan ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“Validasi Metode Penetapan Kadar Isolat Andrografolid Dari Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.F.) Ness) Dalam Sampel Plasma Secara *In Vitro* Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi – Ultraviolet”**.

Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana pada Program Studi Sarjana Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing Apt. Melvia Sundalian, M.Si. dan Dr. apt. Mulyana, M.Kes. atas bimbingan, nasihat, dukungan, serta pengorbanan yang diberikan. Pada kesempatan ini, tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. apt. Adang Firmansyah, M.Si., selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
2. Dr. apt. Diki Prayugo, M.Si., selaku Wakil Ketua I Bidang Akademik,
3. Pupung Ismayadi, S. T, M.M., selaku Wakil Ketua II Bidang Keuangan,
4. Dr. apt. Revika Rachmaniar, M. Farm., selaku Wakil Ketua III Bidang Humas, Kemahasiswaan, dan Alumni,
5. Dr. apt. Wiwin Winingsih, M.Si., selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,
6. apt. Maria Ulfah, M.Si., selaku Dosen Wali yang telah banyak memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis,
7. Seluruh staf dosen, staf administrasi, serta karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
8. Serta teman-teman Angkatan 2019 yang telah memberikan inspirasi dan kegembiraan selama penulis kuliah di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Dengan kerendahan hati diharapkan masukan berupa kritik dan saran yang bersifat membangun untuk perbaikan di masa yang akan datang. Penulis berharap semoga ugas akhir ini akan memberikan manfaat bagi penulis sendiri dan juga bagi pihak lain yang berkepentingan.

Bandung, Agustus 2023
Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
KUTIPAN	ii
PERSEMBAHAN	iii
ABSTRAK	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Kegunaan Penelitian	2
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Tumbuhan Sambiloto	3
2.1.1 Tumbuhan Sambiloto	3
2.1.2 Klasifikasi Sambiloto	3
2.1.3 Morfologi Tanaman	4
2.1.4 Kandungan Kimia	4
2.2. Andrografolid	5
2.2.1 Fisikokimia Andrografolid	5
2.2.2 Farmakologi Andrografolid	6
2.3. Plasma	6
2.4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	7
2.5. Validasi Metode	8
2.5.1 Uji Kesesuaian Sistem	9
2.5.2 Linearitas	9
2.5.3 Batas Deteksi (<i>Limit of detection</i> , LOD)	10
2.5.4 Batas Kuantifikasi (<i>Limit of quantification</i> , LOQ)	10
2.5.5 Spesifisitas (Selektivitas)	10
2.5.6 Presisi	10
2.5.7 Akurasi	11
2.6. Analisis Andrografolid Menggunakan KCKT	11

	2.7. Spektrofotometer UV-Vis.....	12
BAB III	TATA KERJA.....	13
	3.1 Alat	13
	3.2 Bahan.....	13
	3.3 Metode Penelitian.....	13
	3.3.1 Pembuatan Larutan Induk	13
	3.3.2 Penentuan Kondisi Optimum KCKT	13
	3.3.3 Penetapan Metode Ekstraksi	14
	3.3.4 Validasi Metode Analisis	14
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	16
	4.1 Penetapan Panjang Gelombang	16
	4.2 Optimasi Kondisi Analisis.....	17
	4.2.1 Pemilihan Komposisi Fase Gerak	17
	4.2.2 Uji Kesesuaian Sistem.....	17
	4.2.3 Penentuan Metode Ekstraksi	19
	4.3 Validasi Metode Penetapan Kadar Andrografolid dalam Plasma	20
	4.3.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas	20
	4.3.2 Pengukuran Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantifikasi (LOQ).....	21
	4.3.3 Uji Selektivitas.....	21
	4.3.4 Uji Akurasi dan Perolehan Kembali	23
	4.3.5 Uji Presisi	24
BAB V	SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA	26
	5.1 Simpulan.....	26
	5.2 Alur Penelitian Selanjutnya	26
	DAFTAR PUSTAKA	27
	LAMPIRAN	31

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Hasil rata rata uji kesesuaian sistem	18
4.2 Hasil optimasi pengendapan protein plasma.....	19
4.3 Hasil Uji Akurasi.....	23
4.4 Hasil Uji Presisi.....	25

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tumbuhan Sambiloto	3
2.2 Struktur Andrografolid	5
4.1 Spektrum panjang gelombang maksimum Andrografolid konsentrasi 10 ppm pada spektrofotometer UV-Vis.....	16
4.2 Kromatogram blangko plasma.....	20
4.3 Kromatogram Andrografolid.....	20
4.4 Kurva Kalibrasi Andrografolid dalam plasma.....	21
4.5 Kromatogram uji selektivitas.....	22

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. <i>Certificate Of Analysis</i> Isolat Andrografolid	31
2. Perhitungan Pengenceran	32
3. Perhitungan Pengenceran (Lanjutan)	33
4. Hasil Pengujian Spektrofotometri UV-Vis	34
5. Gambar Kromatogram	35
6. Hasil Uji Kesesuaian Sistem	36
7. Data Kurva Kalibrasi Andrografolid Dalam Plasma	37
8. Penentuan LOD & LOQ.....	38
9. Hasil Uji Akurasi	39
10. Hasil Uji Presisi.....	40
11. Dokumentasi	41

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, S. (2011) 'Review *A. paniculata*', *Alternative Medicine Review*, 16(1), pp. 66–77.
- Alyssa Azlan and Luayyou (2013) 'Mechanisms of Action of *Andrographis Paniculata* As Anti- Atherosclerotic Agent', *European International Journal of Science and Technology*, 2(2), pp. 91–96.
- Aromdee, C. (2012) 'Modifications of andrographolide to increase some biological activities: A patent review (2006–2011)', *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 22(2), pp. 169–180.
- Bohari .(2021) '*Kimia Pemisahan*', 1st edn. Bogor: PT Penerbit IPB Press.
- Chamoli, M. *et al.* (2014) 'TLC-densitometric evaluation of three major bioactive diterpene lactones in *andrographis paniculata* intercropped with *Morus alba*', *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 37(16), pp. 2258–2274.
- Chao, W.W. and Lin, B.F. (2010) 'Isolation and identification of bioactive compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian)', *Chinese Medicine*, 5, pp. 1–15.
- Da'i, M. *et al.* (2015) 'Validated HPLC method for determination of andrographolide in mixed herbal extract', *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 35(2), pp. 140–143.
- DEPKES RI. (2020) '*Farmakope Indonesia Jilid VI*', Jakarta: Direktorat Jenderal Farmasi dan Alat Kesehatan Kemenkes RI
- European Medicines Agency. (2011) '*Guideline on bioanalytical method validation*', Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).
- Food and Drug Administration. (2013) '*Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*', Rockville: Center for Veterinary Medicine.
- Fitriyah, L., Ratnani, R. and Hartati, I. (2015) 'Ekstraksi Hidrotropi Andrographolide Dari Tumbuhan Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Ness) Menggunakan Larutan Urea', *Jurnal Momentum UNWAHAS*, 11(1), p. 113508.
- Gandjar, I. G., & Rohman, A (2010) '*Kimia Farmasi Analisis*', Edisi IV, 298, 305–312,319. Pustaka Pelajar, Yogyakarta
- Habibah, N.A. (2009) 'Efektivitas Penambahan Elisitor Asam Jasmonik dalam Peningkatan Sintesis Senyawa Bioaktif Andrografolid pada Kultur Suspensi Sel Sambiloto', *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 1(1), pp. 11–18.
- Harahap, Y. (2010) '*Peran Bioanalisis dalam Penjaminan Kualitas Obat dan Peningkatan Kualitas Hidup Pasien*', Depok: UI Press.
- Harmita. (2004) 'Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya', *Majalah Ilmu Kefarmasian* Vol. I. No. 3 hal. 117-135.

- Harmita. (2006) 'Buku ajar analisis fisikokimia', Depok : Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Huber, Ludwig. (2007) '*Validation and Qualification in Analytical Laboratories*', London: Informa.
- Hossain, M.S. *et al.* (2014) 'A Review of Ethnobotany, Phytochemistry, and Pharmacology', *The Scientific World Journal*, 2014, pp. 1–28.
- Illah, Z.A. *et al.* (2014) 'Ekstraksi Hidrotopi Dengan Magnetic Stirer Untuk Mendapatkan Senyawa Andrographolide Dari Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata*)', *Momentum*, 10(1), pp. 38–42.
- Johnson, E.L. dan R.Stevenson. (1991) '*Dasar Kromatografi Cair*', Terj. Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB Press.
- Kumar, A. *et al.* (2012) 'A Review on King of Bitter (Kalmegh)', *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 2(1), pp. 116–124.
- Kumoro, A. and Hasan, M. (2007) 'Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Andrographolide from', *Chin. J. Chem. Eng.*, 15(6), pp. 877–883.
- Kurnia, D., Tri Pujilestari, E. and Pamudjo, I. (2019) 'Pengembangan Metode Penetapan Kadar Metil Prednisolon Dalam Sediaan Dry Injection Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Kckt)', *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 4(01), pp. 13–25.
- Laurentius Susetia, I. *et al.* (2015) 'Pengobatan Komplementer Daun Sambiloto (Andrographolide) sebagai Antitrombosis melalui Aktivasi Jalur Endothelial Nitric Oxide Synthase - Nitric Oxide / Cyclic Guanosin Mono Phosphate', *Jurnal Kedokteran Meditek* [Preprint].
- Lestari, S.W. (2014) *Validasi Metode Penetapan Kadar Aliskiren dalam Plasma Darah secara In Vitro menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)*.
- Muthawali, D.I. (2019) 'Penetapan Kadar Biuret Dalam Pupuk Urea Prill Dengan Metode Spektrofotometri', *Saintek ITM*, 31(2).
- Patarapanich, C. *et al.* (2007) 'HPLC determination of active diterpene lactones from *Andrographis paniculata* Nees planted in various seasons and regions in Thailand', *Thai J. Pharm. Sci.*, 31(November 2015), pp. 91–99.
- Pholphana, N. *et al.* (2013) 'Changes in the contents of four active diterpenoids at different growth stages in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees (Chuanxinlian)', *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 8(1), pp. 1–12.
- Prasetyo, B.F. *et al.* (2018) 'Formation of Andrographolide- β -cyclodextrin Inclusion to Increase Solubility and Dissolution Rate Pembentukan Kompleks Inklusi Andrografolid- β -Siklodekstrin untuk Meningkatkan Kelarutan dan Laju Disolusi', 5(2), pp. 49–54.
- Preet, R. *et al.* (2014) 'Synthesis and biological evaluation of andrographolide analogues as anti-cancer agents', *European Journal of Medicinal Chemistry*,

85, pp. 95–106.

- Pujiasmanto, B. *et al.* (2007) 'Study on the morphology and agroecology of creat (Andrographis paniculata nees.) in various habitat', *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 8(4), pp. 326–329.
- Putra, E.D.L. (2004) '*Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi*', USU Digital Library.
- Ratnani, R. D., Hartati, I., & Kurniasari, L. (2012) 'Potensi Produksi Andrographolide Dari Sambiloto (Andrographis Paniculata Nees) Melalui Ekstraksi Hidrotropi', *Momentum*, 8(1), 6–10.
- Rohmah, S.A.A., Muafidah, A. and Martha, R.D. (2021) 'Validasi metode penetapan kadar pengawet natrium benzoat pada sari kedelai di beberapa kecamatan di kabupaten tulungagung menggunakan spektrofotometer uv-vis', *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 3(2), pp. 120–127.
- Sajeed, B.K. *et al.* (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), pp. 71–78.
- Sharma, S., Sharma, Y.P. and Bhardwaj, C. (2018) 'HPLC quantification of andrographolide in different parts of Andrographis paniculata (Burm.f.) Wall. ex Nees', ~ 168 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3), pp. 168–171.
- Shargel, Leon dan Andrew B.C. (1988) '*Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan*', Edisi Kedua, Surabaya: Airlangga University Press.
- Sulistiyowati, E. *et al.* (2023) 'Penetapan Kadar Andrografolid dalam Sambiloto (Andrographis paniculata (Burm . f .) Ness) secara KLT-Densitometri Quantification of Andrografolid from Sambiloto (Andrographis paniculata (Burm . f .) Ness) using TLC-Densitometry', 8(2).
- Synder, L. R., J. J. Kirkland and J. L. Glajch. (1997) '*Practical HPLC Method Development*', Second Edition, New York: John Willey & Sons Inc.
- Syukri, Y. *et al.* (2015) 'Validasi Penetapan Kadar Isolat Andrografolid dari Tanaman Sambiloto (Andrographis paniculata Nees) Menggunakan HPLC', *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 2(1), p. 8.
- Syukri, Y. *et al.* (2016) 'Quantification of andrographolide isolated from andrographis paniculata nees obtained from traditional market in yogyakarta using validated HPLC', *Indonesian Journal of Chemistry*, 16(2), pp. 190–197.
- Tan, M.C.S. *et al.* (2016) 'Secondary metabolites from Andrographis paniculata (Burm.f.) nees', *Der Pharmacia Lettre*, 8(13), pp. 157–160.
- Utara, S. (2016) 'Aspek Farmakologi Sambiloto (Andrographis paniculata Nees)', 4(April).

- Vijaykumar, K. *et al.* (2007) 'Estimation of Andrographolide in Andrographis paniculata Herb, Extracts and Dosage forms', *International Journal of Applied Science and Engineering*, 5, p. 1.
- Widyawati, T. *et al.* (2007) 'Aspek Farmakologi Sambiloto (Andrographis paniculata Nees)', *Majalah Kedokteran Nusantara*, 40(3), pp. 216–22.
- Wulandari, N. (2007) 'Validasi Metoda Spektrofotometri Derivatif Ultraviolet Untuk Penentuan Reserpin Dalam Tablet Obat', *Skripsi*, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Yanti, Y.N. and Mitika, S. (2017) 'Uji efektivitas antibakteri ekstrak etanol daun sambiloto (Andrographis paniculata Ness) terhadap bakteri Staphylococcus aureus', *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 2(1), pp. 158–168.
- Zainal, T.H., Wahyudin, E. and Rifai, Y. (2019) 'Penetapan Kurva Standar Senyawa Tetra Hidroxy Ethyl Disulphate (THES) Dalam Plasma Marmut (Cavia porcellus) Menggunakan Kckt', *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 22(3), pp. 90–92.
- Zaitunah, A. and Hut, S. (2002) 'Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dalam Bidang Farmasi', *USU digital library*, (1987), pp. 1–7.
- Zarah, J. *et al.* (2022) 'Aktivitas Antibakteri Jamur Endofitik Rs-2 Yang Diisolasi Dari Tumbuhan Sambiloto (Andrographis paniculata) Antibacterial Activity Of Endophytic Fungus Rs-2 Isolated From Sambiloto (Andrographis paniculata)', *Jurnal Zarah*, 10(1), pp. 1–5.