

**OPTIMASI PENETAPAN KADAR ANDROGRAFOLID DAN KURKUMINOID
DALAM CAMPURAN EKSTRAK *Andrographis paniculata*
DAN *Curcuma domestica* SECARA KROMATOGRAFI
LAPIS TIPIS DENSITOMETRI**

CHRISTINAULY HASIBUAN

0305050132



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN FARMASI

DEPOK

2009

**OPTIMASI PENETAPAN KADAR ANDROGRAFOLID DAN KURKUMINOID
DALAM CAMPURAN EKSTRAK *Andrographis paniculata* DAN
Curcuma domestica SECARA KROMATOGRAFI
LAPIS TIPIS DENSITOMETRI**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

Oleh:

CHRISTINAULY HASIBUAN

0305050132



DEPOK

2009

SKRIPSI : OPTIMASI PENETAPAN KADAR ANDROGRAFOLID DAN
KURKUMINOID DALAM CAMPURAN EKSTRAK
ANDROGRAPHIS PANICULATA DAN CURCUMA
DOMESTICA SECARA KROMATOGRIFI LAPIS TIPIS
DENSITOMETRI

NAMA : CHRISTINAULY HASIBUAN

NPM : 0305050132

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, 30 JUNI 2009



Dr. Abdul Mun'im, MSi.

PEMBIMBING I



Dr. Katrin, MS.

PEMBIMBING II

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana:	7 - 7 - 2009
Penguji I :	Dr. Hasan Rachmah M
Penguji II :	Prof. Dr. Arah S, MS
Penguji III :	Dr. Hani Mita

“Pertolonganku ialah dari Tuhan, yang menjadikan langit dan bumi.
Ia takkan membiarkan kakimu goyah, Penjagamu tidak akan terlelap.”

- Mazmur 121: 2-3 –



Skripsi ini dipersembahkan bagi kemuliaan Allah Bapa di surga, serta papa dan mama tercinta (Rhamses Hasibuan dan Khong, Ruth Yenny Muliawati).

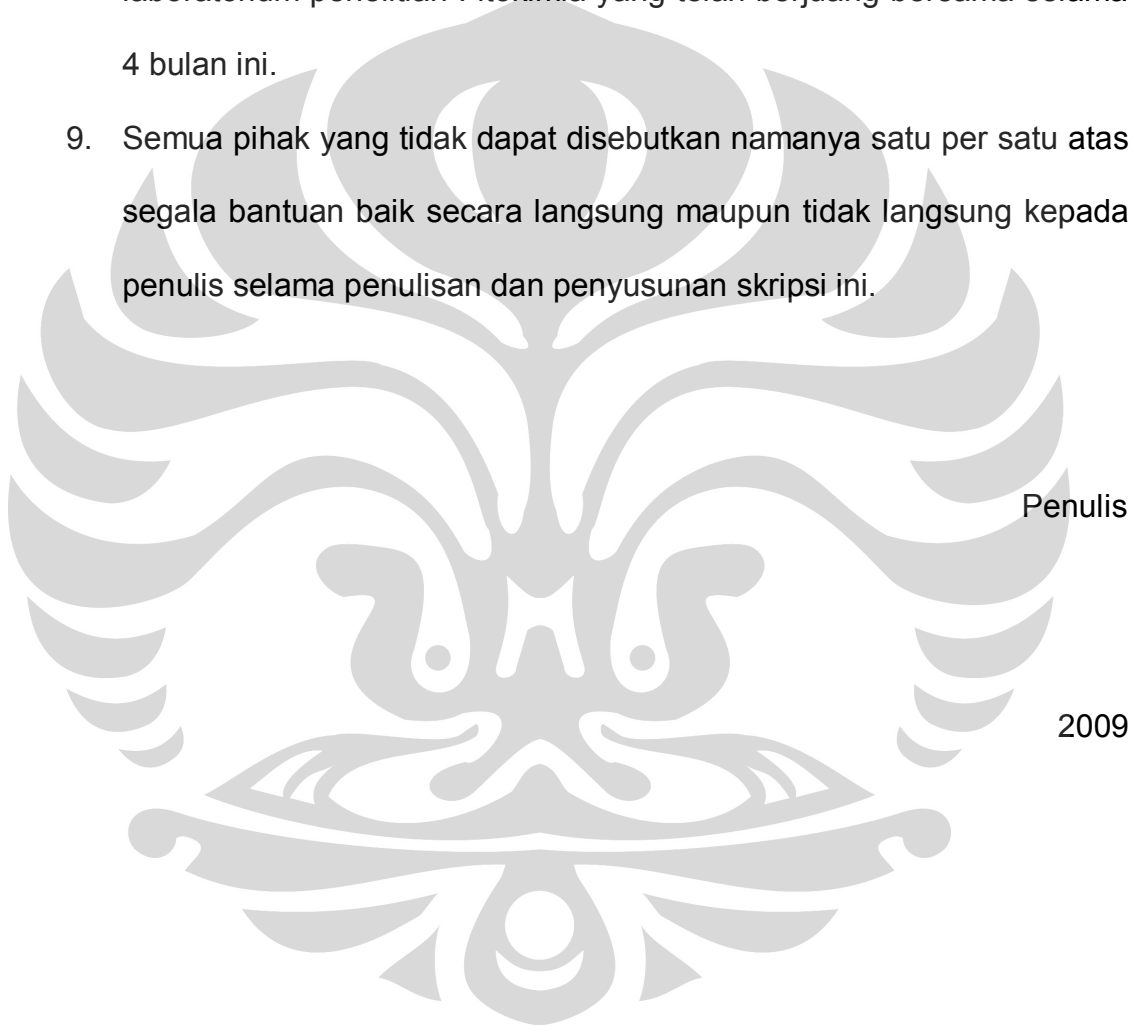
KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala berkat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini.

Dalam kesempatan ini, penulis dengan segala kerendahan hati menghaturkan rasa hormat dan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Abdul Mun'im, MSi, selaku Pembimbing I dan Ibu Dr. Katrin, MS, selaku Pembimbing II, yang dengan sabar telah membimbing, memberikan saran, dan bantuan serta motivasi selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
2. Ibu Dr. Amarila Malik Apt., MSi, selaku Pembimbing Akademik, yang telah memberikan perhatian, saran, dan bimbingan akademik selama ini.
3. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku ketua Departemen Farmasi atas bantuan dan dukungannya selama ini.
4. Ibu Dr. Berna Elya, MSi, selaku Koordinator Pendidikan atas segala bantuan, nasihat, motivasi, dan dukungannya selama ini.
5. Seluruh staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI, yang telah membimbing penulis selama 4 tahun ini.
6. Mas Agus, Pak Rustam, dan Mbak Ulfa yang telah banyak membantu penulis selama pengerjaan penelitian ini.

7. Papa, Mama, dan adikku tersayang yang selalu memberikan semangat, doa, kasih sayang, perhatian kepada penulis selama penelitian berlangsung.
8. Teman-teman Farmasi angkatan 2005 terutama yang bekerja di laboratorium penelitian Fitokimia yang telah berjuang bersama selama 4 bulan ini.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu per satu atas segala bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung kepada penulis selama penulisan dan penyusunan skripsi ini.



ABSTRAK

Ekstrak *Andrographis paniculata* dan *Curcuma domestica* mempunyai banyak aktivitas farmakologi sehingga sudah mulai dikembangkan produk sediaan herbal yang mengandung campuran ekstrak herbal tersebut. Oleh sebab itu, perlu dikembangkan suatu metode kontrol kualitas untuk menjamin efek terapi yang konsisten dari sediaan tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi optimum untuk analisis kuantitatif senyawa aktif campuran ekstrak herbal tersebut secara simultan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis densitometri. Senyawa yang ditetapkan kadarnya adalah andrografolid dan kurkuminoid. Hasil penelitian menunjukkan fase gerak terbaik adalah kloroform-metanol (9:1). Metode ini mempunyai linearitas, presisi, dan perolehan kembali yang cukup baik. Batas deteksi andrografolid dan kurkuminoid adalah 79,54 ng dan 390,69 ng. Batas kuantitasi andrografolid dan kurkuminoid adalah 265,13 ng dan 1.302,29 ng.

Kata kunci : *Andrographis paniculata*, *Curcuma domestica*, andrografolid, kurkuminoid, kromatografi lapis tipis densitometri

x + 97 hlm.: gbr.; lamp.; tab.

Bibliografi: 36 (1970-2009)

ABSTRACT

Andrographis paniculata and *Curcuma domestica* extracts have various pharmacological activities so that many herbal medicinal preparation contain the mixtures of these extracts. Therefore, it is necessary to develop a quality control method in order to ensure its consistent therapeutic effect. This research tried to find optimum condition for quantitative analysis of bioactive compounds in these herbal mixtures simultaneously using thin layer chromatography densitometry method. Those compounds are andrographolide and curcuminoid. The result showed that chloroform-methanol (9:1) is the best mobile phase. This method has quite good linearity, precision, and recovery. The limit of detection for andrographolide and curcuminoid are 79,54 ng and 390,69 ng. The limit of quantitation for andrographolide and curcuminoid are 265,13 ng and 1.302,29 ng.

Keyword: *Andrographis paniculata*, *Curcuma domestica*, andrographolide, curcuminoid, thin layer chromatography densitometry

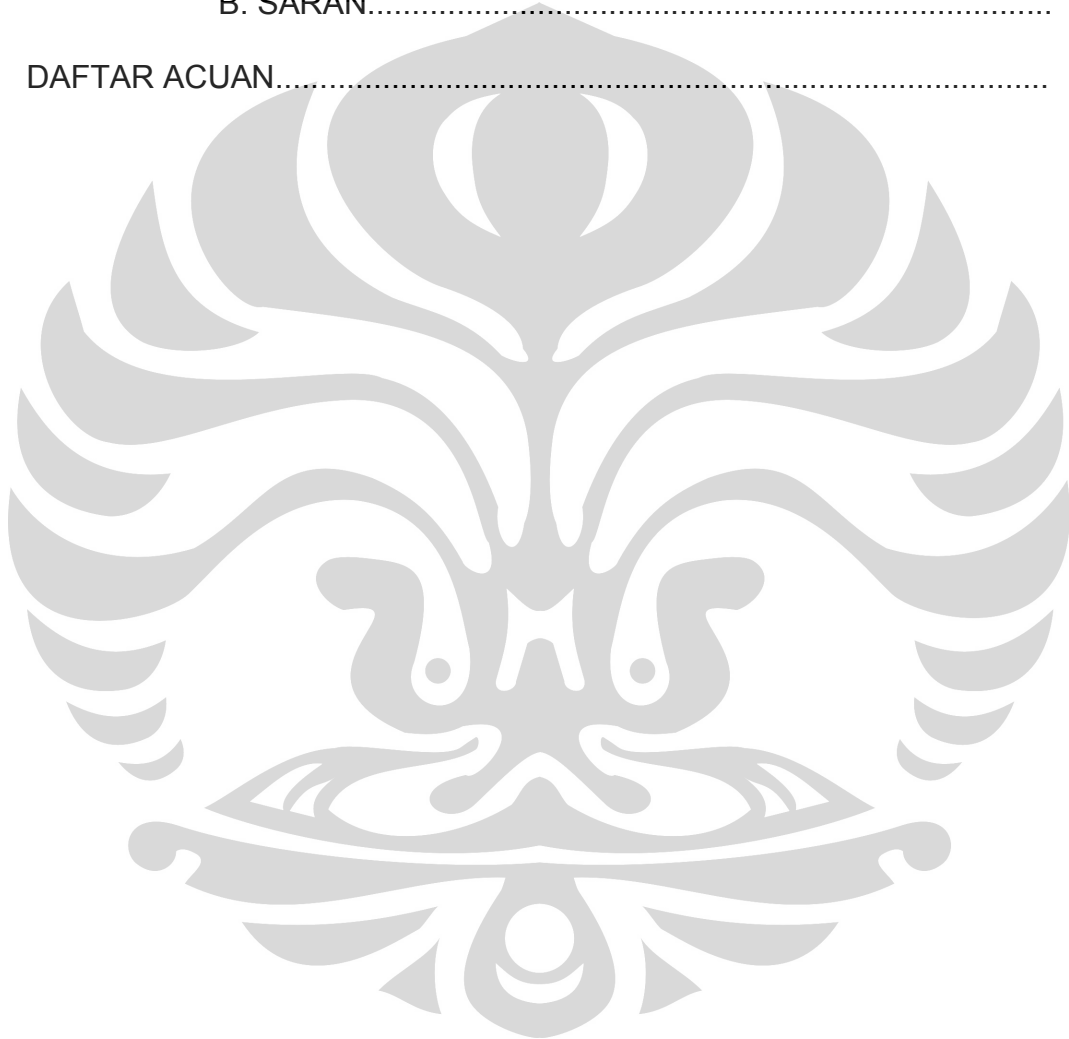
x + 97 pages: pic.; app.; tab.

Bibliography: 36 (1970-2009)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. TUJUAN PENELITIAN.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. <i>ANDROGRAPHIS PANICULATA</i> DAN ANDROGRAFOLID.....	5
B. <i>CURCUMA DOMESTICA</i> DAN KURKUMINOID.....	12
C. KROMATOGRAFI.....	18
D. VALIDASI METODE ANALISIS.....	22
BAB III BAHAN DAN CARA KERJA.....	27
A. LOKASI.....	27
B. BAHAN DAN ALAT.....	27
C. CARA KERJA.....	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37

	A. HASIL.....	37
	B. PEMBAHASAN.....	41
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
	A. KESIMPULAN.....	51
	B. SARAN.....	51
DAFTAR ACUAN.....		53



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Molekul Andrografolid dan Turunannya.....	8
2. Struktur Molekul Kurkumin, Demetoksikurkumin, dan Bisdemetoksikurkumin.....	15
3. Tautomerisasi Bentuk Keto-Enol Kurkumin.....	16
4. Tanaman herba sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i>).....	59
5. Tanaman kunyit (<i>Curcuma domestica</i>).....	59
6. a. Kurva serapan larutan andrografolid 20 ppm.....	60
b. Kurva serapan bercak andrografolid.....	60
7. a. Kurva serapan larutan kurkumin 2 ppm.....	61
b. Kurva serapan bercak kurkumin.....	61
8. Densitogram baku kurkuminoid 600 ng pada panjang gelombang 428 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1).....	62
9. Densitogram baku andrografolid 250 ng pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1).....	62
10. Densitogram sampel campuran ekstrak <i>A. paniculata</i> dan <i>C. domestica</i> pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1).....	63
11. Densitogram sampel campuran ekstrak <i>A. paniculata</i> dan <i>C. domestica</i> pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak diklormetan-metanol (9,5:0,5).....	64
12. Kurva kalibrasi andrografolid.....	65
13. Kurva kalibrasi kurkuminoid.....	65

14. Pola kromatogram sampel campuran ekstrak <i>A. paniculata</i> dan <i>C. domestica</i> dengan baku pembanding andrografolid dan kurkuminoid menggunakan penyemprot campuran asam asetat glasial-asam sulfat pekat-anisaldehyd (100:2:1).....	66
15. Densitogram baku andrografolid pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1).....	67
16. Densitogram baku kurkuminoid pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1).....	67
17. Densitogram sampel tunggal ekstrak <i>A. paniculata</i> pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1).....	68
18. Densitogram sampel campuran ekstrak <i>A. paniculata</i> dan <i>C. domestica</i> pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1).....	69
19. Kurva serapan bercak senyawa tidak dikenal Y yang terdapat pada sampel tunggal ekstrak andrografolid dan sampel campuran ekstrak <i>A. paniculata</i> dan <i>C. domestica</i>	70
20. Kurva serapan bercak senyawa tidak dikenal X yang terdapat pada sampel tunggal ekstrak andrografolid	70

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data Rf pada beberapa macam fase gerak.....	73
2. Linearitas Andrografolid.....	74
3. Linearitas Kurkuminoid Total.....	75
4. Linearitas Kurkumin.....	76
5. Linearitas Demetoksikurkumin.....	77
6. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Andrografolid.....	78
7. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Kurkuminoid.....	79
8. Keterulangan Andrografolid.....	80
9. Keterulangan Kurkuminoid.....	81
10. Penetapan Kadar Andrografolid dalam Campuran.....	82
11. Penetapan Kadar Kurkuminoid dalam Campuran.....	83
12. Uji Perolehan Kembali Andrografolid.....	84
13. Uji Perolehan Kembali Kurkuminoid.....	85

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Beberapa Contoh Sediaan Herbal yang Mengandung Ekstrak <i>A. paniculata</i> dan <i>C. domestica</i> / <i>C. longa</i> serta <i>Curcuma sp.</i> lainnya.....	89
2. Perhitungan Kurva Kalibrasi.....	91
3. Perhitungan Batas Deteksi dan Kuantitasi.....	92
4. Perhitungan Nilai Keterulangan.....	93
5. Perhitungan Kadar dan Perolehan Kembali.....	94
6. Sertifikat Analisis Ekstrak <i>Andrographis paniculata</i>	95
7. Sertifikat Analisis Ekstrak <i>Curcuma domestica</i>	96
8. Sertifikat Analisis Kurkuminoid Standar (Merck).....	97

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Andrographis paniculata Nees atau yang biasa dikenal dengan sambiloto merupakan tanaman obat yang telah digunakan selama berabad-abad dalam pengobatan tradisional. Aktivitas farmakologi tanaman ini sangat bervariasi, antara lain sebagai antiinflamasi, hepatoprotektor, antivirus, anti kanker, antitrombotik, imunostimulan, antihipertensi, serta memiliki aktivitas antihiperlipidemia yang telah teruji secara *in vivo*. Senyawa aktif yang sekaligus merupakan senyawa utama dan menjadi identitas tanaman ini berasal dari golongan terpenoid, yaitu andrografolid (1,2).

Begitu banyak khasiat dari andrografolid sehingga saat ini sudah banyak beredar produk herbal, baik produk lokal maupun produk luar negeri, yang mengandung ekstrak *A. paniculata*. Di luar dan dalam negeri, sediaan yang mengandung ekstrak *A. paniculata* sudah dibuat dalam bentuk tablet maupun obat suntik (3).

Beberapa di antara sediaan herbal ekstrak *A. paniculata* tersebut dibuat dalam bentuk campuran dengan tanaman obat lain seperti *Curcuma xanthorrhiza* (temu lawak), *Curcuma zedoaria* (temu putih), dan *Curcuma domestica* (kunyit), yang mempunyai kandungan zat aktif kurkuminoid, meliputi kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin.

Kurkuminoid, terutama kurkumin, telah dikenal mempunyai berbagai aktivitas biologi seperti antioksidan, antiinflamasi, antidispepsia, dan antikanker (4,5). Tujuan mengombinasikan ekstrak *A. paniculata* dengan ekstrak tanaman lain seperti *Curcuma sp.* adalah untuk meningkatkan khasiatnya.

Di Indonesia, sediaan yang mengandung campuran ekstrak *A. paniculata* dan *Curcuma sp.* telah dikembangkan untuk berbagai indikasi seperti hepatitis, tumor, dan kanker. Produk obat herbal lain yang mengandung campuran ekstrak tersebut juga ada yang diindikasikan sebagai hepatoprotektor, yaitu untuk melindungi hati dari toksin berbahaya yang dapat merusak dan mengganggu fungsi hati. Selain itu, terdapat pula sediaan kombinasi ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica* yang telah dikembangkan sebagai imunostimulan dalam bentuk kapsul.

Melihat semakin luasnya penggunaan sediaan kombinasi ekstrak *A. paniculata* dan berbagai jenis *Curcuma* maka diperlukan adanya kontrol kualitas yang dapat menjamin efek terapi yang konsisten dari sediaan tersebut. Metode analisis yang tepat dan efisien perlu dikembangkan untuk menetapkan kadar zat aktif yang menjadi marker dalam sediaan tersebut, yaitu andrografolid dan kurkuminoid, sehingga dapat dilakukan kontrol kualitas (6). Selama ini, metode yang telah ada hanya ditujukan untuk penetapan kadar kurkuminoid atau andrografolid saja. Oleh sebab itu, perlu dilakukan optimasi penetapan kadar andrografolid dan kurkuminoid secara simultan sehingga dapat meningkatkan efisiensi pada kontrol kualitas sediaan yang mengandung andrografolid dan kurkuminoid.

Analisis kadar andrografolid dan kurkuminoid dalam ekstrak maupun sediaan herbal dapat menggunakan beberapa metode analisis kuantitatif, salah satunya adalah kromatografi lapis tipis densitometri. Metode analisis ini mudah, sensitif, dan teliti (2). Akan tetapi, perlu dilakukan optimasi komposisi fase gerak yang sesuai untuk memisahkan masing-masing komponen yang terkandung dalam campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica*. Dari penelitian terdahulu, komposisi fase gerak yang digunakan untuk analisis andrografolid adalah kloroform-metanol dengan perbandingan 9:1 dan 8:2 serta kloroform-toluena-metanol dengan perbandingan 6:2,5:1,5 dan komposisi fase gerak untuk analisis kurkuminoid adalah diklormetan-metanol dengan perbandingan 9,9:0,1 dan 9,5:0,5, kloroform-metanol dengan perbandingan 9,25:0,75 dan 9,8:0,2, serta heksan-kloroform-metanol dengan perbandingan 1:1:0,1 (2,7,8,9,10,11,12,13). Banyaknya senyawa aktif yang terkandung dalam campuran ekstrak tersebut merupakan salah satu permasalahan dalam analisis kuantitatifnya. Oleh sebab itu, pada penelitian ini digunakan metode kromatografi lapis tipis densitometri untuk analisis kuantitatif campuran ekstrak tersebut karena metode ini mempunyai kemampuan pemisahan yang baik. Diharapkan melalui penggunaan metode kromatografi lapis tipis densitometri dengan fase gerak yang tepat dapat diperoleh pemisahan yang baik dari komponen-komponen senyawa aktif dalam ekstrak tersebut, sehingga kadar kurkuminoid maupun andrografolid dapat ditetapkan secara tepat untuk kontrol kualitas sediaan campuran herbal *A. paniculata* dan *C. domestica*.

B. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi optimum untuk analisis kuantitatif andrografolid dan kurkuminoid secara simultan dengan metode KLT-densitometri sehingga dapat digunakan untuk kontrol kualitas pada sediaan yang mengandung campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica*.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. ANDROGRAPHIS PANICULATA DAN ANDROGRAFOLID

1. *Andrographis paniculata*

Andrographis merupakan salah satu genus dalam famili Acanthaceae yang terdiri dari sekitar 40 spesies. Beberapa di antaranya sudah banyak digunakan dalam pengobatan tradisional. Salah satunya adalah *Andrographis paniculata* yang telah banyak digunakan dalam pengobatan tradisional di Cina, India, Thailand, Indonesia, Malaysia, Jepang, dan Skandinavia untuk berbagai indikasi (14,15). Tanaman *A. paniculata* tumbuh dan tersebar di seluruh kepulauan Indonesia. Tanaman ini tumbuh pada ketinggian tempat 1-700 meter di atas permukaan laut (16).

a. Klasifikasi

Berikut adalah sistematika tanaman *A. paniculata* menurut sistem Cronquist (17):

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Subkelas : Asteridae

Bangsa : Scrophulariales

Suku : Acanthaceae

Marga : Andrographis

Jenis : *Andrographis paniculata* Nees

b. Morfologi

A. paniculata merupakan herba tahunan yang tumbuh tegak lurus dengan tinggi 1 m. Tanaman ini memiliki batang berbentuk segiempat dan bercabang banyak. Bagian daun berbentuk lanset dengan pangkal lancip dan bagian tepi yang rata. Panjang daun 2-12 cm dan lebar 1-3 cm. Bagian bunga berukuran kecil dan berwarna putih dengan bercak ungu-kemerahan pada bagian daun bunga. Selain itu, tanaman *A. paniculata* memiliki banyak biji berukuran kecil dan berwarna coklat kekuningan (5,15). Gambar tanaman *A. paniculata* dapat dilihat pada Gambar 4.

c. Kandungan Kimia

Kandungan kimia yang terdapat dalam *A. paniculata* antara lain diterpenoid, flavonoid, dan stigmasterol. Senyawa utama yang terkandung dalam tanaman ini memiliki struktur dasar lakton diterpen. Senyawa-senyawa tersebut meliputi andrografolid, neoandrografolid, 14-deoksi-11,12-didehidroandrografolid, dan andrografisid. Senyawa-senyawa diterpen inilah yang dapat

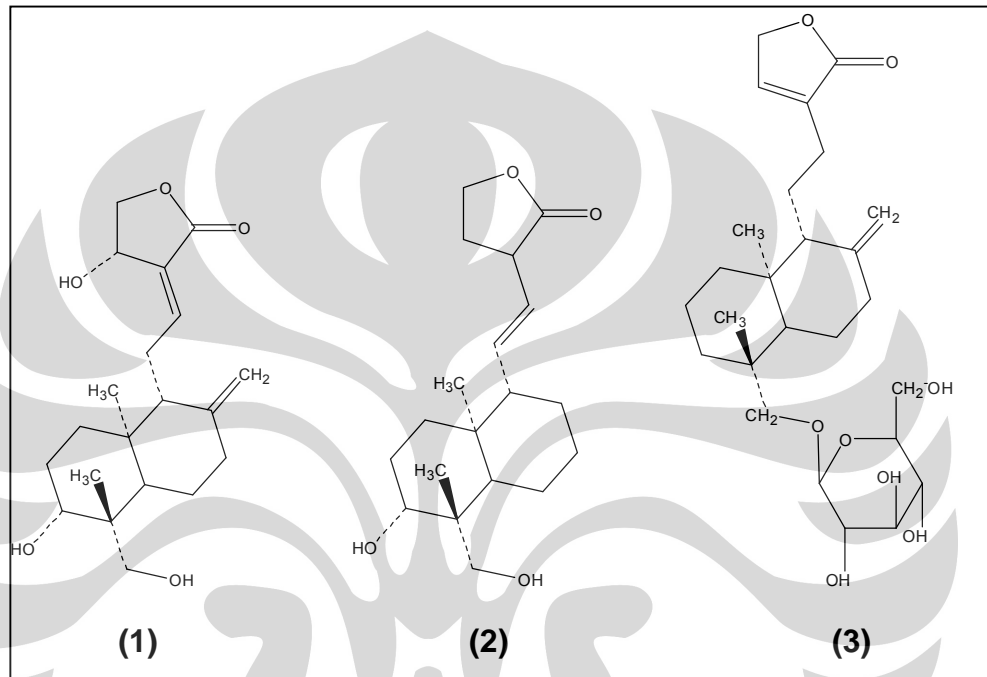
digunakan sebagai marker pada kontrol kualitas ekstrak *A. paniculata* (1,7). Spesifikasi kualitas Andrographidis Herba menurut buku Standard of ASEAN Herbal Medicine dinyatakan mengandung tidak kurang dari 6 % total lakton, dihitung sebagai andrografolid (18).

d. Metode Ekstraksi

Berdasarkan literatur, bagian tanaman *A. paniculata* yang dapat digunakan sebagai obat adalah seluruh bagian tanaman (Andrographidis Herba) atau bagian daun saja yang paling banyak mengandung andrografolid. Kandungan andrografolid tertinggi terdapat pada bagian daun yaitu 2,39 %, dan terendah pada bagian biji (19). Ekstraksi *A. paniculata* dapat dilakukan dengan berbagai cara ekstraksi, baik maserasi, soxhletasi, refluks maupun dengan menggunakan *supercritical carbon dioxide* (2,8,14,20). Menurut buku "Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia", ekstraksi *A. paniculata* dengan cara maserasi dapat menghasilkan tidak kurang dari 9,6 % ekstrak kental. Ekstrak itu sendiri mengandung tidak kurang dari 19,8 % andrografolid (18).

Berdasarkan penelitian terdahulu, pelarut yang paling efisien untuk mengekstraksi andrografolid dan turunannya adalah metanol dibandingkan dengan kloroform, etil asetat, dan etanol 95% (7).

Dalam ekstrak metanol juga dapat ditemukan senyawa-senyawa flavonoid yang bersifat polar (14). Pada proses fraksinasi selanjutnya akan diperoleh kadar optimum andrografolid pada fraksi diklormetan atau kloroform (1).



Gambar 1. Struktur Molekul Andrografolid dan Turunannya (21,22)

Keterangan:

- (1) Andrografolid
- (2) Deoksiandrografolid
- (3) Neoandrografolid

2. Andrografolid

a. Identitas dan Data Fisikokimia

Andrografolid merupakan senyawa identitas sekaligus senyawa aktif utama yang terdapat pada seluruh bagian tanaman *A. paniculata*. Andrografolid mempunyai rumus molekul $C_{20}H_{30}O_5$.

Andrografolid berupa serbuk berwarna putih dengan sedikit keabuan atau kekuningan, memiliki rasa yang sangat pahit, serta titik leleh sekitar 218 °C. Andrografolid cukup larut dalam air, aseton, metanol, kloroform, dan eter. Larutan andrografolid dalam etanol mempunyai panjang gelombang maksimum 223 nm. Andrografolid dan neoandrografolid terdekomposisi dengan cepat pada penyimpanan lama (16,22).

b. Aktivitas Farmakologi dan Penggunaan

Andrografolid memiliki berbagai aktivitas farmakologi antara lain aktivitas hepatoprotektor, imunostimulan, antinflamasi, antimalaria, kardiovaskular, hipoglikemik, depresan sistem saraf pusat, antidiare, antifertilitas, dan aktivitas terhadap saluran pernafasan. Andrografolid telah diteliti secara *in vivo* pada tikus dan manusia dapat mencegah kerusakan hati yang diinduksi oleh karbon tetraklorida. Pada pemberian 861,3 mg/kg berat badan ekstrak metanol *A. paniculata* secara intraperitoneal pada tikus menunjukkan penurunan hepatotoksisitas yang diinduksi karbon tetraklorida (CCl₄) dan memulihkan perubahan histopatologi yang diinduksi karbon tetraklorida (15).

Sebagai imunostimulan, andrografolid diketahui efektif untuk berbagai jenis infeksi, termasuk infeksi virus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) dan sel kanker melalui 2 mekanisme,

yaitu respon imun spesifik dan nonspesifik. Hasil uji klinis fase I pada 13 penderita HIV menunjukkan peningkatan CD4(+) yang signifikan setelah pemberian andrografolid dengan dosis 5 mg/kg berat badan selama 3 minggu lalu dilanjutkan dengan 10 mg/kg berat badan selama 3 minggu berikutnya dan 20 mg/kg berat badan pada 3 minggu terakhir. Aktivitas antikanker andrografolid juga telah diuji secara *in vitro* (15,23).

Andrografolid juga memiliki aktifitas antiinflamasi. Data uji pra klinis pada tikus menunjukkan aktivitas andrografolid pada dosis 300 mg/kg berat badan setara dengan aspirin pada dosis yang sama. Salah satu mekanisme antiinflamasi andrografolid yaitu melalui penurunan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2). Selain itu, andrografolid juga memiliki aktifitas pada sistem kardiovaskular. Senyawa ini dapat mencegah terjadinya atherosklerosis melalui berbagai mekanisme. Andrografolid juga diketahui mempunyai efek antifertilitas pada penelitian *in vivo* sehingga penggunaannya sebaiknya dihindari pada saat kehamilan (14,16,23).

Di dalam tubuh manusia, andrografolid mengalami absorpsi secara cepat dan mengalami metabolisme dalam jumlah besar. Senyawa ini dieliminasi dari tubuh sebanyak 90% dalam waktu 48 jam. Ada berbagai macam hasil metabolisme andrografolid, di antaranya berada dalam bentuk konjugasi dengan glukoronida dan asam sulfonat (15).

Dalam pengobatan tradisional Cina, Thailand, dan India, penggunaan *A. paniculata* sebagai obat herbal telah dikenal aman. Satu kasus shok anafilaktik pernah dilaporkan kepada *World Health Organization* (WHO). Selain itu, berdasarkan hasil uji, efek samping dari herbal ini antara lain reaksi alergi, kelelahan, sakit kepala, mual, dan lain-lain yang hanya bersifat ringan dan jarang terjadi (15).

Ekstrak *A. paniculata* telah banyak digunakan dalam berbagai campuran dengan beberapa ekstrak tanaman obat lain, termasuk dengan ekstrak *Curcuma domestica*. Beberapa industri jamu terkenal juga telah memanfaatkan penggunaan kedua campuran ekstrak tersebut dengan herbal lain. Beberapa contoh penggunaan campuran ekstrak tersebut dapat dilihat pada Lampiran 1.

c. Metode Analisis Andrografolid dan Turunannya

Kadar andrografolid dan turunannya yang merupakan marker dalam sediaan herbal *Andrographis paniculata* dapat ditentukan dengan berbagai metode analisis. Metode yang dapat digunakan antara lain dengan kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (HPTLC/*High Performance Thin Layer Chromatography*), kromatografi kolom (HPLC/*High Performance Liquid Chromatography*),

spektrofotometri, gravimetri, kolorimetri, titrimetri, dan *micellar electrokinetic capillary* (MEKC) (7,24).

Di antara semua metode tersebut, kromatografi lapis tipis densitometri merupakan metode pilihan karena mudah dilakukan, tidak menghabiskan banyak waktu, sensitif, dan mempunyai ketelitian yang tinggi. Selain itu, dengan metode ini dapat dilakukan isolasi sekaligus pemisahan andrografolid dan senyawa-senyawa turunannya (2,25).

Pada penelitian terdahulu, untuk analisis andrografolid dan turunannya dengan kromatografi lapis tipis dapat digunakan fase gerak kloroform-toluena-metanol dengan perbandingan 6:2,5:1,5. Dari penelitian tersebut diperoleh pemisahan yang baik dari keempat komponen utama ekstrak *A. paniculata* yaitu 14-deoksi-11,12-didehidroandrografolid, andrografolid, neoandrografolid, dan andrografisid dengan nilai Rf masing-masing 0,67; 0,57; 0,42; dan 0,15 (7). Selain itu, dapat pula digunakan fase gerak kloroform-metanol dengan perbandingan 9:1 atau 8:2 (2,8).

B. CURCUMA DOMESTICA DAN KURKUMINOID

1. *Curcuma domestica*

Curcuma domestica merupakan salah satu spesies dalam genus *Curcuma*. Tanaman genus ini mudah tumbuh dan banyak

tersebar di Indonesia (4,26). Rimpang *C. domestica* telah banyak digunakan dalam pengobatan tradisional.

a. Klasifikasi

Berikut adalah sistematika dari tanaman *Curcuma domestica* menurut sistem Cronquist (17):

Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Liliopsida
Subkelas : Zingiberidae
Bangsa : Zingiberales
Suku : Zingiberaceae
Marga : *Curcuma*
Jenis : *Curcuma domestica* VAL.

b. Morfologi

Tanaman *C. domestica* merupakan herba yang tumbuh dengan tinggi lebih dari 1 m. Tanaman ini memiliki rimpang berwarna jingga. Bagian rimpang utama berbentuk bulat telur dengan ukuran diameter 3 cm dan panjang 4 cm. Bagian rimpang cabang berukuran 1 cm x 2-6 cm dengan bentuk sedikit bengkok. Bagian daun berbentuk lanset dan berwarna hijau. Panjang daun lebih dari 50 cm dan lebar 7-25 cm. Tanaman ini juga memiliki

bunga berwarna kuning pucat dengan panjang sekitar 5 cm (5).

Gambar tanaman kunyit dapat dilihat pada Gambar 5.

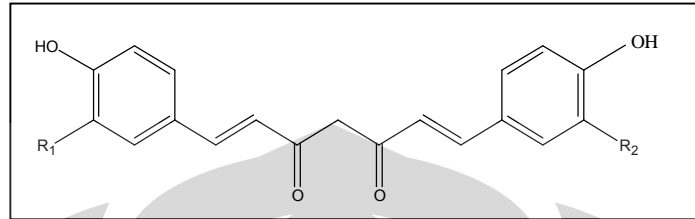
c. Kandungan Kimia

Kurkuminoid merupakan kandungan kimia yang menjadi senyawa identitas pada *Curcuma domestica* dan berbagai jenis *Curcuma* lainnya. Kadar kurkuminoid pada tiap jenis *Curcuma* berbeda-beda. Pada *C. domestica* atau kunyit, kadar kurkuminoid sekitar 3-5 % yang tersusun dari campuran kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin. Selain kurkuminoid, kandungan kimia lain yang juga terdapat pada *Curcuma sp.* antara lain minyak atsiri (3-5% pada *C. domestica* dan 6-11% pada *C. xanthorrhiza*) yang tersusun dari berbagai jenis seskui-terpen (27,28,29).

2. Kurkuminoid

Kurkuminoid merupakan senyawa fenol yang berasal dari rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) atau *Curcuma sp.* lainnya. Senyawa-senyawa yang termasuk dalam golongan kurkuminoid meliputi kurkumin, demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin. Senyawa-senyawa tersebut banyak terdapat dalam rimpang *Curcuma sp.* (4).

Kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin berbeda dalam hal polaritasnya. Hal ini disebabkan karena perbedaan struktur yaitu pada jumlah gugus hidroksi.



Gambar 2. Struktur Molekul Kurkumin, Demetoksikurkumin, dan Bisdemetoksikurkumin (22,27)

Keterangan:

R1 = R2 = OCH3 : kurkumin
 R1 = OCH3, R2 = H : demetoksikurkumin
 R1 = R2 = H : bisdemetoksikurkumin

a. Identitas dan Data Fisikokimia

Kurkumin mempunyai rumus molekul $C_{21}H_{20}O_6$ dan berat molekul 368.4. Senyawa ini berupa serbuk kristalin berwarna jingga-coklat dengan titik leleh $183\text{ }^{\circ}\text{C}$. Panjang gelombang maksimal kurkumin dalam larutan metanol adalah 430 nm.

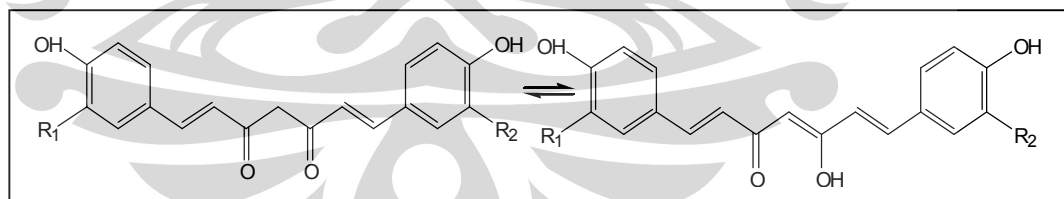
Demetoksikurkumin mempunyai rumus molekul $C_{20}H_{18}O_5$ dan berat molekul 338. Bisdemetoksikurkumin memiliki rumus molekul $C_{19}H_{16}O_4$ dan berat molekul 308 (22,27).

Kurkumin bersifat sensitif terhadap cahaya dan lingkungan alkalis namun cukup stabil terhadap panas dan dalam suasana asam. Dalam lingkungan basa kurkumin dapat mengalami degradasi membentuk asam ferulat dan feruloilmetan.

Feruloilmetan selanjutnya akan membentuk produk kondensasi yang berwarna kuning kecoklatan. Perubahan warna tersebut merupakan indikasi terjadinya degradasi kurkumin (27).

Kurkumin bersifat larut dalam lemak dan pelarut organik, tetapi tidak larut dalam air. Oleh sebab itu, untuk memperluas penggunaannya telah dilakukan berbagai usaha untuk meningkatkan kelarutannya dalam air, seperti membuat kompleks kurkumin dengan tembaga, memodifikasi dalam bentuk emulsi menggunakan berbagai macam surfaktan (contoh: *sodium dodecyl sulfate*, *cetylpyridinium bromide*, gelatin, polisakarida, polietilen-glikol, siklodekstrin), dan membuat nanopartikel dengan pembawa PAMAM dendrimer (4,30,31).

Dalam larutan, kurkumin dapat mengalami tautomerisasi bentuk keto-enol. Namun sebagian besar akan berada dalam bentuk enol yaitu di atas 95% (27).



Gambar 3. Tautomerisasi Bentuk Keto-Enol Kurkumin (27)

b. Aktivitas Farmakologi dan Penggunaan

Kurkumin mempunyai berbagai aktivitas farmakologi, antara lain sebagai antiinflamasi, antioksidan, antikanker, dan antivirus,

termasuk untuk virus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*). Dosis terapi yang umum digunakan untuk orang dewasa 1,5-3 g/hari dalam bentuk ekstrak atau sediaan herbal. Sebagai antiinflamasi dengan mekanisme penghambatan enzim siklooksigenase-2 (COX-2), efek kurkumin dengan dosis 1.200 mg setara dengan efek 300 mg fenilbutason. Sedangkan pada dosis yang lebih rendah, yaitu 20 mg, kurkumin dapat menurunkan kadar serum lipid peroksida. Data uji pra klinis pada tikus juga menunjukkan efek peningkatan sekresi empedu pada pemberian ekstrak kunyit dengan dosis 300 mg/kg berat badan. Selain itu, kurkumin telah diteliti mampu menghambat enzim HIV-integrase dengan nilai IC_{50} sebesar 40 μ M. Kurkumin relatif aman dikonsumsi tanpa menyebabkan toksisitas pada kadar di atas 10 g/hari (29,30,31,32).

c. Metode Analisis Kurkuminoid

Kadar kurkuminoid dalam ekstrak maupun sediaan dapat ditentukan dengan menggunakan berbagai macam metode analisis. Metode analisis yang dapat digunakan antara lain kromatografi kolom kinerja tinggi, kromatografi lapis tipis, spektrofotometri, dan *micellar electrokinetic capillary* (MEKC). Metode kromatografi lapis tipis merupakan salah satu metode pilihan untuk analisis kurkuminoid dalam bentuk ruahan maupun

dalam suatu formulasi karena bersifat selektif, teliti, dan mudah dilakukan (5,30).

Berdasarkan penelitian terdahulu, analisis kurkuminoid secara simultan dengan kromatografi lapis tipis dapat menggunakan fase gerak diklormetan-metanol dengan perbandingan 9,9:0,1 dan 9,5:0,5. Peneliti lain menyebutkan komposisi fase gerak yang dapat pula digunakan adalah kloroform-metanol dengan perbandingan 9,25:0,75 dan 9,8:0,2. Dari hasil penelitian dengan menggunakan fase gerak kloroform-metanol (9,25:0,75) diperoleh Rf kurkumin sebesar $0,48 \pm 0,02$. Hasil penelitian terbaru juga menyatakan komposisi fase gerak yang dapat digunakan untuk analisis kurkuminoid secara simultan adalah heksan-kloroform-metanol dengan perbandingan 1:1:0,1 (9,10,11,12,13).

C. KROMATOGRAFI

1. Kromatografi

Kromatografi secara umum adalah metode pemisahan suatu campuran ke dalam komponen-komponen yang berbeda berdasarkan kesetimbangan distribusi masing-masing komponen selama pengaliran fase gerak melalui fase diam. Fase diam dapat berupa padatan atau cairan. Sedangkan fase gerak dapat berupa cairan atau gas. Berdasarkan perbedaan bentuk fase diam dan fase gerak tersebut,

maka kromatografi dapat diklasifikasikan sebagai kromatografi cair-padat, cair-cair, padat-gas, dan cair-gas (25).

Kromatografi dapat digunakan baik untuk pemisahan maupun pemurnian suatu komponen tumbuhan. Pemisahan komponen-komponen dalam kromatografi terjadi karena perbedaan kecepatan migrasi dari masing-masing komponen. Kecepatan migrasi yang berbeda terjadi akibat distribusi kesetimbangan yang berbeda. Semakin besar perbedaan kecepatan migrasi tiap komponen, maka pemisahan semakin baik (33).

Beberapa teknik kromatografi yang umum digunakan antara lain kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi kolom. Untuk tujuan kuantitatif dapat digunakan kromatografi cair kinerja tinggi, kromatografi lapis tipis densitometri, dan kromatografi gas.

2. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah teknik kromatografi yang menggunakan lapis tipis adsorben dengan ukuran seragam sebagai fase diam. Metode ini merupakan metode pemisahan yang paling populer dan digunakan secara luas karena mudah digunakan, sensitivitas tinggi, relatif murah, dan aplikasinya luas untuk berbagai jenis sampel. Selain itu, metode ini baik digunakan untuk pemisahan komponen ekstrak karena waktu preparasi lebih cepat, teliti, serta mempunyai ketajaman pemisahan yang baik (25,34).

Kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk pemisahan komponen dalam campuran, uji kemurnian sederhana, serta untuk tujuan identifikasi. Di samping itu, kromatografi lapis tipis dapat pula digunakan untuk tujuan kuantitatif jika dilengkapi dengan alat densitometer (25).

Pada kromatografi lapis tipis, fase diam yang digunakan berupa lapis tipis adsorben yang diaplikasikan pada suatu penyangga. Fase penyangga yang umum digunakan adalah lempeng kaca, lembaran plastik, dan aluminium foil. Sedangkan fase diam yang umum digunakan dalam kromatografi lapis tipis adalah silika gel, alumina, kieselguhr, dan selulosa. Silika gel merupakan adsorben yang paling banyak digunakan, berupa substansi amorf dan berpori serta bersifat sedikit asam. Mekanisme pemisahan oleh silika dipengaruhi oleh kandungan hidroksil pada permukaannya. Oleh sebab itu, kandungan gugus hidroksil (contohnya air) pada lempeng harus dijaga melalui proses aktivasi lempeng sebelum digunakan. Hal ini dilakukan agar pemisahan yang terjadi mempunyai keterulangan yang baik. Alumina atau aluminium oksida juga digunakan secara luas sebagai adsorben. Substansi ini secara kimia bersifat basa dan lebih reaktif dibandingkan silika. Kemampuan pemisahannya tidak sebaik silika. Kieselguhr secara kimia bersifat netral, namun kemampuan pemisahannya tidak sebaik silika dan alumina. Selulosa juga dapat digunakan sebagai adsorben dalam kromatografi lapis tipis (25).

Aplikasi sampel pada fase diam perlu diupayakan agar menghasilkan diameter totolan yang sekecil mungkin. Konsentrasi sampel yang diaplikasikan sebaiknya berkisar antara 0,01-1 % dalam pelarut yang sesuai. Konsentrasi sampel yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terbentuknya ekor pada bercak yang dihasilkan. Pelarut yang digunakan harus dapat melarutkan sampel dan sebaiknya bersifat sedikit kurang polar. Pelarut tersebut sebaiknya mudah menguap dan polaritasnya tidak terlalu tinggi karena jika tidak, maka dapat mempersulit eliminasi pelarut dari fase diam. Jika pelarut tertahan dalam fase diam maka akan mempengaruhi pemisahan (25,35).

Keberhasilan kromatografi lapis tipis tergantung pada pemilihan fase gerak yang dapat memberi pemisahan yang diinginkan. Pemilihan fase gerak dipengaruhi oleh sifat fisiko kimia senyawa yang dipisahkan yaitu jumlah dan jenis gugus fungsional senyawa tersebut. Selain itu, perlu diperhatikan pula kekuatan fase gerak yang digunakan karena dapat mempengaruhi interaksi antara sampel dengan fase gerak. Semakin kuat fase gerak, maka interaksi fase gerak terhadap sampel akan semakin kuat pula sehingga akan mengurangi adsorpsi dan mempercepat migrasi. Jika fase gerak yang digunakan mempunyai interaksi yang lebih kuat dengan sampel dibandingkan interaksi sampel dengan adsorben, maka pemisahan yang dihasilkan akan jelek (25).

Pemisahan pada kromatografi lapis tipis berdasarkan proses adsorpsi tiap komponen pada fase diam. Komponen-komponen dalam sampel akan mengalami migrasi dan menempuh jarak rambat yang berbeda tergantung afinitasnya terhadap adsorben. Dalam kromatografi lapis tipis akan diperoleh nilai R_f yaitu perbandingan jarak rambat yang dicapai oleh senyawa dengan jarak tempuh fase gerak pada kromatografi. Nilai R_f senyawa dapat dibandingkan dengan standar untuk identifikasi. Nilai R_f berkisar antara 0-0,999. Namun diharapkan nilai tersebut berada pada rentang 0,3-0,7 (25,33).

Deteksi bercak hasil fase gerakan kromatografi lapis tipis dapat dilakukan dengan beberapa metode, antara lain secara visual. Pengamatan langsung dapat dilakukan pada zat-zat berwarna atau dapat pula dengan menggunakan penampak bercak. Jika sampel dapat berfluoresensi maka pengamatan bercak dapat dilakukan di bawah UV (ultraviolet). Untuk tujuan kuantitatif, deteksi dilakukan dengan pemindaian menggunakan densitometer untuk mengukur rapat cahaya dan luas bercak (34).

D. VALIDASI METODE ANALISIS (36)

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Parameter-parameter tersebut meliputi kecermatan, keseksamaan, selek-

tivitas, linearitas, batas kuantitasi dan batas deteksi, serta ketangguhan dan kekuatan metode.

1. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali analit yang ditambahkan.

Kecermatan dapat ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit ditambahkan ke dalam sampel lalu dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya.

Metode penambahan baku atau adisi dilakukan bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo karena matriksnya tidak diketahui seperti obat-obatan paten, atau karena analitnya berupa suatu senyawa endogen misalnya metabolit sekunder pada kultur kalus.

Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Konsentrasi analit yang ditambahkan biasanya 80 % sampai 120 % dari kadar analit yang diperkirakan terdapat dalam sampel.

2. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relative (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analis yang berbeda pula.

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2 % atau kurang. Akan tetapi, kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium.

3. Selektivitas / Spesifisitas

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas metode analisis yang melibatkan kromatografi ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s).

4. Linearitas dan Rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

5. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

6. Ketangguhan Metode

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrument, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dll. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi normal antara lab dan antar analisis.

7. Kekuatan

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek pada presisi dan kecermatan.

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia dan Laboratorium Kimia Analisis Instrumen Departemen Farmasi FMIPA UI selama kurang lebih 4 bulan.

B. BAHAN DAN ALAT

1. Bahan

Ekstrak kering *Andrographis paniculata* 25 % (Phytochemindo), ekstrak kering *Curcuma domestica* 20 % (Phytochemindo), andrografolid baku (Universitas Andalas), kurkuminoid baku (Merck), lempeng silika gel 60F-254 ukuran 10x10 cm² (Merck), metanol, kloroform, diklormetan, toluena, anisaldehyd, asam asetat glasial, dan asam sulfat pekat.

2. Alat

KLT densitometer (*TLC Scanner 3 Camag*), komputer yang dilengkapi dengan program winCATS, Spektrofotometer UV-Vis (*Jasco V-530*), mikropipiler 2 µl dan 5 µl, Ultrasonik Bronson, alat

sentrifugasi, mikropipet (Soccorex), timbangan analitik, bejana KLT 10x10x5 cm³, alat-alat gelas.

C. CARA KERJA

1. Pembuatan Larutan Baku

a. Larutan Baku Andrografolid

Larutan baku andrografolid dengan konsentrasi 200 ppm dibuat dengan mengencerkan larutan baku andrografolid 1.000 ppm. Untuk membuat larutan baku andrografolid 1.000 ppm, ditimbang seksama kurang lebih 10 mg andrografolid baku lalu dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 10,0 ml.

b. Larutan Baku Kurkuminoid

Larutan baku kurkuminoid dengan konsentrasi 2.000 ppm dibuat dengan menimbang seksama kurang lebih 50 mg kurkuminoid baku lalu dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 25,0 ml.

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dengan Spektrofotometer

Larutan baku andrografolid 20 ppm dalam metanol dibuat dengan mengencerkan larutan baku andrografolid 100 ppm. Lalu dibuat kurva serapan larutan baku andrografolid pada panjang

gelombang 200-400 nm dengan menggunakan spektrofotometer. Dari kurva tersebut dapat ditentukan panjang gelombang maksimum andrografolid.

Untuk menentukan panjang gelombang maksimum kurkuminoid digunakan larutan baku dengan konsentrasi 2 ppm. Kurkuminoid baku ditimbang seksama kurang lebih 50 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 50,0 ml hingga diperoleh konsentrasi 1.000 ppm; larutan tersebut dipipet 1,0 ml ke dalam labu ukur 100,0 ml, lalu dicukupkan volumenya dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi 10 ppm. Selanjutnya dari larutan kurkuminoid baku 100 ppm dipipet 2,0 ml ke dalam labu ukur 10,0 ml, lalu dicukupkan volumenya dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi akhir 2 ppm. Lalu dibuat kurva serapan larutan baku kurkuminoid pada panjang gelombang 200-800 nm. Dari kurva tersebut dapat ditentukan panjang gelombang maksimum kurkuminoid.

3. Pemilihan Fase Gerak

Sampel ekstrak kering *Andrographis paniculata* ditimbang sejumlah 100 mg dan ekstrak kering *Curcuma domestica* ditimbang sejumlah 50 mg. Masing-masing sampel dilarutkan dalam 5 ml metanol dengan sonikasi selama 15 menit. Kemudian larutan sampel tersebut disentrifugasi selama 10 menit. Residu diekstraksi lagi sebanyak 2 kali dengan 5 ml metanol dan disentrifugasi. Supernatan

yang diperoleh digabungkan dan diencerkan dengan metanol hingga volume 25 ml. Untuk simulasi sediaan campuran, ditimbang sejumlah ekstrak kering *A. paniculata* dan ekstrak kering *C. domestica*, keduanya dicampur dengan perbandingan 1:1 dan digerus hingga homogen. Campuran ekstrak tersebut ditimbang sejumlah 100 mg. Kemudian dilarutkan dengan prosedur yang sama dengan sampel tunggal.

Larutan sampel tunggal *A. paniculata*, *C. domestica*, serta campuran keduanya tersebut ditotolkan 5 μ l pada lempeng kromatografi lapis tipis yang telah diaktivasi pada suhu 110°C selama 30 menit dengan jarak titik penotolan dari tepi bawah 10 mm dan jarak antar totolan 10 mm. Selain itu, ditotolkan pula larutan andrografolid dan kurkuminoid baku.

Untuk memperoleh pemisahan yang baik dilakukan percobaan menggunakan berbagai macam fase gerak, antara lain:

- a. Kloroform-metanol 9:1 (8)
- b. Kloroform-toluena-metanol 6:2,5:1,5 (7)
- c. Kloroform-metanol 8:2 (2)
- d. Kloroform-metanol 9,8:0,2 (10)
- e. Kloroform-metanol 9,2:0,8
- f. Diklormetan-metanol 9,5:0,5 (11)

Lempeng dikembangkan sejauh 80 mm di dalam bejana KLT yang telah dijenuhkan selama 2 jam. Setelah pengembangan selesai, lempeng diangkat dan dibiarkan mengering selama 5 menit. Hasil pengembangan dianalisis dengan menggunakan KLT densitometer. Kemudian dipilih fase gerak terbaik yang dapat memberikan profil pemisahan yang baik dari komponen-komponen zat aktif dalam campuran ekstrak tersebut (7).

4. Pembuatan Kurva Kalibrasi (6)

a. Andrografolid

Dari larutan baku andrografolid 200 ppm dibuat berbagai seri pengenceran hingga diperoleh konsentrasi 15, 30, 60, 100, 128, dan 160 ppm. Ketujuh konsentrasi tersebut ditotolkan sebanyak 5 μ l pada lempeng kromatografi lapis tipis. Selanjutnya dilakukan pengembangan dengan fase gerak terpilih. Bercak dianalisis dengan menggunakan KLT densitometer pada panjang gelombang analisis. Kemudian dibuat kurva kalibrasi perbandingan antara area atau luas puncak dengan berat andrografolid pada tiap bercak.

b. Kurkuminoid

Dari larutan baku kurkuminoid 2.000 ppm dibuat berbagai seri pengenceran hingga diperoleh konsentrasi 300, 600, 800, 1.000, dan 1.600 ppm. Keenam konsentrasi tersebut ditotolkan sebanyak 2 μ l pada lempeng kromatografi lapis tipis. Selanjutnya dilakukan pengembangan dengan fase gerak terpilih. Bercak dianalisis dengan menggunakan KLT densitometer pada panjang gelombang analisis. Kemudian dibuat kurva kalibrasi perbandingan antara area atau luas puncak kurkuminoid total, kurkumin, dan demetoksikurkumin dengan berat kurkuminoid pada tiap bercak.

5. Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi dan batas kuantitasi dari baku andrografolid dan kurkuminoid ditentukan dengan perhitungan statistik berdasarkan data kurva kalibrasi yang telah diperoleh.

6. Uji Keterulangan Pengukuran Andrografolid dan Kurkuminoid

Larutan baku andrografolid dalam metanol dibuat dalam konsentrasi 15, 100, dan 200 ppm. Larutan baku kurkuminoid dalam metanol dibuat dalam konsentrasi 300, 1.000, dan 2.000 ppm. Masing-masing konsentrasi ditotolkan 6 kali pada lempeng kromatografi lapis tipis. Masing-masing penotolan larutan baku kurkuminoid sebanyak

2 µl. Untuk uji keterulangan baku andrografolid ditotolkan sebanyak 5 µl. Kemudian lempeng dikembangkan dengan fase gerak terpilih. Hasil pengembangan dianalisis menggunakan KLT densitometer dan ditentukan koefisien variasi dari masing-masing konsentrasi.

7. Penetapan Kadar Sampel Campuran Ekstrak *Andrographis paniculata* dan *Curcuma domestica*

Sampel yang mengandung campuran ekstrak *Andrographis paniculata* dan ekstrak kering *Curcuma domestica* dengan perbandingan 1:1 ditimbang sejumlah 50 mg. Sampel dilarutkan dalam 3 ml metanol dengan sonikasi selama 15 menit. Kemudian larutan sampel tersebut disentrifugasi selama 10 menit. Residu diekstraksi lagi sebanyak 2 kali dengan 2,5 ml metanol dan disentrifugasi. Supernatan yang diperoleh digabungkan dalam labu ukur dan diencerkan dengan metanol hingga volume 10,0 ml.

Larutan tersebut ditotolkan pada lempeng kromatografi lapis tipis dengan menggunakan mikropipiler sebanyak 5 µl. Lempeng kemudian dikembangkan dengan fase gerak terpilih. Hasil pengembangan dianalisis pada panjang gelombang analisisnya menggunakan KLT densitometer. Kadar masing-masing komponen zat aktif dalam campuran ekstrak tersebut dihitung menggunakan persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh.

8. Uji Perolehan Kembali (6,7)

Larutan sampel campuran ekstrak kering *A. paniculata* dan ekstrak kering *C. domestica* ditimbang sejumlah 25 mg. Kemudian ditambahkan larutan baku dengan tingkat konsentrasi berbeda yaitu mendekati 50 %, 100 %, dan 120 % kadar andrografolid serta 50 %, 100 %, dan 150 % kadar kurkuminoid yang diperkirakan terdapat pada sampel. Untuk uji perolehan kembali andrografolid, ditambahkan sejumlah 175 μ l, 350 μ l, dan 420 μ l larutan baku andrografolid 1.000 ppm. Sedangkan untuk uji perolehan kembali kurkuminoid, ditambahkan sejumlah 1 ml, 2 ml, dan 3 ml larutan baku kurkuminoid 1.200 ppm. Selanjutnya ditetapkan kadar andrografolid dan kurkuminoid total dalam larutan sampel yang telah ditambahkan larutan baku tersebut. Konsentrasi andrografolid dan kurkuminoid baku dari hasil pengukuran diperoleh dari hasil pengurangan jumlah total andrografolid dan kurkuminoid pada sampel yang ditambahkan larutan baku dengan konsentrasi andrografolid dan kurkuminoid pada sampel yang tidak ditambahkan larutan baku. Konsentrasi andrografolid dan kurkuminoid baku yang diperoleh dari hasil pengukuran dibandingkan dengan konsentrasi yang ditambahkan sebenarnya.

9. Pembuatan Pola Kromatogram Sampel

Larutan sampel tunggal *A. paniculata*, *C. domestica*, serta campuran keduanya ditotolkan pada lempeng kromatografi lapis tipis sebanyak 5 µl. Larutan baku andrografolid 100 ppm sebanyak 5 µl dan larutan baku kurkuminoid 1.000 ppm sebanyak 2 µl juga ditotolkan pada lempeng yang sama. Kemudian dilakukan pengembangan dengan fase gerak terpilih. Lalu hasil pengembangan dianalisis dengan menggunakan KLT densitometer.

Untuk analisis bercak andrografolid secara visual, lempeng disemprot dengan menggunakan campuran asam asetat glasial-asam sulfat pekat-anisaldehyd (100:2:1). Kemudian lempeng tersebut dipanaskan pada suhu 110°C selama 15 menit (7). Hasil pemanasan dianalisis secara visual dan Rf sampel dibandingkan dengan baku.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Penentuan Panjang Gelombang Analisis

Panjang gelombang analisis maksimum andrografolid dalam pelarut metanol adalah 285 nm. Spektrum serapan larutan baku andrografolid dapat dilihat pada Gambar 6a. Sedangkan panjang gelombang maksimum bercak andrografolid dari hasil analisis dengan menggunakan KLT densitometer adalah 235 nm. Spektrum serapan bercak andrografolid dapat dilihat pada Gambar 6b.

Panjang gelombang analisis maksimum larutan baku kurkuminoid dalam metanol adalah 420 nm. Spektrum serapan larutan baku kurkuminoid dapat dilihat pada Gambar 7a. Sedangkan panjang gelombang maksimum bercak kurkuminoid dari hasil analisis dengan menggunakan KLT densitometer adalah 428 nm. Spektrum serapan bercak kurkuminoid dapat dilihat pada Gambar 7b.

2. Pemilihan Fase Gerak

Fase gerak yang dipilih untuk analisis campuran andrografolid dan kurkuminoid adalah campuran kloroform dan metanol dengan

perbandingan 9:1. Densitogram sampel campuran andrografolid dan kurkuminoid dengan beberapa macam fase gerak dapat dilihat pada Gambar 10 dan 11. Data Rf andrografolid dan kurkuminoid dengan berbagai macam campuran fase gerak dapat dilihat pada Tabel 1.

3. Kurva Kalibrasi dan Linearitas

Kurva kalibrasi andrografolid dapat dilihat pada Gambar 12. Dari kurva tersebut diperoleh persamaan garis: $y = 189 + 4,287 x$, di mana y adalah area atau luas puncak andrografolid dan x adalah berat andrografolid (ng). Koefisien korelasi (r) yang diperoleh adalah 0,99762. Data linearitas kurva kalibrasi andrografolid dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari larutan baku kurkuminoid, diperoleh persamaan linier kurva kalibrasi untuk kurkuminoid total, kurkumin, dan demetoksikurkumin. Kurva kalibrasi kurkuminoid dapat dilihat pada gambar 13. Kurva tersebut menggambarkan hubungan antara berat kurkuminoid total dengan area kurkumin yang dihasilkan, tanpa menghitung area bisdemetoksikurkumin dan demetoksikurkumin yang juga terdapat pada baku kurkuminoid. Dari kurva tersebut diperoleh persamaan garis: $y = 118.4 + 3,316 x$, di mana y adalah area atau luas puncak kurkumin dan x adalah berat kurkuminoid (ng). Koefisien korelasi (r) yang diperoleh adalah 0,99586. Data linearitas kurva kalibrasi kurkuminoid total, kurkumin, dan demetoksikurkumin masing-masing

dapat dilihat pada Tabel 3, 4, dan 5.

4. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi andrografolid adalah 79,54 ng dan batas kuantitasnya adalah 265,13 ng. Data perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi andrografolid dapat dilihat pada Tabel 6.

Batas deteksi kurkuminoid adalah 390,69 ng dan batas kuantitasnya adalah 1.302,29 ng. Data perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi kurkuminoid dapat dilihat pada Tabel 7.

5. Uji Keterulangan

Hasil dari uji keterulangan andrografolid mempunyai nilai koefisien variasi lebih dari 2 % pada konsentrasi rendah dan sedang yaitu masing-masing sebesar 2,48 % dan 2,11 %. Sedangkan pada konsentrasi tinggi diperoleh nilai koefisien variasi kurang dari 2% yaitu masing-masing sebesar 0,58 %. Data uji keterulangan andrografolid dapat dilihat pada Tabel 8.

Hasil uji keterulangan kurkuminoid memberikan nilai koefisien variasi di bawah 2 % dari 5 kali penotolan pada konsentrasi rendah, sedang dan tinggi yaitu masing-masing sebesar 1,65 %, 0,46 %, dan 1,75 %. Data uji keterulangan andrografolid dapat dilihat pada Tabel 9.

6. Penetapan Kadar Sampel Campuran Ekstrak *Andrographis paniculata* dan *Curcuma domestica*

Kadar rata-rata andrografolid dalam sampel campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica* adalah 1,30 %.

Kadar rata-rata kurkuminoid dalam sampel campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica* berkisar antara 9,78 %.

7. Uji Perolehan Kembali

Hasil uji perolehan kembali andrografolid pada tiga tingkat konsentrasi berkisar antara 96,94-103,04 %. Data perolehan kembali andrografolid dapat dilihat pada Tabel 10.

Hasil uji perolehan kembali kurkuminoid pada konsentrasi sedang dan tinggi berkisar antara 95,29-106,34 %. Pada konsentrasi rendah diperoleh hasil perolehan kembali sebesar 79,54 %. Data perolehan kembali kurkuminoid dapat dilihat pada Tabel 11.

8. Pola Kromatogram Sampel

Pola kromatogram sampel tunggal *A. paniculata* dan sampel campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica* memberikan nilai R_f yang berdekatan dengan baku andrografolid dan kurkuminoid. Pola kromatogram sampel dapat dilihat pada gambar 14 – 18.

B. PEMBAHASAN

Andrografolid dan kurkuminoid merupakan senyawa aktif dari tumbuhan yang berbeda namun memiliki beberapa khasiat yang sama, antara lain sebagai hepatoprotektor, antiinflamasi, dan imunostimulan. Selain itu, andrografolid dan kurkuminoid juga telah diteliti memiliki aktivitas farmakologi sebagai anti HIV, antikanker, dan antidiabetes (2,8).

Pada awal optimasi analisis campuran andrografolid dan kurkuminoid, dilakukan pembuatan larutan induk baku andrografolid dan kurkuminoid. Larutan baku kurkuminoid yang digunakan baik untuk proses optimasi maupun untuk proses analisis selalu dibuat baru untuk mencegah ketidakakuratan hasil analisis karena ketidakstabilan kurkuminoid (31). Selain itu, untuk mencegah fotodekomposisi kurkuminoid, baik larutan sampel yang mengandung kurkuminoid maupun larutan baku kurkuminoid disimpan dalam wadah coklat atau wadah tertutup aluminium foil.

Larutan baku tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan panjang gelombang analisis optimum. Dari pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis, diperoleh panjang gelombang maksimum untuk andrografolid adalah 285 nm dan untuk kurkuminoid adalah 420 nm. Sedangkan panjang gelombang maksimum dari hasil analisis bercak andrografolid menggunakan KLT densitometer adalah

sekitar 235 nm dan bercak kurkuminoid memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 428 nm. Panjang gelombang maksimum kurkuminoid yang diperoleh dari spektrofotometri maupun densitometri tidak terlalu jauh berbeda. Sedangkan panjang gelombang maksimum dan spektra andrografolid yang diperoleh dari pengukuran secara spektrofotometri dan densitometri sangat jauh berbeda. Untuk analisis kuantitatif selanjutnya dipilih panjang gelombang 235 nm sebagai panjang gelombang analisis. Hal ini disebabkan karena pada panjang gelombang ini andrografolid memberikan respon maksimum dan kurkuminoid memberikan respon yang tidak jauh berbeda dengan analisis pada panjang gelombang 254 nm (panjang gelombang analisis kurkuminoid yang umum digunakan). Selain itu, dari hasil pembuatan kurva kalibrasi kurkuminoid diperoleh koefisien korelasi yang jauh lebih baik pada panjang gelombang 235 nm dibandingkan pada panjang gelombang maksimumnya yaitu 428 nm.

Pada tahap optimasi selanjutnya dilakukan optimasi metode penyiapan sampel yang merupakan simulasi campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica*. Ekstrak yang digunakan pada penelitian ini merupakan produk jadi yang diperoleh dari Phytochemindo dengan disertai sertifikat analisis. Karena merupakan produk jadi, maka di dalam ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica* tersebut terdapat pula bahan tambahan seperti laktosa dan amilum

sebagai pembawa dan aerosil sebagai bahan pengering. Amilum dan aerosil yang merupakan eksipien ekstrak *A. paniculata* bersifat tidak larut dalam pelarut organik. Sedangkan pelarut yang digunakan adalah metanol yang merupakan pelarut organik. Metanol merupakan pelarut optimum untuk penyarian sampel yang mengandung andrografolid dan kurkuminoid (7,27) Oleh sebab itu, pada saat proses penyarian sampel eksipien-eksipien tersebut akan tersisa sebagai residu.

Pada proses optimasi penyarian sampel diperlukan 3 kali penyarian. Pada proses penyarian pertama digunakan 3 ml metanol. Dari penyarian pertama diperoleh filtrat kecoklatan yang pekat. Penyarian selanjutnya dengan 2,5 ml metanol diperoleh larutan warna kuning dan sudah agak bening, kemungkinan sebagian ekstrak andrografolid sudah tertarik pada penyarian pertama. Pada penyarian ketiga digunakan 2,5 ml metanol. Warna larutan sudah berubah menjadi keputihan meskipun masih ada warna kuning sedikit. Namun pada penyarian keempat, filtrat yang diperoleh sudah benar-benar bening dan setelah diuji dengan salah satu pereaksi warna untuk andrografolid dan kurkuminoid, yaitu KOH, diperoleh hasil negatif. Jika masih terdapat andrografolid atau kurkuminoid, maka setelah ditambahkan KOH akan berubah menjadi merah-merah jingga. Oleh sebab itu, untuk proses penyarian sampel selanjutnya hanya diperlukan 3 kali penyarian.

Tahapan selanjutnya setelah penyarian sampel dan larutan

baku adalah pemilihan fase gerak. Terdapat 6 macam komposisi fase gerak yang akan diujikan. Setelah pengujian menggunakan 6 macam fase gerak tersebut, diperoleh 2 fase gerak terbaik yang memberikan pemisahan yang baik dari komponen-komponen yang terdapat pada sampel dan nilai Rf antara 0,2-0,8. Kedua fase gerak tersebut adalah kloroform-metanol (9:1) dan diklormetan-metanol (9,5:0,5). Namun fase gerak diklormetan-metanol (9,5:0,5) tidak dipilih karena puncak yang dihasilkan kurang kompak dan lebih melebar bila dibandingkan dengan puncak yang dihasilkan dari pengembangan dengan kloroform-metanol (9:1). Selain itu, fase gerak kloroform-metanol (9:1) dipilih karena rentang Rf yang dihasilkan tidak terlalu jauh, yaitu 0,33-0,73, bila dibandingkan dengan rentang Rf pada fase gerak diklormetan-metanol (95:5) yaitu 0,23-0,85. Untuk melihat apakah komponen-komponen pada sampel terpisah dengan baik atau tidak dengan fase gerak yang digunakan dapat dihitung dari nilai resolusinya. Secara langsung keterpisahan dapat dilihat dari ada/tidaknya puncak yang saling bertumpuk pada densitogram sampel. Pada penggunaan fase gerak kloroform-metanol (9:1) masih terlihat adanya puncak yang bertumpuk, yaitu senyawa X dengan demetoksikurkumin. Oleh sebab itu, sulit untuk menetapkan kadar kurkuminoid total pada sampel dengan menghitung luas puncak kurkumin serta demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin. Pada akhirnya, perhitungan kadar kurkuminoid hanya mengandalkan luas

puncak kurkumin yang dihasilkan.

Setelah dilakukan optimasi kondisi analisis maka selanjutnya dilakukan analisis kuantitatif. Pertama-tama dibuat kurva kalibrasi andrografolid. Dengan rentang penotolan 75–1.000 ng, diperoleh persamaan garis linier $y = 189 + 4,287 x$, dengan koefisien korelasi yang tidak terlalu bagus yaitu 0,997. Menurut penelitian-penelitian terdahulu (2,7), koefisien korelasi yang diperoleh pada analisis kuantitatif andrografolid menggunakan metode KLT densitometri juga tidak terlalu bagus yaitu sekitar 0,995-0,997 (2,7). Sedangkan pada analisis kuantitatif andrografolid menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), dapat diperoleh linearitas yang lebih baik dengan nilai koefisien korelasi $\geq 0,9990$. Hal tersebut dapat terjadi karena banyak faktor luar yang dapat mempengaruhi hasil analisis kromatografi lapis tipis.

Pada pembuatan kurva kalibrasi kurkuminoid ditotolkan baku kurkuminoid dengan rentang 600–4.000 ng. Diperoleh persamaan linier dari perbandingan berat kurkuminoid total dengan area kurkuminoid total, kurkumin, dan demetoksikurkumin. Namun yang digunakan pada analisis kuantitatif selanjutnya adalah persamaan linier kurva kalibrasi menggunakan area kurkumin yaitu $y = 118,4 + 3,316 x$, dengan asumsi area kurkumin sebanding dengan area kurkuminoid total. Koefisien korelasi yang diperoleh dari persamaan linier kurva kalibrasi kurkumin

tidak terlalu bagus yaitu sebesar 0,99586. Sedangkan pada penelitian-penelitian terdahulu dapat diperoleh linearitas kurkumin yang bagus ($\geq 0,9990$). Hal tersebut terjadi karena baku yang digunakan pada penelitian-penelitian tersebut adalah baku kurkumin murni yang diperoleh dari hasil isolasi terlebih dahulu. Sedangkan pada penelitian ini digunakan baku kurkuminoid karena keterbatasan waktu untuk melakukan isolasi terlebih dahulu. Oleh sebab itu, untuk analisis kuantitatif kurkumin sebaiknya menggunakan baku kurkumin murni sehingga dapat memberikan hasil yang lebih valid (9,31).

Setelah diperoleh kurva kalibrasi, dilakukan penentuan batas deteksi dan kuantitasi andrografolid dan kurkuminoid berdasarkan persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh. Penentuan batas deteksi bertujuan untuk mengetahui jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Sedangkan batas kuantitasi ditentukan untuk mengetahui jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi andrografolid adalah 79,54 ng dan batas kuantitasnya adalah 265,13 ng. Sedangkan batas deteksi kurkumin adalah 390,69 ng dan batas kuantitasnya adalah 1.302,30 ng. Batas deteksi dan batas kuantitasi yang diperoleh cukup tinggi karena linearitas andrografolid dan kurkuminoid kurang baik.

Uji lain yang juga dilakukan adalah uji keterulangan yang dilakukan pada tiga tingkat konsentrasi (konsentrasi kecil, sedang, dan besar). Menurut prosedur yang ada perlu dilakukan penotolan sebanyak enam kali, namun hal tersebut sulit dilakukan karena ukuran lempeng yang digunakan terbatas. Akibatnya, hanya lima titik saja yang dapat memberikan nilai keterulangan yang baik yaitu dengan nilai koefisien variasi kurang dari 2 %. Namun pada konsentrasi rendah dan sedang, keterulangan andrografolid kurang memenuhi syarat. Pada konsentrasi rendah hasil keterulangan tidak memenuhi syarat karena konsentrasi tersebut memang jauh berada di bawah batas kuantitasi dan semakin rendah konsentrasi nilai koefisien variasi akan cenderung semakin besar (36). Sedangkan hasil uji keterulangan kurkuminoid diperoleh hasil yang cukup baik, yaitu nilai koefisien variasi di bawah 2 %. Pada konsentrasi sedang diperoleh keterulangan kurkuminoid yang jauh lebih baik daripada konsentrasi tinggi. Variasi yang lebih besar pada konsentrasi tinggi karena semakin tinggi konsentrasi maka semakin banyak kurkuminoid yang tertinggal di mikrokapiler akibat penguapan pelarut pada saat proses penotolan.

Untuk mengetahui perolehan kembali analit setelah melalui prosedur penyiapan sampel maka dilakukan uji perolehan kembali. Dalam penelitian ini, perolehan kembali dilakukan dengan metode adisi karena tidak memungkinkan untuk membuat plasebo dari suatu sampel ekstrak tanaman. Perolehan kembali andrografolid dengan

menggunakan metode penyiapan sampel yang telah dioptimasi berkisar antara 96,94-103,04 %. Pada analisis andorgrafolid secara KLT densitometri yang dilakukan oleh peneliti terdahulu juga memberikan hasil perolehan kembali yang cukup baik, yaitu sebesar 96,5 %, 97,4 %, dan 99,1 %, masing-masing pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi (2). Sedangkan perolehan kembali kurkuminoid berkisar antara 95,29-106,34 % pada konsentrasi sedang dan tinggi. Pada konsentrasi rendah, perolehan kurkuminoid sangat jauh menyimpang dari hasil yang diharapkan. Hal tersebut mungkin terjadi karena kurangnya ketelitian kerja peneliti.

Sampel yang ditetapkan kadarnya dalam penelitian ini merupakan simulasi sediaan yang mengandung ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica*. Sampel dibuat dengan mencampur ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica* dengan perbandingan 1:1, sebagaimana komposisi yang banyak digunakan pada beberapa sediaan herbal. Sampel dihomogenkan secara manual di dalam lumpang. Oleh sebab itu, hasil penetapan kadar cukup bervariasi dari hasil yang diharapkan karena kurang homogen. Selain itu, koefisien variasi yang cukup besar pada penetapan kadar sampel juga dapat disebabkan karena adanya pengotor-pengotor atau senyawa-senyawa lain pada ekstrak yang dapat mengganggu penetapan kadar. Senyawa-senyawa lain yang juga terdapat pada sampel ekstrak dapat dilihat pada pola kromatogram sampel dan standar (Gambar 14

sampai 18). Dari hasil penetapan kadar, diketahui bahwa kadar andrografolid yang diperoleh di bawah kadar yang tertera pada sertifikat analisis ekstrak *A. paniculata*. Sedangkan kadar kurkuminoid yang diperoleh mendekati kadar yang tertera pada sertifikat analisis ekstrak *C. domestica*.

Dari pola kromatogram, diketahui bahwa nilai Rf andrografolid, bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin, dan kurkumin berdekatan dengan Rf dari baku andrografolid dan kurkuminoid. Variasi nilai Rf yang terjadi dapat dipengaruhi oleh faktor kejenuhan bejana. Bila bejana kurang jenuh, maka Rf yang dihasilkan oleh bercak di bagian pinggir lempeng cenderung lebih tinggi dibandingkan bercak pada bagian tengah lempeng dan bercak yang dihasilkan pun kurang bagus. Pada pengerjaan kromatografi lapis tipis banyak faktor yang perlu diperhatikan karena dapat mempengaruhi hasil pengembangan. Faktor-faktor tersebut antara lain kejenuhan bejana, temperatur dan kelembaban ruang pengerjaan, serta kelembaban lempeng yang dapat mempengaruhi mekanisme pemisahan oleh silika gel. Hasil pengembangan yang kurang bagus dapat menyebabkan variasi pada data yang dihasilkan.

Dari hasil kromatogram, tampak adanya puncak-puncak lain yang juga terdapat pada sampel *A. paniculata*. Puncak-puncak tersebut kemungkinan merupakan turunan andrografolid. Keberadaan puncak tersebut ada kalanya mengganggu penetapan kadar karena

sering bercampur dengan puncak kurkumin yang menyebabkan koefisien variasi yang cukup besar pada penetapan kadar kurkumin. Namun hal tersebut sulit dihindari karena pada ekstrak tanaman terdapat banyak senyawa lain selain senyawa yang dianalisis.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Kondisi optimum untuk analisis andrografolid dan kurkuminoid dalam campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica* secara KLT Densitometri adalah dengan menggunakan fase diam lempeng silika gel 60 F 254 dan fase gerak kloroform-metanol (9:1) pada panjang gelombang optimum 235 nm. Metode ini memberikan keterulangan serta perolehan kembali yang cukup baik untuk analisis kuantitatif andrografolid dan kurkuminoid sehingga dapat menjadi referensi untuk kontrol kualitas sediaan herbal yang mengandung ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica*.

A. SARAN

1. Digunakan baku kurkumin murni untuk analisis kadar kurkumin dalam campuran ekstrak.
2. Dilakukan optimasi analisis kuantitatif andrografolid dan kurkuminoid dalam campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica* menggunakan metode Kromatografi Kolom Kinerja Tinggi (KCKT).

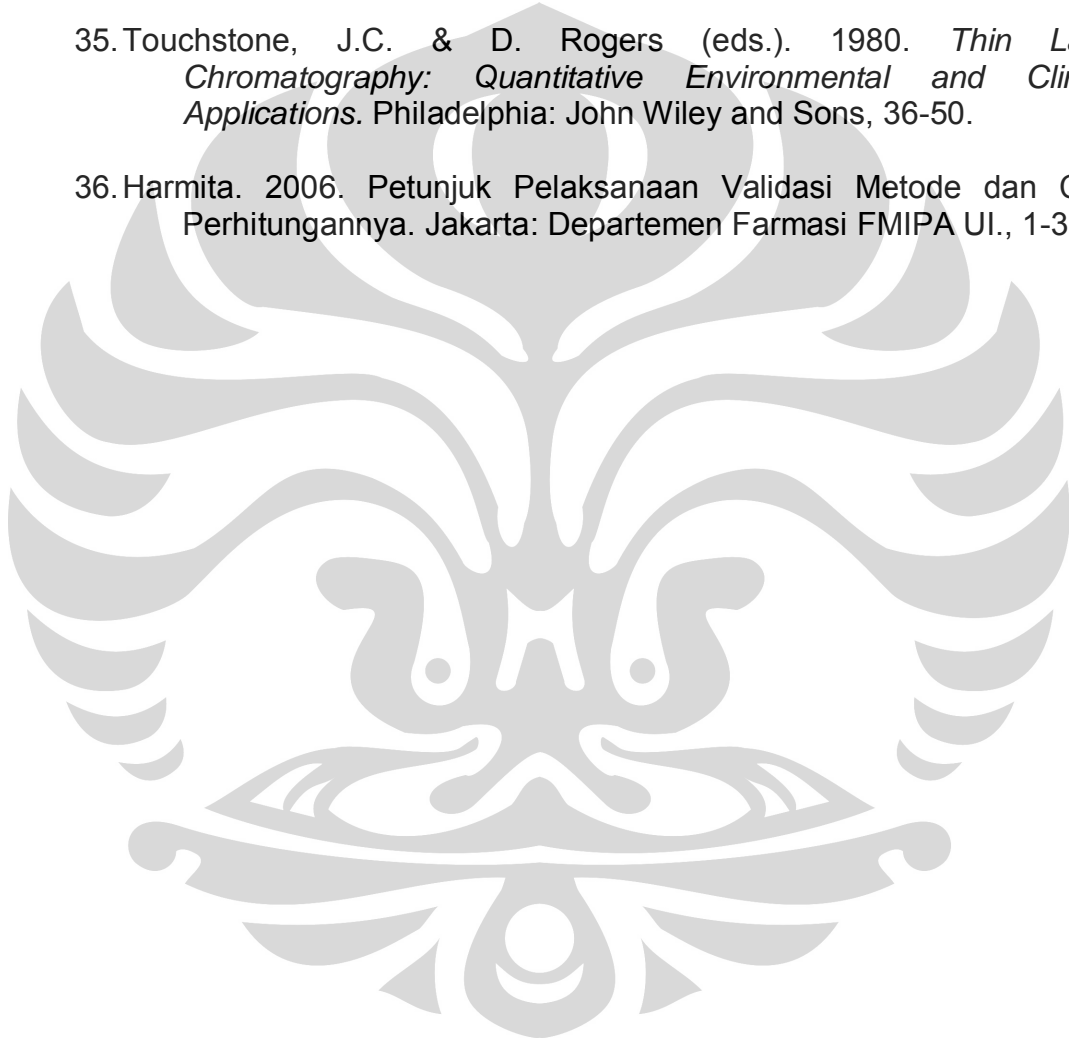
DAFTAR ACUAN

1. Kumar, R.A., K. Sridevi,, N.V. Kumar, S. Nanduri, dan S. Rajagopal. 2004. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *J. Ethno. Pharm.* 92: 291–295.
2. Akowuah, G.A., I. Zhari, I. Norhayati, dan A. Mariam. 2006. HPLC and HPTLC densitometric determination of andrographolides and antioxidant potential of *Andrographis paniculata*. *J. Food Compos. Anal.* 19: 118–126.
3. Dalimartha, S. *Deteksi Dini Kanker dan Simplisia Antikanker*. Jakarta: Swadaya, 2004: 107-108.
4. Markatou, E, V. Gionis, D. Chryssikos, S. Hatziantoniou, A. Georgopoulos, dan C. Demetzos. 2007. Molecular interactions between dimethoxycurcumin and Pamam Dendrimer Carriers. *Int. J. Pharmaceut.* 339: 231-236.
5. Anonim. *WHO Monograph on Selected Medicinal Plants*, vol. I. Geneva: WHO, 1999: 12, 115-122.
6. Ding, L., X.B Luo, F. Tang, J.B. Yuan, M. Guo, dan S.Z. Yao. 2008. Quality control of medicinal herbs *Fructus gardeniae*, Common *Andrographis* Herb and their preparations for their active constituents by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection–electrospray mass spectrometry. *Tal.* 74: 1344–1349.
7. Saxena, S., D.C. Jain, M.M. Gupta, R.S. Bhakuni, H.O. Mishra, dan R.P.Sharma. 2000. High-Performance Thin-Layer Chromatographic Analysis of Hepatoprotective Diterpenoids from *Andrographis paniculata*. *Phytochem. Anal.* 11(1): 34-36.
8. Anonim. *Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia*, vol. I. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2004: 83-85.
9. Phattanawasin, Panadda, Uthai Sotanaphun, dan Lawan Sriphong. 2009. Validated TLC-Image Analysis Method for Simultaneous Quantification of Curcuminoid in *Curcuma longa*. *Chromatograph.* 69:397-400.

10. Pathania, V., A.P. Gupta, dan B. Singh. 2006. Improved HPTLC Method for Determination of Curcuminoids from *Curcuma longa*. *J. Liq. Chrom. & Relat. Tech.* 29(6):877-887.
11. Riswanto. *Isolasi Kurkumin dari Kurkuminoid Rimpang Kunyit (Curcuma domestica Val.)*. Skripsi Program Sarjana Ekstensi Farmasi. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2008.
12. Peret-Almeida, L., A.P.F. Cherubino, R.J. Alves, L. Dufosse, dan M.B.A. Gloria. 2005. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food R. I.* vol. 38: 1039-1044.
13. Ansari, M.J., K.S. Ahmad, J. Kohli, Ali, dan R.K. Khar. 2005. Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. & Biomed. Anal.* vol. 39: 132-138.
14. Rao, Y.K., G. Vimalamma, C.V. Rao, dan Y.M. Tzeng. 2004. Flavonoids and andrographolides from *Andrographis paniculata*. *Phytochem.* 65: 2317-2321.
15. Jarukamjorn, K. dan N. Nemoto. 2008. Pharmacological Aspects of *Andrographis paniculata* on Health and Its Major Diterpenoid Constituent Andrographolide. *J. Health Sci.* 54:370-381.
16. Kardono, L.B.S., N. Artanti, I.D. Dewiyanti, T. Basuki, dan K. Padma-winata. *Selected Indonesian Medicinal Plants: Monograph and Description*, vol.1. Jakarta: Grasindo, 2003: 113-166.
17. Jones, S.B. dan A.E. Luchsinger. *Plant Systematics*, Second Edition. Singapore: McGraw-Hill, Inc., 1987: 477-482.
18. Anonim. *Standard of ASEAN Herbal Medicine*, vol. I. Jakarta: ASEAN Countries, 1993: 36-49.
19. Sharma, A., K. Lal, dan S.S. Handa. 1992. Standardization of the indian crude drug Kalmegh by high pressure liquid chromatographic determination of andrographolide. *Phytochem. Anal.* 3(3): 129-231.
20. Kumoro, A.C. dan M. Hasan. 2007. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Andrographolide from *Andrographis paniculata*: Effect of the Solvent Flow Rate, Pressure, and Temperature. *Chin. J. Chem. Eng.* 15(6): 877-883.

21. Cheung, H.Y., C.S. Cheung, dan C. K. Kong. 2001. Determination of bioactive diterpenoids from *Andrographis paniculata* by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chrom. A*, 930: 171–176.
22. Anonim. *The Merck Index Fourteenth Edition*, vol. I. New Jersey: Merck & Co., Inc., 1976: 102, 446.
23. Mishra, S.K., N.S. Sangwan, dan R.S. Sangwan. 2007. *Andrographis paniculata* (Kalmegh): A Review. *Phcog. Rev.* 1(2): 283-298.
24. Gu, Y., J. Ma, Y. Liu, B. Chen, dan S. Yao. 2007. Determination of andrographolide in human plasma by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chrom. B.* 854: 328–331.
25. Touchstone, J.C. dan F.D. Murell. *Practice of Thin Layer Chromatography*. Philadelphia: John Wiley and Sons, 1982: 1-25, 108.
26. Gafner, S., S-K Lee, M. Cuendet, S. Barthelemy, L. Vergnes, S. Labidalle, R.G. Mehta, W.B. Boone, dan J.M. Pezzuto. 2004. Biologic evaluation of curcumin and structural derivatives in cancer chemoprevention model systems. *Phytochem.* 65: 2849-2859.
27. FAO. 2004. *CURCUMIN: Chemical and Technical Assessment*. 1-8
28. Anonim. [http://www.uni-graz.at/~katzer/engl/Curc Ion.html](http://www.uni-graz.at/~katzer/engl/Curc%20ion.html). 29 April 2008, pk. 15.15.
29. Anonim. *ESCOP Monograph*, 2nd edition. New York: ESCOP, 2003: 107.
30. Barik, A, B. Mishra, L. Shen, H. Mohan, R.M. Kadam, S. Dutta, H-Y. Zhang, dan K.I. Priyadarsini. 2005. Evaluation of a new copper(II)-curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions. *Free Rad. Biol. & Med.* 39: 811-822
31. Lin, X., L. Xue, H. Zhang, dan C. Zhu. 2006. Determination of curcumins in turmeric by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Can. J. Anal. Sci. & Spectr.* 51: 35-42.
32. Ebadi, M. *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*, 2nd edition. Boca Raton: CRC, 2007:159-160.

33. Kirkland, J.J. (ed.). 1970. *Modern Practice of Liquid Chromatography*. Wilmington: John Wiley, 6-7.
34. Bassett, J., R.C. Denney, G.H. Jeffery, dan J. Mendham. 1994. *Buku Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*, terj. dari Vogel's *Textbook of Quantitative Inorganic Analysis Including Elementary Instrumental Analysis* oleh A. Hadyono Pudjaatmaka dan L. Setiono. Jakarta: EGC, 228-231.
35. Touchstone, J.C. & D. Rogers (eds.). 1980. *Thin Layer Chromatography: Quantitative Environmental and Clinical Applications*. Philadelphia: John Wiley and Sons, 36-50.
36. Harmita. 2006. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Jakarta: Departemen Farmasi FMIPA UI., 1-35.





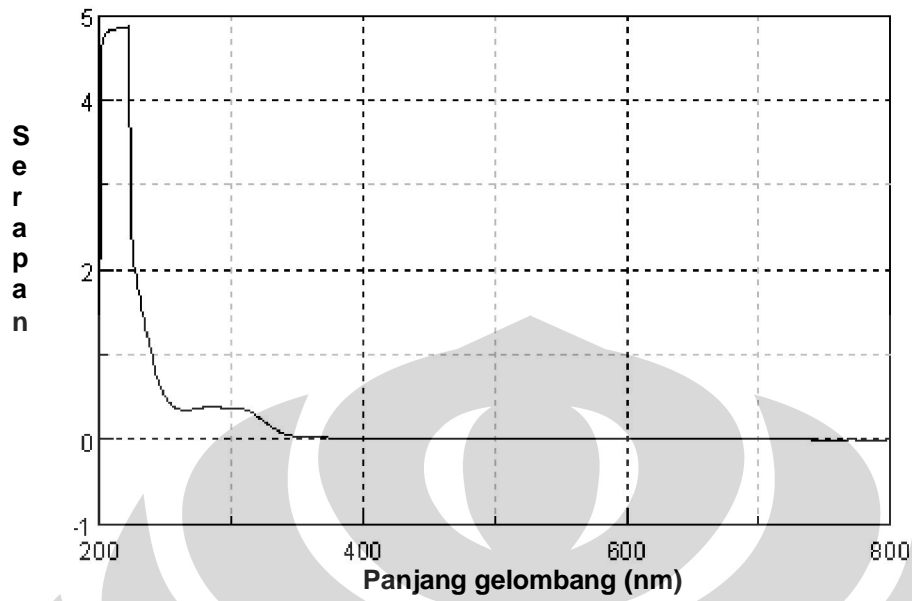
GAMBAR



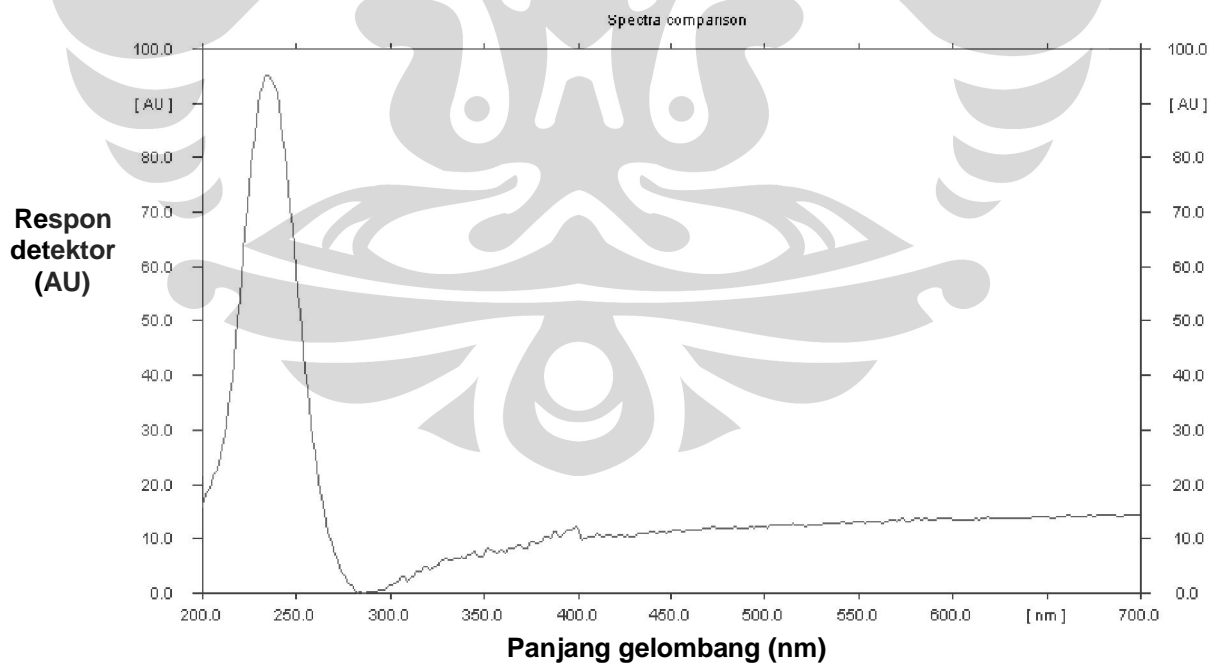
Gambar 4. Tanaman herba sambiloto (*Andrographis paniculata*) (15)



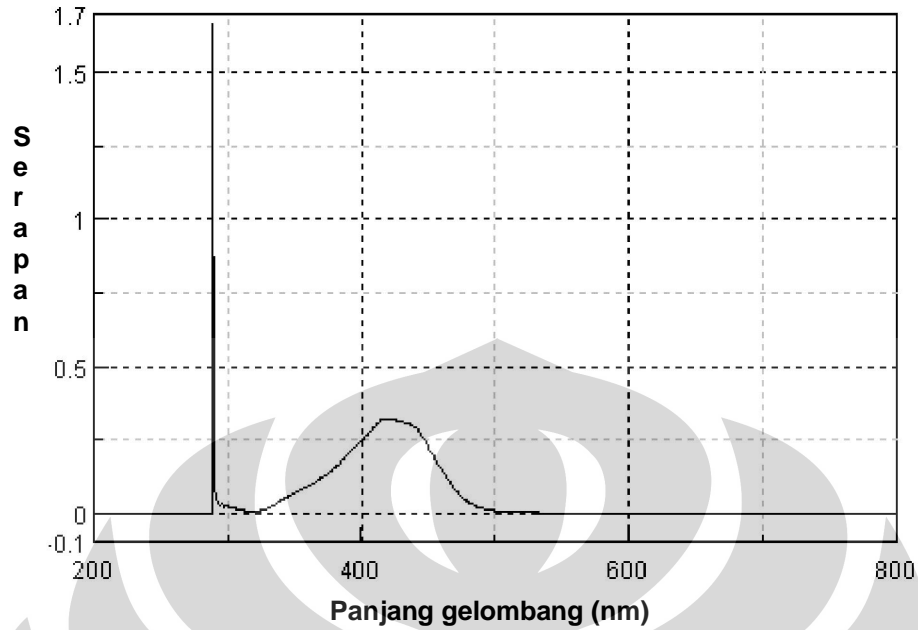
Gambar 5. Tanaman kunyit (*Curcuma domestica*)



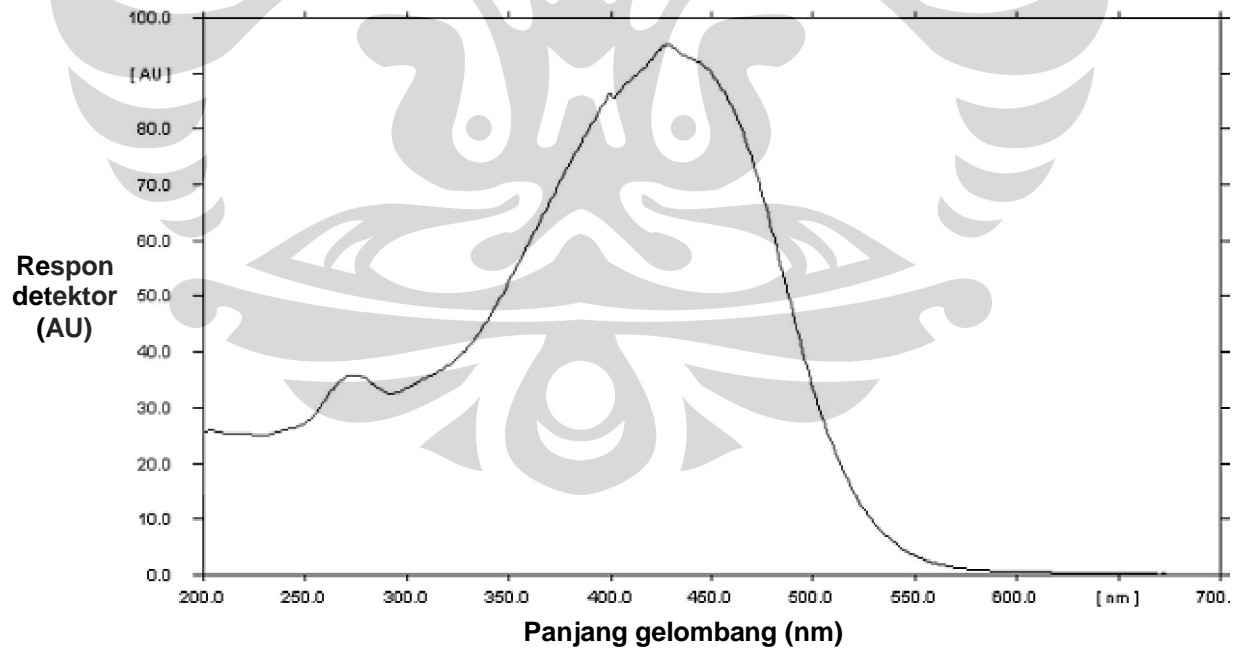
Gambar 6a. Kurva serapan larutan baku andrografolid 20 ppm
Keterangan : panjang gelombang maksimum 285 nm



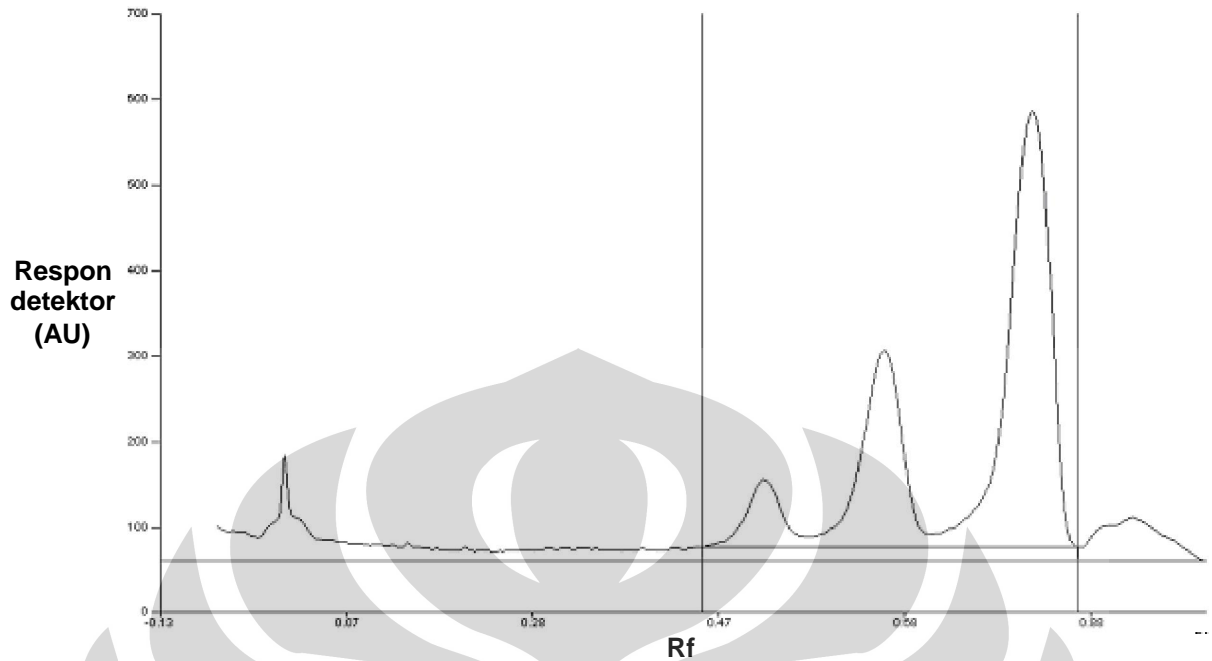
Gambar 6b. Kurva serapan bercak andrografolid
Keterangan : panjang gelombang maksimum 235 nm



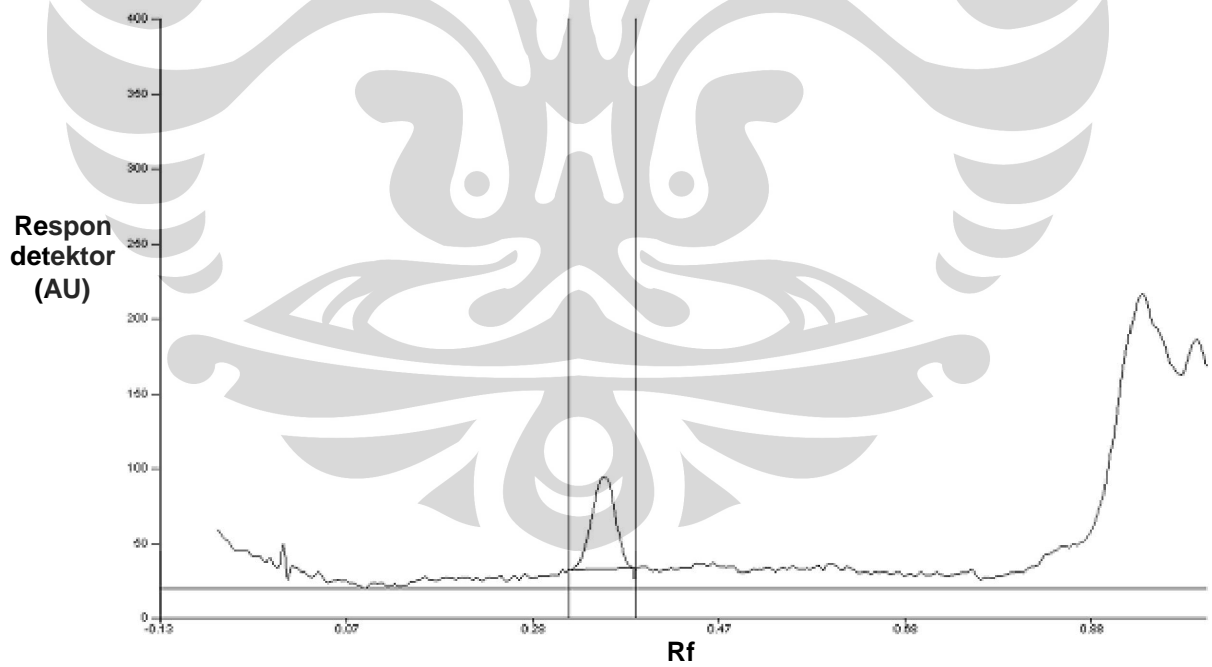
Gambar 7a. Kurva serapan larutan baku kurkuminoid 2 ppm
Keterangan : panjang gelombang maksimum 420 nm



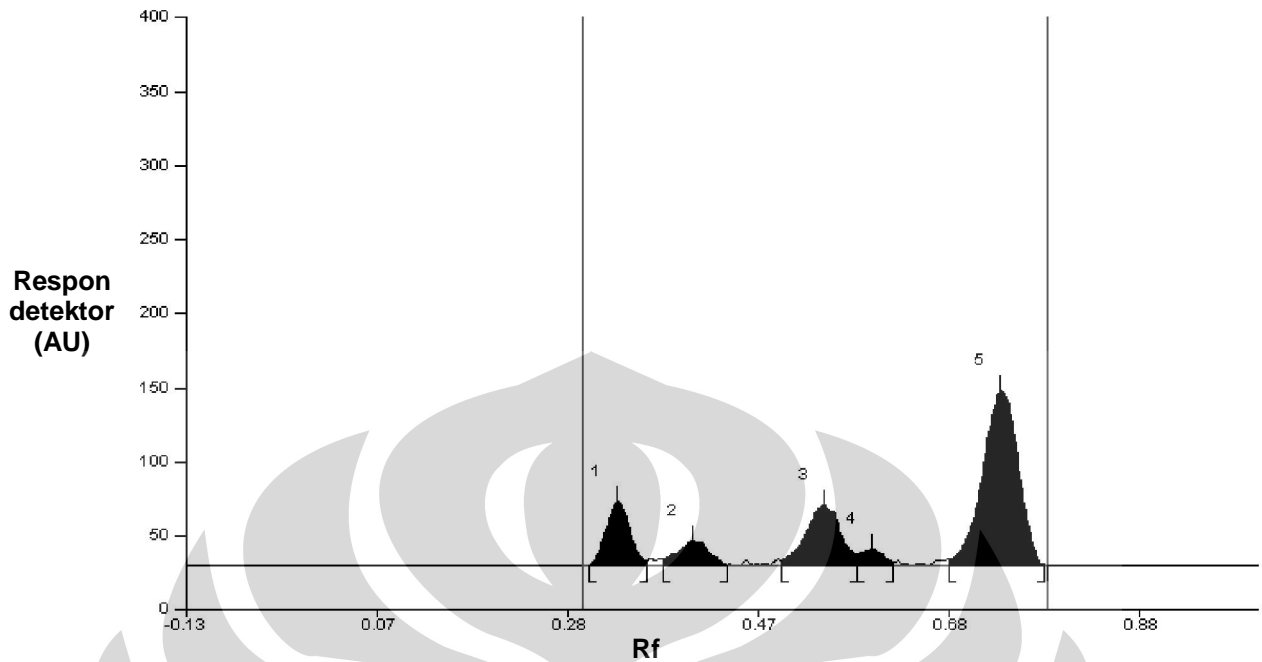
Gambar 7b. Kurva serapan bercak kurkuminoid
Keterangan : panjang gelombang maksimum 428 nm



Gambar 8. Densitogram baku kurkuminoid 600 ng pada panjang gelombang 428 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1)



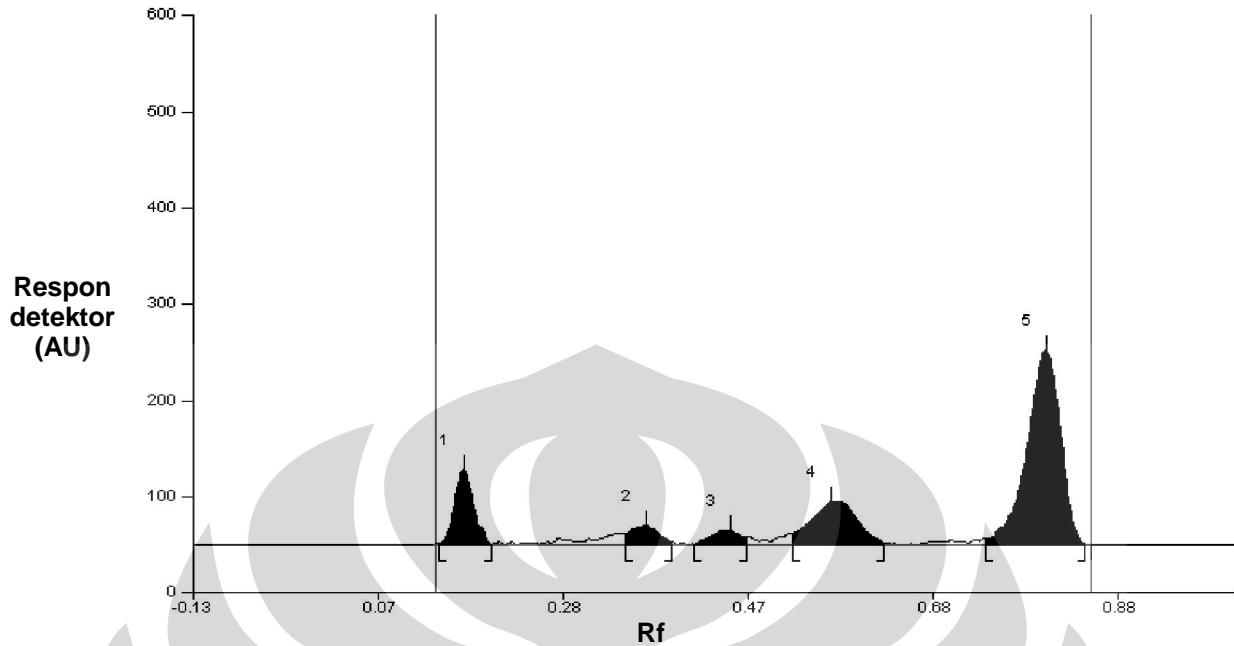
Gambar 9. Densitogram baku andrografolid 250 ng pada panjang gelombang 235 nm, kloroform-metanol (9:1)



Gambar 10. Densitogram sampel campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica* pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1), volume penotolan 5 μ l

Keterangan:

- 1 : Andrografolid
- 2 : Bisdemetoksikurkumin
- 3 : Demetoksikurkumin
- 4 : Senyawa tidak dikenal X
- 5 : Kurkumin



Gambar 11. Densitogram sampel campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica* pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak diklorometan-metanol (9,5:0,5), volume penotolan 5 μ l

Keterangan:

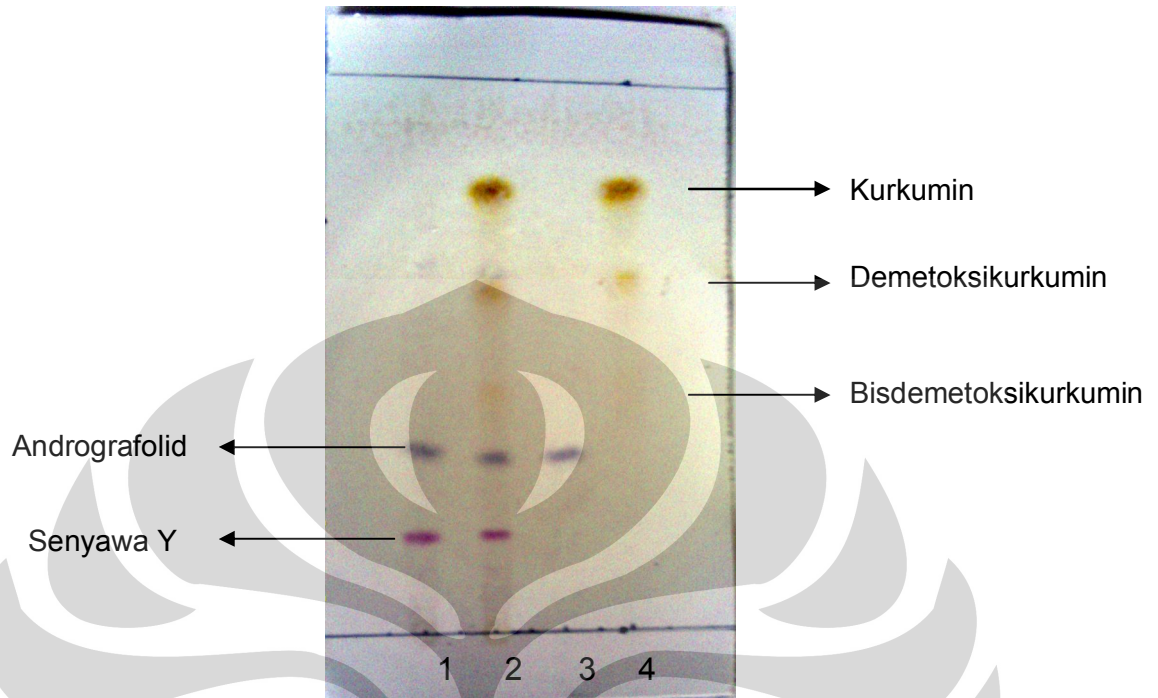
- 1 : Andrografolid
- 2 : Bisdemetoksikurkumin
- 3 : Senyawa tidak dikenal X
- 4 : Demetoksikurkumin
- 5 : Kurkumin

$$y = 189 + 4,287 x$$
$$r = 0,99762$$



Gambar 13. Kurva kalibrasi kurkuminoid

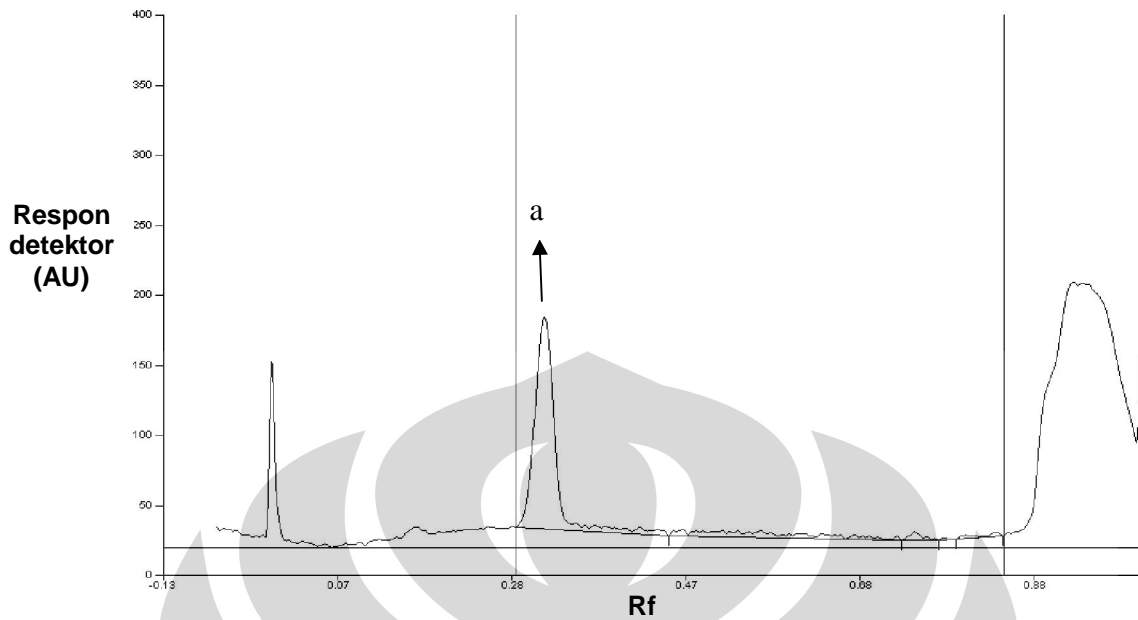
POLA KROMATOGRAM



Gambar 14. Pola kromatogram sampel campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica* dengan baku pembanding andrografolid dan kurkuminoid setelah disemprot dengan campuran asam asetat glasial-asam sulfat pekat-anisaldehyd (100:2:1)

Keterangan:

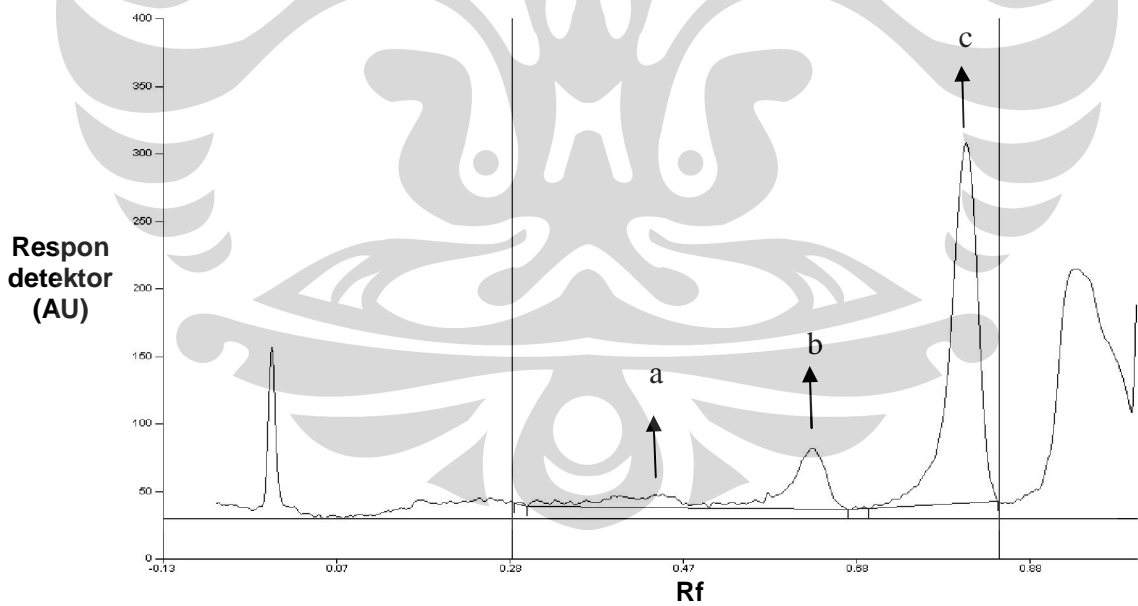
1. Bercak sampel ekstrak *A. paniculata*
2. Bercak sampel campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica*
3. Bercak baku andrografolid
4. Bercak baku kurkuminoid



Gambar 15. Densitogram baku andrografolid pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1)

Keterangan:

a. Andrografolid, $R_f = 0,31$



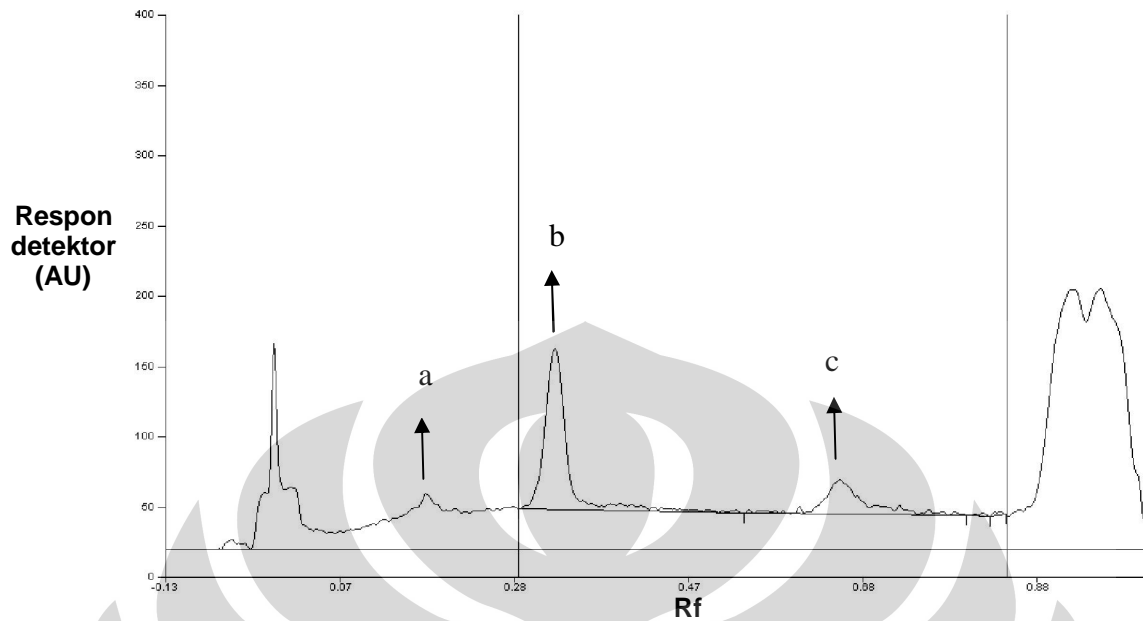
Gambar 16. Densitogram baku kurkuminoid pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1)

Keterangan:

a. Bisdemetoksikurkumin, $R_f = 0,42$

b. Demetoksikurkumin, $R_f = 0,60$

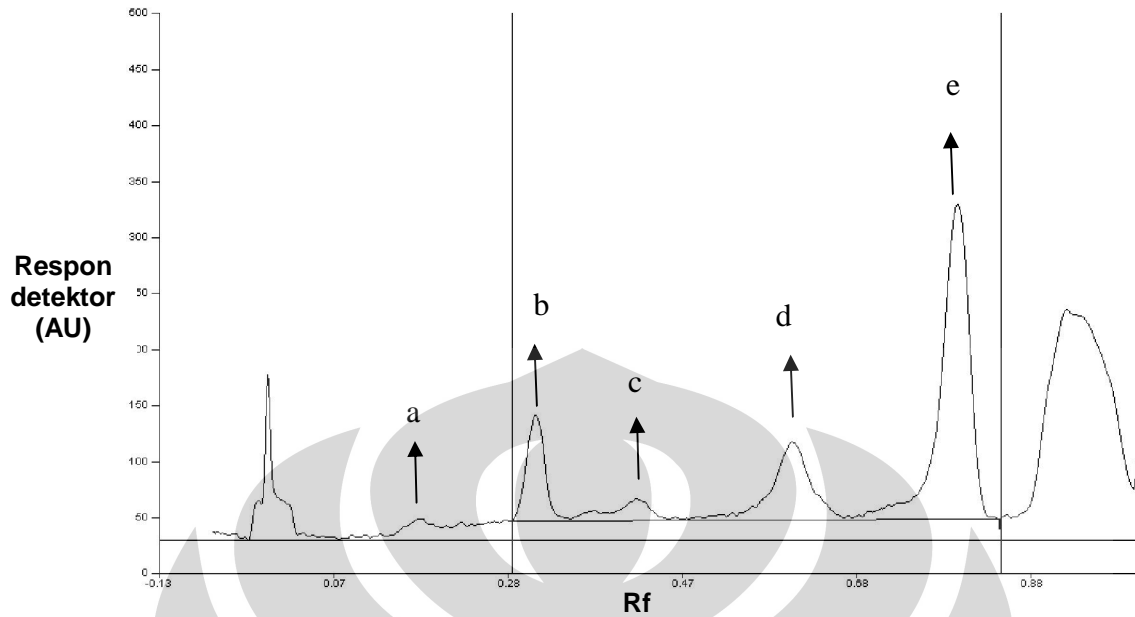
c. Kurkumin, $R_f = 0,79$



Gambar 17. Densitogram sampel tunggal ekstrak *A. paniculata* pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1)

Keterangan:

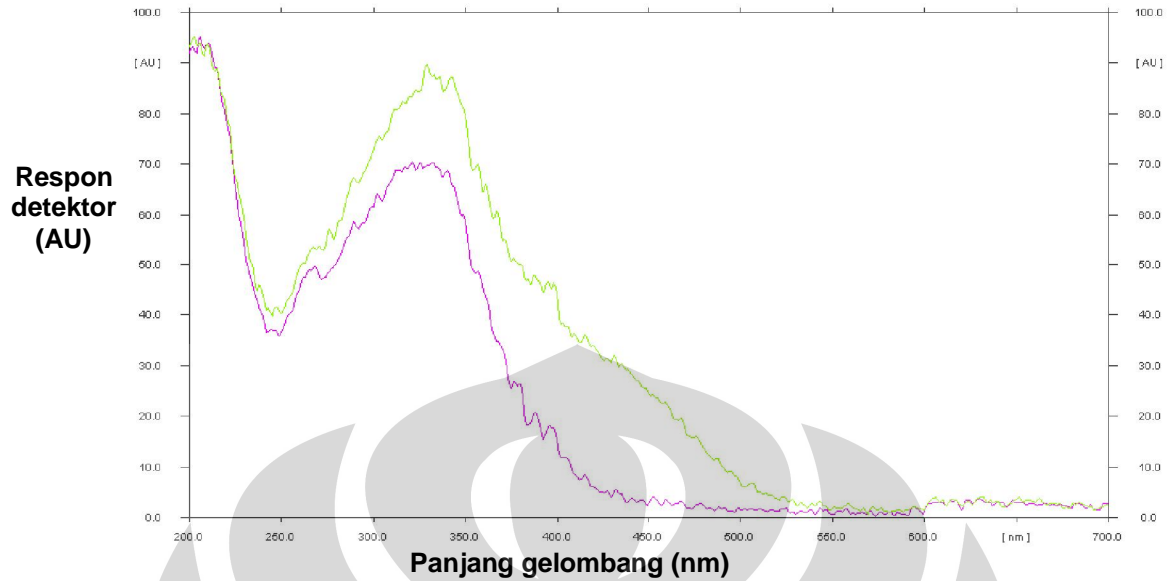
- a. Senyawa tidak dikenal Y, $R_f = 0,17$
- b. Andrografolid, $R_f = 0,32$
- c. Senyawa tidak dikenal X, $R_f = 0,65$



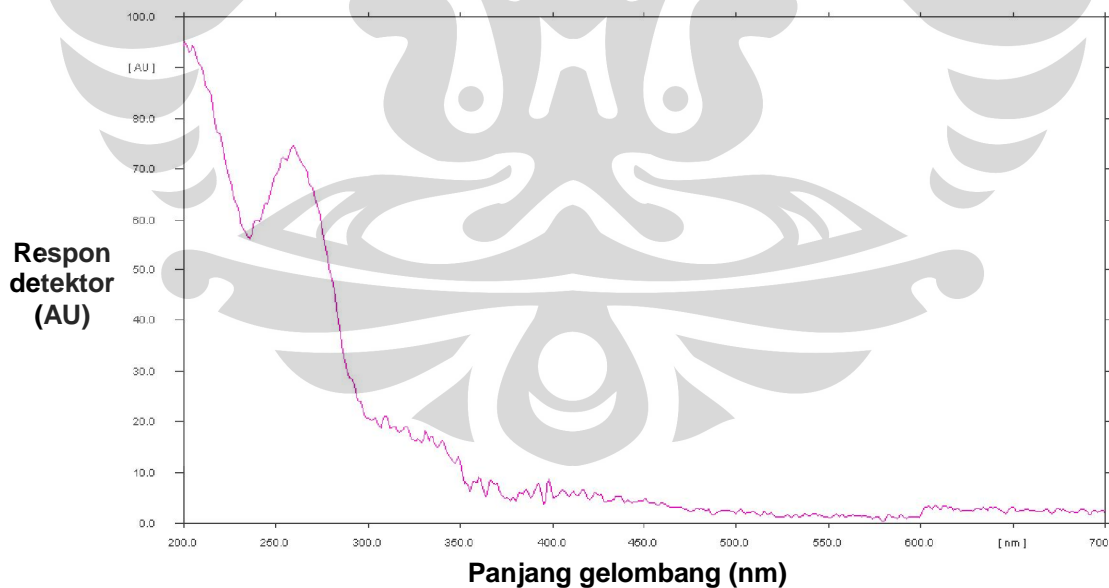
Gambar 18. Densitogram sampel campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica* pada panjang gelombang 235 nm, fase gerak kloroform-metanol (9:1)

Keterangan:

- a. Senyawa tidak dikenal Y, Rf = 0,17
- b. Andrografolid, Rf = 0,31
- c. Bisdemetoksikurkumin, Rf = 0,42
- d. Demetoksikurkumin, Rf = 0,60
- e. Kurkumin, Rf = 0,79



Gambar 19. Kurva serapan bercak senyawa tidak dikenal Y yang terdapat pada sampel tunggal ekstrak *A. paniculata* dan sampel campuran ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica*
Keterangan: panjang gelombang maksimum 203 dan 206 nm



Gambar 20. Kurva serapan bercak senyawa tidak dikenal X yang terdapat pada sampel tunggal ekstrak *A. paniculata*
Keterangan: panjang gelombang maksimum 201 nm



Tabel 1
Data Rf pada beberapa macam fase gerak

Fase Gerak	Rf			
	Andrografolid	Bisdemetoksi kurkumin	Demetoksi kurkumin	Kurkumin
Kloroform-Metanol = 9:1	0,33	0,41	0,54	0,73
Diklorometan-Metanol = 9,5:0,5	0,23	0,51	0,72	0,85
Kloroform-Toluen- Metanol = 6:2,5:1,5	0,47	0,51	0,54	0,61
Kloroform-Metanol = 9,8:0,2	-	0,16	0,31	0,67
Kloroform-Metanol = 9,2:0,8	0,35	0,5	0,69	0,88
Kloroform-Metanol = 8:2	0,78	>0,8	>0,8	>0,8 (saling bertumpuk)

Tabel 2
Linearitas Andrografolid

Berat (ng)	Area
(x)	(y)
76,73	394,69
153,45	846,67
306,90	1.532,93
511,50	2.582,24
654,72	2.978,90
818,40	3.700,72
1.023,00	4.484,38

Persamaan regresi:

$$y = 189 + 4,287 x$$

$$r = 0,99762$$

Tabel 3
Linearitas Kurkuminoid Total

Berat (ng) (x)	Area (y)
600	2.629,20
1.200	5.760,60
1.600	7.645,20
2.000	8.231,90
3.200	14.873,50
4.000	17.619,90

Persamaan garis regresi linier :

$$y = 155,93 + 4,43 x$$

$$r = 0.9961$$

Tabel 4
Linearitas Kurkumin

Berat (ng) (x)	Area (y)
600	2.101,93
1.200	4.268,41
1.600	5.631,06
2.000	6.090,30
3.200	11.187,33
4.000	13.213,28

Persamaan garis regresi linier :

$$y = 118.4 + 3,316 x$$

$$r = 0,99586$$

Tabel 5
Linearitas Demetoksikurkumin

Berat (ng) (x)	Area (y)
600	527,30
1.200	1.285,10
1.600	1.357,50
2.000	1.635,10
3.200	2.784,70
4.000	3.474,40

Persamaan garis regresi linier :

$$y = 70,4377 + 0,8446 x$$

$$r = 0,9946$$

Tabel 6
Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Andrografolid

X	Y	Y'	(Y-Y') ²	S (y/x)	LOD	LOQ
(ng)	(AU)	(AU)				
76,73	394,69	517,92	15.185,65	113,66	79,54	265,13
153,45	846,67	846,84	0,03			
306,90	1.532,93	1.504,68	798,05			
511,50	2.582,24	2.381,80	40.175,99			
654,72	2.978,90	2.995,78	285,09			
818,40	3.700,72	3.697,48	10,49			
1.023,00	4.484,38	4.574,60	8.139,83			
			=	64.595,13		

Keterangan:

x = berat / 5,0 μ l

y = luas puncak

y' = luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi ($y' = 189 + 4,287 x$)

S (y/x) = simpangan baku residual

LOD = batas deteksi

LOQ = batas kuantitasi

Tabel 7
Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Kurkuminoid

X	Y	Y'	(Y-Y') ²	S (y/x)	LOD	LOQ
(ng)	(AU)	(AU)				
600	2.101,93	2.108,00	36,85	431,84	390,69	1.302,29
1.200	4.268,41	4.097,60	29.176,06			
1.600	5.631,06	5.424,00	42.873,84			
2.000	6.090,30	6.750,40	435.732,01			
3.200	11.187,33	10.729,60	209.516,75			
4.000	13.213,28	13.382,40	28.601,57			
			= 745.937,10			

Keterangan:

X = berat / 2,0 µl

Y = luas puncak

Y' = luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi ($Y' = 118.4 + 3,316 X$)

S (y/x) = simpangan baku residual

LOD = batas deteksi

LOQ = batas kuantitasi

Tabel 8
Keterulangan Andrografolid

	Y	X	\bar{X}	SD	KV
	(AU)	(ng)	(ng)		(%)
15 ppm	402,30	49,75	49,02	1,21	2,48
	397,60	48,66			
	393,20	47,63			
	396,30	48,35			
	406,40	50,71			
100 ppm	2.729,80	592,67	587,66	12,40	2,11
	2.751,70	597,78			
	2.732,50	593,30			
	2.710,60	588,20			
	2.616,80	566,32			
200 ppm	4.333,70	966,81	964,05	5,67	0,58
	4.309,70	961,21			
	4.347,10	969,93			
	4.333,10	966,67			
	4.285,70	955,61			

Keterangan:

Y = luas puncak andrografolid

X = berat baku andrografolid tiap 5 μ l totolan (ng)

\bar{X} = berat rata-rata baku andrografolid tiap 5 μ l totolan (ng)

SD = simpangan baku antara berat sampel (X) pada tiap penotolan

KV = simpangan baku relatif terhadap \bar{X} rata-rata (%)

Tabel 9
Keterulangan Kurkuminoid

	Y	X	\bar{X}	SD	KV
	(AU)	(ng)	(ng)		(%)
600ng	2.072,40	589,26	601,60	98,39	1,65
	2.115,60	602,29			
	2.113,10	601,54			
	2.163,50	616,74			
	2.101,93	598,17			
1000 ppm	6.711,10	1.988,15	1.993,61	9,07	0,46
	6.775,30	2.007,51			
	6.743,60	1.997,95			
	6.702,70	1.985,62			
	6.713,30	1.988,81			
2000 ppm	12.996,00	3.883,47	3.839,96	67,01	1,75
	12.750,50	3.809,44			
	13.160,30	3.933,02			
	12.744,30	3.807,57			
	12.607,40	3.766,28			

Keterangan:

Y = luas puncak kurkumin

X = berat baku kurkuminoid tiap 2 μ l totalan (ng)

\bar{X} = berat rata-rata baku kurkuminoid tiap 2 μ l totalan (ng)

SD = simpangan baku antara berat sampel (X) pada tiap penotolan

KV = simpangan baku relatif terhadap X rata-rata (%)

Tabel 10
Penetapan Kadar Andrografolid dalam Campuran

Berat sampel (mg)	Y (AU)	X (ng)	\bar{X} (ng)	Kadar (%)	SD	KV (%)
50,2	1.559,20	319,62	329,21	1,31	8,33	2,53
	1.623,60	334,64				
	1.618,10	333,36				
50,4	1.569,20	321,95	327,04	1,30	4,62	1,41
	1.595,90	328,18				
	1.607,90	330,98				
50,4	1.604,00	330,07	334,67	1,30	7,38	2,25
	1.562,10	320,29				
	1.624,10	334,76				
Kadar andrografolid rata-rata				= 1,30 %		

Keterangan:

Y = luas puncak andrografolid

X = berat sampel tiap 5 μ l totalan (ng)

\bar{X} = berat rata-rata sampel tiap 5 μ l totalan (ng)

Kadar = jumlah andrografolid dalam tiap mg sampel yang ditimbang (%)

SD = simpangan baku antara berat sampel (X) pada tiap penotolan

KV = simpangan baku relatif terhadap X rata-rata (%)

Tabel 11
Penetapan Kadar Kurkuminoid dalam Campuran

Berat sampel (mg)	Y (AU)	X (ng)	\bar{X} (ng)	Kadar (%)	SD	KV (%)
50,2	8.124,10	2.414,26	2.385,18	9,50	59,31	2,47
	8.157,50	2.424,34				
	7.801,40	2.316,95				
50,4	8.165,40	2.426,72	2.546,25	10,10	106,70	4,19
	8.674,20	2.580,16				
	8.845,70	2.631,88				
50,4	8.661,10	2.576,21	2.453,40	9,74	110,65	4,51
	8.151,50	2.422,53				
	7.949,00	2.361,46				
Kadar kurkuminoid rata-rata				= 9,78 %		

Keterangan:

Y = luas puncak kurkumin

X = berat sampel tiap 5 μ l totalan (ng)

\bar{X} = berat rata-rata sampel tiap 5 μ l totalan (ng)

Kadar = jumlah kurkuminoid dalam tiap mg sampel yang ditimbang (%)

SD = simpangan baku antara berat sampel (X) pada tiap penotolan

KV = simpangan baku relatif terhadap X rata-rata (%)

Tabel 12

Uji Perolehan Kembali Andrografolid

Berat sampel (mg)	C_A^* ($\mu\text{g/ml}$)	Area (AU)	X (ng)	\bar{X} (ng)	C_A ($\mu\text{g/ml}$)	C_F ($\mu\text{g/ml}$)	UPK (%)
$\pm 25,00$	-	919,50 945,70 915,40	170,40 176,51 169,44	172,12	34,42		
$\pm 25,00$	17,9	1.283,10 1.314,00 1.299,30	255,21 262,42 258,99	258,88		51,775	96,94
$\pm 25,00$	35,805	1.751,80 1.664,60 1.681,10	364,54 344,20 348,05	352,27		70,453	100,63
$\pm 25,00$	42,966	1.876,60 1.891,60 1.859,30	393,66 397,15 389,62	393,48		78,695	103,04

Keterangan:

C_A^* = konsentrasi baku andrografolid yang ditambahkan

X = berat baku andrografolid tiap 5 μl total (ng)

C_A = konsentrasi sampel tanpa penambahan baku andrografolid

C_F = konsentrasi total sampel yang telah ditambahkan baku andrografolid

UPK = persen perolehan kembali

Tabel 13

Uji Perolehan Kembali Kurkuminoid

Berat sampel (mg)	C_A^* ($\mu\text{g/ml}$)	Area (AU)	X (ng)	\bar{X} (ng)	C_A ($\mu\text{g/ml}$)	C_F ($\mu\text{g/ml}$)	UPK (%)
$\pm 25,00$	-	4.455,7 4.632,6 4.007,8	1.307,99 1.361,34 1.172,92	1.280,75	256,15		
$\pm 25,00$	119,5	5.713,5 6.201,5 5.909,0	1.687,30 1.834,47 1.746,26	1.756,01		351,20	79,54
$\pm 25,00$	239,0	8.178,1 8.139,6 8.106,5	2.430,55 2.418,94 2.408,96	2.419,48		483,90	95,29
$\pm 25,00$	358,5	10.477,0 10.680,1 10.901,7	3.123,82 3.185,07 3.251,90	3.186,93		637,38	106,34

Keterangan:

C_A^* = konsentrasi baku kurkuminoid yang ditambahkan

X = berat baku kurkuminoid tiap 5 μl totalan (ng)

C_A = konsentrasi sampel tanpa penambahan baku kurkuminoid

C_F = konsentrasi total sampel yang telah ditambahkan baku kurkuminoid

UPK = persen perolehan kembali



Lampiran 1

Beberapa Contoh Sediaan Herbal yang Mengandung

Ekstrak *A. paniculata* dan *C. domestica*/*C. longa* serta *Curcuma* sp. lainnya

Multipro®

Tiap kapsul mengandung:

<i>Andrographis paniculata</i>	200 mg
<i>Curcuma domestica</i>	150 mg
Royal jelly	50 mg

Indikasi: meningkatkan stamina/imunitas tubuh, menjaga tubuh dari serangan virus, membantu memulihkan flu dan hidung tersumbat, membantu mengobati gangguan saluran cerna dan hati.

Hepakur®

Komposisi:

Silymarin	62,5 mg
<i>Andrographis herba</i>	62,5 mg
<i>Curcuma domestica</i>	30 mg
Volatile oil <i>Curcuma xanthorrhiza</i>	30 mg

Indikasi: melindungi hati dari kerusakan akibat toksin berbahaya, rokok, konsumsi alkohol, dan lemak yang berlebihan.

Metalloclear™

Komposisi:

Zinc (sebagai Zinc sitrat)	5 mg
<i>Andrographis paniculata</i>	150 mg
<i>Curcuma longa</i>	158 mg
dan Luduxin®	2,645 mg

Indikasi: meningkatkan klirens logam-logam berat dari tubuh serta meningkatkan aktifitas detoksifikasi hati

Diakur® Herbal Anti Diarrhea

Komposisi:

<i>Andrographis herba</i>	25 mg
<i>Curcuma domestica</i>	10 mg
<i>Psidium Folium</i>	65 mg

Indikasi: mengatasi masalah-masalah pencernaan seperti diare, sakit perut, dan perut kembung.

Kapsul Kista

Tiap kapsul mengandung:

<i>Gynura pseudochina</i>	180 mg
<i>Andrographis paniculata</i>	135 mg
<i>Curcuma zedoaria</i>	67,5 mg
<i>Curcuma xanthorrhiza</i>	67,5 mg

Indikasi: membantu proses penyembuhan kista, pembengkakan di payudara, dan pendarahan setelah melahirkan.

Kapsul Kanker& Tumor

Tiap kapsul mengandung

<i>Andrographis paniculata</i>	180 mg
<i>Curcuma zedoaria</i>	157.5 mg
<i>Gynura pseudochina</i>	112.5 mg

Khasiat: membantu proses penyembuhan kanker dan tumor

Kapsul Detoksifikasi

Tiap kapsul mengandung

<i>Gynura pseudochina</i>	180 mg
<i>Curcuma xanthorrhiza</i>	112.5 mg
<i>Andrographis paniculata</i>	112.5 mg
<i>Nigella sativa</i>	45 mg

Indikasi: membantu proses pembuangan racun dari dalam darah, mengatasi jerawat dan alergi berat serta melancarkan kerja ginjal.

Lampiran 2

Perhitungan Kurva Kalibrasi

Persamaan linier kurva kalibrasi: $y = a + bx$

Keterangan:

y = area atau luas puncak

x = berat baku yang ditotolkan

Nilai a dan b dapat dihitung dengan rumus:

$$a = \frac{(\sum y) \cdot (\sum x)^2 - (\sum x) \cdot (\sum xy)}{n \cdot \sum y^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{n \cdot \sum(xy) - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum(x)^2 - (\sum x)^2}$$

Koefisien korelasi (r) dapat dihitung dengan rumus:

$$r = \frac{n \cdot \sum(xy) - \sum x \cdot \sum y}{((n \cdot \sum(x)^2 - (\sum x)^2) \cdot (n \cdot \sum(y)^2 - (\sum y)^2))^{1/2}}$$

Lampiran 3

Perhitungan Batas Deteksi dan Kuantitasi

$$S (y/x)^2 = \frac{\sum(y-y')^2}{N-2}$$

$$S (y/x) = \sqrt{S (y/x)^2}$$

$$LOD = \frac{3 \times S (y/x)}{SI}$$

$$LOQ = \frac{10 \times S (y/x)}{SI}$$

Keterangan:

$S (y/x)^2$ = variasi variabel respon (y), didapat dari data-data yang dekat dengan garis regresi

N = jumlah titik konsentrasi yang menyusun kurva kalibrasi

LOD = batas deteksi

LOQ = batas kuantitasi

SI = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi

= *slope* (b pada persamaan garis $y = a + bx$)

Lampiran 4

Perhitungan Nilai Keterulangan

$$SD = \left\{ \frac{\sum(X-\bar{X})^2}{n-1} \right\}^{1/2}$$

$$KV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

Keterangan :

SD = simpangan baku

X = berat sampel (ng)

\bar{X} = berat sampel rata-rata (ng)

n = jumlah sampel yang dianalisis

KV = koefisien variasi atau simpangan baku relatif

Lampiran 5

Perhitungan Kadar dan Perolehan Kembali

Penetapan Kadar:

$$\text{Kadar} = \frac{\bar{X} / 5}{1.000 \times \text{Berat sampel yang ditimbang}} \times 100\%$$

Keterangan:

\bar{X} = rata-rata berat sampel tiap 5 μl totalan (ng)

Perolehan kembali:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{(C_F - C_A)}{C^*_A} \times 100\%$$

Keterangan:


C_F = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A = konsentrasi sampel sebenarnya

C^*_A = konsentrasi analit yang ditambahkan

Lampiran 6

Sertifikat Analisis Ekstrak *Andrographis paniculata*

 **PT PHYTOCHEMINDO REKSA**
Your Partner in Herbal Health

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name : Andrographis Paniculata DE 25
Indonesian Name : Sambiloto
Product Code : 1A05E25
Batch No. : 023AJ

GENERAL DATA
Plant Species : Andrographis paniculata
Ratio Botanical Extract : 6 : 1
Excipients : Amylum, Aerosil
Preservatives : NA


PHYSICS - CHEMICALS DATA

ITEM	STANDARD	RESULT
Appearance	Brownish	Conform
Mesh Size 60	Min. 90% Pass	Conform
Water Content	Max. 10%	5.45%
Extract Andrographis	Min. 25%	Conform
Andrographolid	Min. 5%	Conform
Solvent Residue	Max. 0.05%	Conform
Heavy Metal	Max. 5 ppm	Conform
Solubility	Not soluble in water	Conform


MICROBIOLOGICAL DATA

ITEM	STANDARD	RESULT
Total Aerobic Bacteria	Max. 10^4 CFU/g	Conform
Fungi	Max. 10^3 CFU/g	Conform
E. Coli	Negative	Negative
Staphylococcus A.	Negative	Negative
Salmonella	Negative	Negative
Pseudomonas aeruginosa	Negative	Negative

JUDGEMENTS : PASSED

Date of Issue : *January 27, 2007*
Issue by : *[Signature]*
Quality Control, 

*Office : Graha Darya-Varia Jl. Melawai Raya No. 93 Jakarta 12130 - Indonesia Telp. (62-21) 725 7961, 726 8026 Fax. (62-21) 725 7960
Factory: Jl. Mercedes Benz No. 105 Cicadas, Gunung Putri Bogor 16964 - Indonesia Telp. - Fax. (62-21) 867 1036/37 E-mail: phytochem@cbrn.net.id*



Lampiran 7

Sertifikat Analisis Ekstrak *Curcuma domestica*

 **PT PHYTOCHEMINDO REKSA**
Your Partner in Herbal Health

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name : Curcuma domestica C 20
 Indonesian Name : Kunyit
 Product Code : 1C06C20
 Batch No. : 112EH

GENERAL DATA
 Plant Species : Curcuma domestica Rhizome
 Ratio Botanical Extract : 15 : 1
 Excipients : Lactose
 Preservatives : NA

PHYSICS – CHEMICALS DATA

ITEM	STANDARD	RESULT
Appearance	Orange - Yellow	Conform
Mesh Size 80	Min. 90% Pass	Conform
Water Content	Max. 10%	4.75%
Curcuminoid	Min. 20%	20.22%
Solvent Residue	Max. 0,05%	Conform
Heavy Metal	Max. 5 ppm	Conform
Solubility	Not soluble in water	Conform

MICROBIOLOGICAL DATA


ITEM	STANDARD	RESULT
Total Aerobic Bacteria	Max. 10 ⁴ CFU/g	Conform
Fungi	Max. 10 ³ CFU/g	Conform
E. Coli	Negative	Negative
Staphylococcus A.	Negative	Negative
Salmonella	Negative	Negative
Pseudomonas aeruginosa	Negative	Negative

JUDGEMENTS : PASSED

Date of Issue : *May 27, 2008*
 Issue by :
 Quality Control, *[Signature]*



Office : Graha Darya-Varia Jl. Melawai Raya No. 93 Jakarta 12130 - Indonesia Telp. (62-21) 725 7981, 726 8026 Fax. (62-21) 725 7980
 Factory: Jl. Mercedes Benz No. 105 Cicadas, Gunung Putri Bogor 16964 - Indonesia Telp. - Fax. (62-21) 867 1036/37 E-mail: phychem@cbr.net.id



Lampiran 8

Sertifikat Analisis Kurkuminoid Standar (Merck)

Informasi produk			
Synonyms	1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, Turmeric yellow, Diferuloylmethane		
Rumus kimia	$C_{21}H_{20}O_6$		
Formulasi kimia	[(OH)(CH ₃ O)C ₆ H ₃ CHCHCO] ₂ CH ₂		
Kode HS	3203 00 10	Homor EC	207-280-5
Massa molar	368.39 g/mol	Homor CAS	458-37-7
Data kimia dan fisika			
Kelarutan di dalam air	(20 °C) tidak dapat larut	Titik leleh	170 - 175 °C
Massa molar	368.39 g/mol		
Informasi keamanan			
RTECS	M15230000		
Kelas penyimpanan (VCI)	10-13 Cairan dan padatan lain		
WGK	2 (bahan berpolusi)		
Pembuangan	3 Reagen organik yang relatif tidak aktif harus dikumpulkan dalam kategori A. Jika terhalogenasi, harus ditempatkan dalam Kategori B. Untuk residu padat gunakan Kategori C.		
Informasi Transport			
Pernyataan (jalur kereta api dan jalan raya) ADR, RID	Kein Gefahrgut		
Pernyataan (transportasi melalui laut) Kode-IMDG	No Dangerous Good		
Pernyataan (transportasi melalui udara) IATA-DGR	No Dangerous Good		
Data toksikologi			
LD 50 tertelan	LD 50 oral rat > 5000 mg/kg		
Spesifikasi			
Assay (acidimetric)	≥ 90 %		
Identity (IR)	passes test		