



UNIVERSITAS INDONESIA

**MIKROENKAPSULASI FRAKSI AKTIF DARI HERBA
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Nees)
YANG BERKHASIAH SITOTOKSIK DENGAN METODE
SEMPROT KERING**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister sains

IDAH ROSIDAH

0806422082

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN
KEKHUSUSAN TEKNOLOGI FARMASI
DEPOK
DESEMBER 2010**

i

HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS

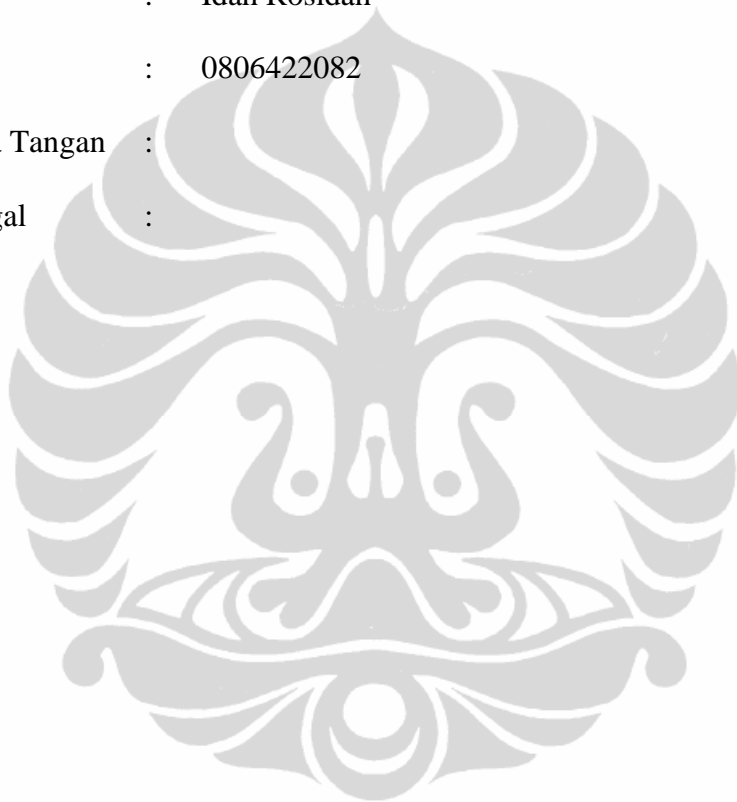
Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Idah Rosidah

NPM : 0806422082

Tanda Tangan :

Tanggal :



HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Idah Rosidah
NPM : 0806422082
Program Studi : Ilmu Kefarmasian
Judul Tesis : Mikroenkapsulasi Fraksi Aktif dari Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) yang Berkhasiat Sitotoksik dengan Metode Semprot Kering

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Ilmu Kefarmasian, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc ()
Pembimbing II : Prof. Dr. Wahono Sumaryono ()
Penguji I : Dr. Hasan Rachmat M ()
Penguji II : Prof. Dr. Effionora Anwar, MS ()
Penguji III : Dr. Katrin, MS ()

Ditetapkan di :

Tanggal :

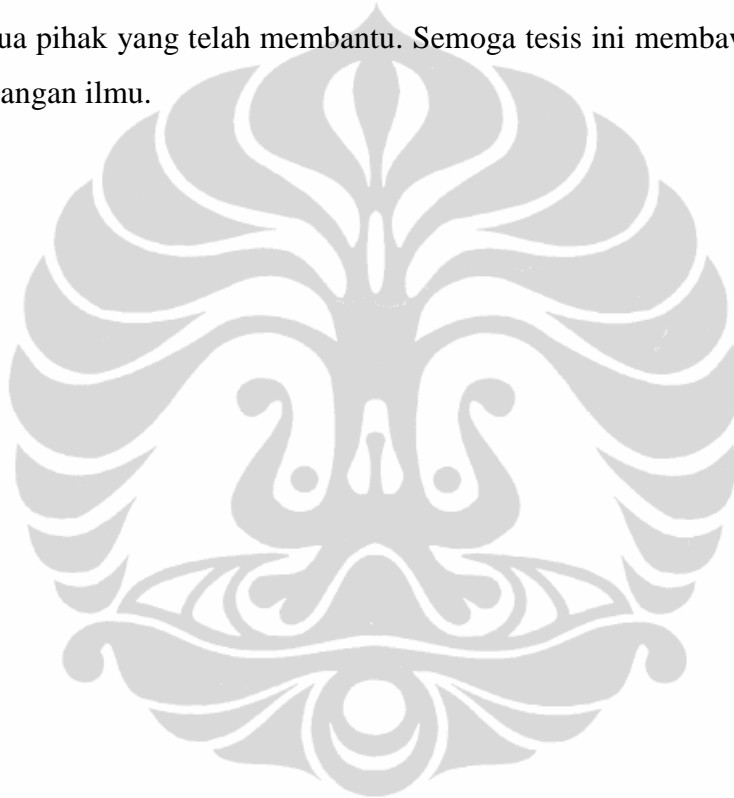
KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkah dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan Tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains Jurusan Ilmu Kefarmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Effionora Anwar, MS selaku Ketua Program Pasca Sarjana Ilmu Kefarmasian, Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Ibu Dr. Silvia Surini, M.Pharm,Sc selaku dosen pembimbing I atas bimbingan, saran, dan dukungan yang begitu besar selama penelitian dan penyusunan tesis ini.
3. Bapak Prof. Dr. Wahono Sumaryono selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, saran, dan dukungan yang begitu besar selama penelitian dan penyusunan tesis ini.
4. Ibu Prof. Dr. Endang Hanani, Ibu Dr. Joshita Djajadisastra, dan seluruh staf pengajar Program Pasca Sarjana Ilmu Kefarmasian Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Bapak Prof. Dr. Carunia Mulya Firdaus selaku Deputy Bidang Dinamika dan Dr. Fathoni Moehtadi selaku Pelaksana Harian Program Pasca Sarjana Kementrian Negara Riset dan Teknologi (KNRT) yang telah memberikan kesempatan dan dukungan selama mengikuti Program Pasca Sarjana Ilmu Kefarmasian FMIPA UI
6. Ibu Dr. Rifatul Widjhati, M.Sc, selaku Direktur Pusat Teknologi Farmasi dan Medika (PTFM) dan Ir. Bambang Srijanto selaku Kepala Bidang Teknologi Produksi Bahan Baku Farmasi BPPT yang telah memberikan kesempatan, dukungan, dan bantuan selama mengikuti Program Pasca Sarjana Ilmu Kefarmasian FMIPA UI.

7. Bapak, Ibu, Kakak, dan Adik saya yang memberikan saran, dukungan, semangat, dan doa.
8. Teman-teman PTFM BPPT dan Program Pasca Sarjana Ilmu Kefarmasian FMIPA UI angkatan 2008 atas bantuan, dukungan, kebersamaan dalam penelitian dan perkuliahan.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan bantuan selama masa penelitian dan penyusunan tesis.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.



Penulis

2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Idah Rosidah
NPM : 0806422082
Program Studi : Pasca Sarjana Ilmu Kefarmasian
Departemen : Farmasi
Fakultas : FMIPA UI
Jenis Karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**MIKROENKAPSULASI FRAKSI AKTIF DARI HERBA SAMBILOTO
(*Andrographis paniculata* Nees) YANG BERKHASIAT SITOTOKSIK DENGAN
METODE SEMPROT KERING**

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di :
Pada tanggal :
Yang menyatakan,

(Idah Rosidah)

ABSTRAK

Nama : Idah Rosidah
Program studi : Ilmu Kefarmasian
Judul : Mikroenkapsulasi Fraksi Aktif dari Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) yang Berkhasiat Sitotoksik dengan Metode Semprot Kering

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) adalah salah satu tanaman obat yang mempunyai aktivitas sebagai antikanker dengan komponen bioaktif utama andrografolid. Andrografolid merupakan seyawa diterpen lakton yang sukar larut dalam air. Penelitian ini bertujuan untuk membuat fraksi aktif dari ekstrak etanol herba sambiloto yang menunjukkan aktifitas sitotoksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dan kultur sel kanker payudara, serta pembuatan mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto dengan metode semprot kering. Fraksi aktif herba sambiloto diperoleh dengan cara fraksinasi ekstrak etanol herba sambiloto menggunakan etanol, *n*-heksan, etil asetat, dan air secara berturut-turut. Ekstrak dan fraksi herba sambiloto dievaluasi aktivitas antikanker terhadap *A.salina* dan dua kultur sel kanker payudara (MCF7 dan T47D). Pemilihan fraksi aktif berdasarkan uji aktivitas pendahuluan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan uji sitotoksik menggunakan metode MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazolium bromida) *assay*, kemudian fraksi aktif yang diperoleh dilakukan evaluasi dan karakterisasi. Mikroenkapsulasi fraksi aktif herba sambiloto dibuat dengan metode semprot kering menggunakan polimer PVP K30 dan HPMC sebagai bahan penyalut. Mikrosfer yang mengandung fraksi aktif herba sambiloto dievaluasi dan dikarakterisasi meliputi uji perolehan kembali, distribusi ukuran partikel, morfologi, kadar air, efisiensi penjerapan, uji kelarutan, dan uji disolusi secara *in vitro* dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2. Hasil uji BSLT terhadap ekstrak dan fraksi herba sambiloto menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memberikan nilai aktifitas tertinggi dengan nilai LC_{50} sebesar 30,13 ppm. Hasil uji sitotoksik terhadap dua jenis sel kanker payudara galur MCF7 dan T47D menunjukkan bahwa fraksi etil asetat termasuk kategori fraksi yang paling aktif dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 82,82 dan 45,27 ppm. Fraksi etil asetat herba sambiloto mengandung kadar andrografolid tertinggi yakni sebesar 32,12% b/b. Mikroenkapsulasi fraksi etil asetat herba sambiloto yang menggunakan PVP K30 dan HPMC dapat meningkatkan kelarutan dan laju disolusi andrografolid dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan andrografolid standar.

Kata Kunci : *Andrographis paniculata* Nees, fraksi aktif, sitotoksik mikroenkapsulasi, semprot kering
xii + 95 halaman : 26 gambar, 11 tabel,
Daftar Pustaka : 81 (1966-2010)

ABSTRACT

Name : Idah Rosidah
Program study : Pharmaceutical Science
Title : Microencapsulation of Cytotoxic Active Fraction from
Andrographis Herbs (*Andrographis paniculata* Nees) Using
Spray-Drying Method

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) is one of a medicinal plants containing andrographolid as its primary bioactive component, which indicate anticancer activity. Andrographolid is a diterpene lacton and sparingly soluble in water. The aims of this study were to investigate the active fraction of the ethanol extract of *A. paniculata* herbs that show cytotoxic activity against *Artemia salina* Leach and breast cancer cell lines, followed by preparation of the active fraction microspheres using spray-drying method. The active fraction of *A. paniculata* herbs was prepared by fractionation the ethanol extract with ethanol, n-hexane, ethyl acetate, and water consecutively. The extract and fractions were evaluated for anticancer activity against *A. salina* and two human breast cancer cell lines (MCF7 and T47D). Selection of the active fraction based on the pre-activity assay was conducted using *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) and the cytotoxic assay was performed using MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay, and then the obtained active fraction that was evaluated and characterized. The active fraction of *A. paniculata* herbs was microencapsulated using PVP K30 and HPMC as the coating polymer by spray-dried method. Microspheres containing the active fraction of *A. paniculata* herbs were evaluated and characterized in term of recovery factor, morphology, particle size distribution, water content, entrapment efficiency, saturation solubility, and *in vitro* dissolution test in medium of aquadest, phosphate pH 6.8 and chloride pH 1.2. The BSLT of extract and fractions of *A. paniculata* herbs showed that ethyl acetate fraction had the highest activity with 30.13 ppm of the LC₅₀ value. The result for cytotoxicity assay of the ethyl acetate fraction on two kind breast cancer cell lines, MCF7 and T47D, was considered as the most active fraction with the IC₅₀ values of 82.82 and 45.27 ppm respectively. The ethyl acetate fraction of *A. paniculata* herbs have contained the highest amount of andrographolide (32.12% w/w). Microencapsulation of the ethyl acetate fraction *A. paniculata* herbs using PVP K30 and HPMC could increase the saturation solubility and dissolution rate of andrographolide as compared to the ethyl acetate fraction and andrographolide standard.

Key Words : *Andrographis paniculata* Nees, active fraction, cytotoxic,
microencapsulation, spray-drying
xii + 95 pages : 26 pictures; 11 labels
Bibliography : 81 (1966-2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN ORISINILITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Tujuan penelitian	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Mikroenkapsulasi	4
2.2 Polimer penyalut	10
2.2.1 Polyvinylpirrolidon	10
2.2.2 Hidroksipropilmetilselulosa	11
2.3 Peningkatan kelarutan obat	12
2.4 Disolusi partikel Obat	15
2.5 Sambiloto	16
2.6 Ekstraksi	19
2.7 Uji sitotoksik	20
3. METODE PENELITIAN	23
3.1 Lokasi penelitian	23
3.2 Bahan dan alat	23
3.3 Cara kerja	24
3.3.1 Pembuatan ekstrak dan fraksi herba sambiloto	24
3.3.1.1 Pembuatan ekstrak herba sambiloto	24
3.3.1.2 Pembuatan fraksi herba sambiloto	25
3.3.2 Penentuan kadar andrografolid	27
3.3.2.1 Pembuatan kurva spektrum absorbansi andrografolid	27
3.3.2.2 Pembuatan kurva kalibrasi	27
3.3.2.3 Penetapan kadar andrografolid dalam ekstrak dan fraksi herba sambiloto	27
3.3.3 Uji sitotoksik	28
3.3.3.1 Uji terhadap <i>Artemia salina</i> Leach	28
3.3.3.2 Uji terhadap sel kanker payudara galur MCF7 dan T47D	29
3.3.4 Evaluasi dan karakterisasi fraksi aktif herba sambiloto	31
3.3.4.1 Rendemen ekstrak dan fraksi aktif herba sambiloto	32
3.3.4.2 Penetapan parameter spesifik	32
3.3.4.3 Penetapan parameter non spesifik	34
3.3.5 Pembuatan mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto	35

3.3.6	Pengukuran viskositas formula mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto	37
3.3.7	Evaluasi dan karakterisasi mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto.....	38
3.3.7.1	Penentuan uji perolehan kembali proses.....	38
3.3.7.2	Penentuan bentuk dan morfologi mikrosfer	38
3.3.7.3	Penentuan distribusi ukuran partikel	38
3.3.7.4	Penentuan kadar air	38
3.3.7.5	Penentuan efisiensi pejerapan andrografolid dalam mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto	39
3.3.7.6	Penentuan uji kelarutan andrografolid.....	39
3.3.7.7	Penentuan uji disolusi andrografolid secara <i>in vitro</i>	39
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	41
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	88
	DAFTAR REFERENSI	89



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	: Diagram skematik ilustrasi mikrosfer	4
Gambar 2.2	: Skematik ilustrasi mikroenkapsulasi dengan semprot kering..	8
Gambar 2.3	: Struktur kimia PVP.....	11
Gambar 2.4	: Struktur kimia HPMC.....	12
Gambar 2.5	: Proses pemindahan suatu molekul zat dari zat terlarut.....	13
Gambar 2.6	: Proses pembentukan rongga dalam pelarut	13
Gambar 2.7	: Proses penempatan zat terlarut kedalam rongga pelarut	14
Gambar 2.8	: Morfologi tanaman sambiloto.....	17
Gambar 2.9	: Struktur molekul andrografolid	18
Gambar 3.1	: Skema pembuatan ekstrak dan fraksi herba sambilo.....	26
Gambar 3.2	: Skema pembuatan mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto.....	37
Gambar 4.1	: Kurva serapan andrografolid pada konsentrasi 100 ppm.....	43
Gambar 4.2	: Kurva kalibrasi andrografolid pada λ 224 nm.....	44
Gambar 4.3	: Hubungan antara konsentrasi ekstrak/fraksi herba sambiloto (ppm) dengan kematian <i>A. salina</i> Leach (%).....	47
Gambar 4.4	: Hubungan antara konsentrasi ekstrak/fraksi herba sambiloto (ppm) dengan hambatan proliferasi sel kanker payudara galur MCF (%)	51
Gambar 4.5	: Mikrofotograf dari sel kanker payudara galur MCF7 tanpa dan dengan perlakuan setelah penambahan MTT.....	53
Gambar 4.6	: Hubungan antara konsentrasi ekstrak/fraksi herba sambiloto (ppm) dengan hambatan proliferasi sel kanker payudara galur T47D (%)	56
Gambar 4.7	: Mikrofotograf dari sel kanker payudara T47D tanpa dan dengan perlakuan setelah penambahan MTT.....	58
Gambar 4.8	: Hubungan konsentrasi andrografolid (%) dengan nilai LC_{50}/IC_{50} (ppm)	59
Gambar 4.9	: Mikrofotograf dari mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto pada perbesaran 1.500x.....	67
Gambar 4.10	: Distribusi ukuran partikel mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto	71
Gambar 4.11	: Hubungan antara jumlah penyalut dan efisiensi penyerapan andrografolid dalam mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto	73
Gambar 4.12	: Hubungan antara formula dengan kelarutan andrografolid (ppm)	78
Gambar 4.13	: Profil disolusi andrografolid dari mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto dalam medium aquadest pada suhu 37°C selama 2 jam.....	84
Gambar 4.14	: Profil disolusi andrografolid dari mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto dalam medium fosfat pH 6,8 pada suhu 37°C selama 2 jam	85
Gambar 4.15	: Profil disolusi andrografolid dari mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto dalam medium klorida pH 1,2 pada suhu 37°C selama 2 jam	86

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	: Formula mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto	36
Tabel 4.1	: Perolehan ekstrak dan fraksi herba sambiloto.....	42
Tabel 4.2	: Kadar andrografolid dalam ekstrak dan fraksi herba sambiloto.....	45
Tabel 4.3	: Nilai LC_{50} ekstrak dan fraksi herba sambiloto terhadap <i>A. salina</i> Leach.....	46
Tabel 4.4	: Nilai IC_{50} ekstrak dan fraksi herba sambiloto, andrografolid standar, dan Cisplatin® terhadap sel kanker payudara galur MCF7	49
Tabel 4.5	: Nilai IC_{50} ekstrak dan fraksi herba sambiloto, andrografolid standar, dan Cisplatin® terhadap sel kanker payudara galur T47D	54
Tabel 4.6	: Hasil evaluasi dan karakterisasi fraksi etil asetat herba sambiloto.....	60
Tabel 4.7	: Viskositas formula mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto....	63
Tabel 4.8	: Ringkasan hasil evaluasi mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto.....	66
Tabel 4.9	: Kelarutan andrografolid dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 pada suhu 37°C selama 12 jam.....	79
Tabel 4.10	: Laju disolusi andrografolid dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 pada suhu 37°C selama 2 jam.....	87

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	: Simplisia, ekstrak dan fraksi herba sambiloto.....	96
Lampiran 2	: Kromatogram andrografolid konsentrasi 50 ppm dalam medium metanol	97
Lampiran 3	: Kromatogram andrografolid konsentrasi 50 ppm dalam medium aquadest.....	98
Lampiran 4	: Kromatogram andrografolid konsentrsai 50 ppm dalam medium fosfat pH 6,8.....	99
Lampiran 5	: Kromatogram andrografolid konsentrsai 50 ppm dalam medium klorida pH 1,2.....	100
Lampiran 6	: Kromatogram ekstrak etanol herba sambiloto.....	101
Lampiran 7	: Kromatogram fraksi etanol herba sambiloto.....	102
Lampiran 8	: Kromatogram fraksi <i>n</i> -heksan herba sambiloto.....	103
Lampiran 9	: Kromatogram fraksi etil asetat herba sambiloto.....	104
Lampiran 10	: Kromatogram fraksi air herba sambiloto.....	105
Lampiran 11	: Mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto	106
Lampiran 12	: Mikrofotograf dari sel kaker payudara galur MCF7 dan T47D	107
Lampiran 13	: Data luas puncak andrografolid dalam medium metanol, aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2	108
Lampiran 14	: Hasil penentuan kadar andrografolid dalam ekstrak dan fraksi herba sambiloto.....	109
Lampiran 15	: Hasil uji BSLT terhadap ekstrak dan fraksi herba sambiloto	110
Lampiran 16	: Hasil uji MTT sel kanker payudara galur MCF7 terhadap ekstrak dan fraksi herba sambiloto	112
Lampiran 17	: Hasil uji MTT sel kanker payudara galur T47D terhadap ekstrak dan fraksi herba sambiloto.....	114
Lampiran 18	: Hasil identifikasi kandungan kimia fraksi etil asetat herba sambiloto	116
Lampiran 19	: Hasil uji viskositas formula mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto.....	117
Lampiran 20	: Hasil uji perolehan kembali proses pembuatan mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto.....	119
Lampiran 21	: Hasil distribusi ukuran partikel mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto	120
Lampiran 22	: Hasil penetapan kadar air mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto.....	121
Lampiran 23	: Hasil uji efisiensi penjerapan andrografolid dalam mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto.....	122
Lampiran 24	: Hasil uji kelarutan andrografolid dalam medium aquadest pada suhu 37°C selama 12 jam	123
Lampiran 25	: Hasil uji kelarutan andrografolid dalam medium fosfat pH 6,8 pada suhu 37°C selama 12 jam	124
Lampiran 26	: Hasil uji kelarutan andrografolid dalam medium klorida pH 1,2 pada suhu 37°C selama 12 jam	125

Lampiran 27	: Hasil uji disolusi andrografolid dalam medium aquadest pada suhu 37°C selama 2 jam	126
Lampiran 28	: Hasil uji disolusi andrografolid dalam medium fosfat pH 6,8 pada suhu 37°C selama 2 jam.....	127
Lampiran 29	: Hasil uji disolusi andrografolid dalam medium klorida pH 1,2 pada suhu 37°C selama 2 jam.....	128
Lampiran 30	: Laju disolusi andrografolid dalam medium aquadest pada suhu 37°C	129
Lampiran 31	: Laju disolusi andrografolid dalam medium fosfat pH 6,8 pada suhu 37°C.....	130
Lampiran 32	: Laju disolusi andrografolid dalam medium klorida pH 1,2 pada suhu 37°C	131
Lampiran 33	: Perhitungan nilai LC ₅₀ atau IC ₅₀	132
Lampiran 34	: Tabel transformasi persentase (kematian/hambatan proliferasi) probit empirik	133
Lampiran 35	: Perhitungan uji disolusi andrografolid dari mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto.....	134
Lampiran 36	: Hasil analisa statistik uji efisiensi penjerapan andrografolid dalam mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto	135
Lampiran 37	: Hasil analisa statistik uji kelarutan andrografolid berdasarkan perbedaan formula	139
Lampiran 38	: Hasil analisa statistik uji kelarutan andrografolid berdasarkan perbedaan medium	143
Lampiran 39	: Hasil analisa statistik laju disolusi androgrfoid berdasarkan perbedaan formula	148
Lampiran 40	: Hasil analisa statistik laju disolusi andrografolid berdasarkan perbedaan medium.....	152
Lampiran 41	: Hasil distribusi ukuran partikel formula A	157
Lampiran 42	: Hasil distribusi ukuran partikel formula B	158
Lampiran 43	: Hasil distribusi ukuran partikel formula C	159
Lampiran 44	: Hasil distribusi ukuran partikel formula D	160
Lampiran 45	: Hasil distribusi ukuran partikel formula E	161
Lampiran 46	: Hasil distribusi ukuran partikel formula F	162
Lampiran 47	: Hasil determinasi tumbuhan herba sambiloto	163
Lampiran 48	: Sertifikat analisis andrografolid	164
Lampiran 49	: Serifikat analisis PVP K30	165
Lampiran 50	: Sertifikat analisis HPMC	166

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Berdasarkan data Badan Kesehatan Dunia (WHO), pada tahun 2004 kanker merupakan penyebab kematian ketiga terbesar setelah penyakit kardiovaskular dan penyakit infeksi. Pada tahun 2004, diperkirakan kematian akibat kanker sekitar 7,4 juta dan diperkirakan terus meningkat lebih dari 83,2 juta pada tahun 2015 (WHO^a, 2008; WHO^b, 2008). Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling sering diderita oleh wanita dan menempati urutan pertama sebagai penyebab kematian akibat kanker (WHO^b, 2008).

Indonesia kaya akan beragam tanaman obat tradisional yang memiliki aktifitas antikanker, salah satunya adalah tanaman sambiloto. Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) atau yang dikenal *king of bitter*, famili *Acanthaceae*, merupakan salah satu tanaman obat yang telah banyak digunakan untuk pengobatan tradisional di India, Cina, Thailand, Japan, Scandinavia, Malaysia, dan Indonesia. Secara empiris tanaman ini digunakan untuk mengobati flu, demam, sakit tengorokan, infeksi saluran pernapasan, malaria, disentri, diare, dan berbagai penyakit infeksi lainnya (Wijayakusuma, 2008; Mishra *et al.*, 2007; Jarukamjorn dan Nobuo, 2008).

Sambiloto mempunyai aktivitas farmakologi yang sangat luas antara lain sebagai antiinflamasi, antidiare, antiviral, antimalaria, hepatoprotektor, kardiovaskular, antikanker, imunostimulan, hipoglikemik, dan antifertilitas (Jarukamjorn dan Nobuo, 2008). Menurut beberapa hasil penelitian, sambiloto memiliki aktivitas terhadap kultur sel kanker seperti kanker servik (Sukardiman *et al.*, 2005), payudara (Syarifah *et al.*, 2007; Jada *et al.*, 2007), leukemia (Cheung *et al.*, 2005), kolon, paru-paru, melanoma, ovarium, prostat dan ginjal (Kumar *et al.*, 2004).

Komponen bioaktif utama dalam tanaman sambiloto adalah andrografolid. Andrografolid merupakan senyawa diterpen lakton, mempunyai rumus molekul $C_{20}H_{30}O_5$ dan berat molekul 350,46. Andrografolid berupa kristal berwarna putih, mempunyai rasa sangat pahit, dan sukar larut dalam air. Kelarutan andrografolid

dalam air pada suhu 25°C adalah 60 mg/L. Andrografolid banyak terdapat pada bagian daun dan batang. Kadar senyawa andrografolid di dalam daun sebesar 2,5-4,8% dari berat kering (Mishra *et al.*, 2007; Jarukamjorn dan Nobue, 2008; Qiang, 2007; Ping, 2009; Prapanza *et al.*, 2003)

Berdasarkan aktifitasnya terhadap berbagai sel kanker, sambiloto sangat berpotensi untuk dikembangkan menjadi suatu bentuk sediaan obat yang berkhasiat dengan melakukan evaluasi praklinik terhadap ekstrak total, fraksi atau isolat senyawa kimia yang merupakan zat aktifnya untuk membuktikan aktifitas sitotoksik. Pengujian sitotoksik secara *in vitro* dengan *Artemia salina* Leach dan biakan sel (*cell line*) dapat digunakan sebagai penapisan awal untuk mendeteksi senyawa yang bersifat sitotoksik. Oleh karena itu diperlukan suatu metode untuk mendapatkan fraksi aktif yaitu dengan melakukan pengujian sitotoksik secara *in vitro* terhadap ekstrak dan fraksi herba sambiloto sebelum dibuat suatu sediaan obat.

Permasalahan yang dihadapi dalam pengembangan sambiloto menjadi bentuk sediaan oral padat, yakni ekstrak atau fraksi herba sambiloto yang mengandung andrografolid mempunyai kelemahan antara lain sukar larut dalam air (Qiang, 2007). Berbagai keberhasilan yang telah dilakukan untuk meningkatkan kelarutan andrografolid diantaranya dengan metode dispersi padat dan pembentukan kompleks (Ping, 2009; Radjaram *et al.*, 2000). Selain metode-metode yang telah dilakukan tersebut diatas, salah satu metode lain yang dapat digunakan untuk meningkatkan kelarutan yakni dengan teknik mikroenkapsulasi menggunakan bahan penyalut yang bersifat hidrofilik. Penyalutan bahan obat yang tidak larut dalam air ke dalam bahan pembawa polimer yang mudah larut seperti PVP K30 dan HPMC akan memungkinkan terbentuknya suatu model lapisan mikrodifusi, dimana partikel obat dalam keadaan halus akan terdispersi dalam pembawa yang mudah larut. Selain itu, teknik mikroenkapsulasi memberikan hasil berupa partikel berukuran kecil yang memungkinkan bagian-bagian obat dibagikan secara luas pada medium pelarut dengan demikian dapat meningkatkan kelarutan dan potensi penyerapan obat.

Pada penelitian ini, untuk memperbaiki kelarutan andrografolid dalam fraksi aktif herba sambiloto dilakukan mikroenkapsulasi dengan metode semprot

kering (*spray drying*) menggunakan PVP K30 dan HPMC sebagai material enkapsulasi. Metode semprot kering merupakan metode yang paling mudah dilakukan dan mempunyai beberapa keuntungan yaitu biaya rendah, teknologinya sudah banyak dikuasai, tersedianya peralatan, dan dapat digunakan untuk produksi mikrosfer dalam jumlah besar (Thies, 1996).

PVP K30 dan HPMC merupakan polimer hidrofilik dan banyak digunakan untuk memperbaiki kelarutan obat yang sukar larut dalam air (Rowe, 2006; Leuner dan Jennifer, 2000; Alanzi *et al.*, 2007). PVP merupakan polimer sintetik, larut dalam air, dan dapat ditemukan pada berbagai sistem penghantaran obat seperti mikrosfer, nanopartikel, liposom, dan polimer konjugasi (Garrec *et al.*, 2004; Wanawongthai *et al.*, 2009). Sedangkan HPMC merupakan polimer semi sintesis derivat selulosa yang umum digunakan pada matrik sediaan padat, dapat memperbaiki kelarutan, dan menghambat pembentukan kristalisasi obat (Leuner dan Jennifer, 2000; Rowe, 2006).

Ruang lingkup pada penelitian ini meliputi ekstraksi dan fraksinasi ekstrak etanol herba sambiloto; uji sitotoksik ekstrak dan fraksi herba sambiloto terhadap larva *Artemia salina* Leach dan dua kultur sel kanker payudara (MCF7 dan T47D); evaluasi dan karakterisasi fraksi etil asetat; pembuatan mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto serta evaluasi dan karakterisasinya. Harapan dari penelitian ini diperoleh suatu produk mikrosfer untuk pengembangan obat kanker yang berbasis bahan herbal dan dapat meningkatkan kelarutan andrografolid.

1.2 TUJUAN PENELITIAN

- 1.2.1 Mengetahui, membuat dan mengkarakterisasi fraksi aktif dari ekstrak etanol herba sambiloto yang menunjukkan aktifitas sitotoksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan dua kultur sel kanker payudara (MCF7 dan T47D).
- 1.2.2 Memperoleh mikrosfer fraksi aktif dari herba sambiloto yang berkhasiat sitotoksik menggunakan polimer PVP K30 dan HPMC untuk meningkatkan kelarutan andrografolid.

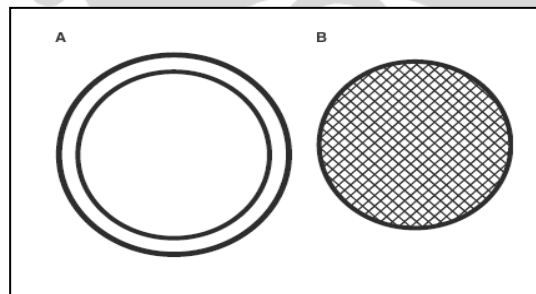
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 MIKROENKAPSULASI

2.1.1 Definisi

Mikroenkapsulasi adalah suatu proses penyalutan tipis suatu inti berupa padatan, cairan atau gas dengan suatu polimer sebagai dinding pembentuk mikrokapsul (Bakan, 1986). Penyalutan pada suatu padatan, cairan, atau gas dengan bahan lain untuk membentuk partikel disebut enkapsulasi. Istilah kapsul sering digunakan ketika zat terenkapsulasi (inti, agen aktif, bahan yang diisi, fase internal, atau nucleus) dikelilingi oleh material membran (enkapsulan, pembawa, penyalut, membran, cangkang atau dinding) sedangkan istilah *sphere* digunakan ketika inti terdispersi atau terlarut dalam pembawa (Senatore, 2008).

Mikrosfer dapat didefinisikan sebagai partikel padat berbentuk sferis yang mempunyai ukuran antara 1-1.000 μm . Terdapat dua jenis mikrosfer yaitu mikrokapsul dan mikromatrik (Gambar 2.1). Pada mikrokapsul, bahan inti terperangkap sepenuhnya dan dikelilingi oleh dinding kapsul, sedangkan pada mikrometriks, bahan inti terperangkap dan terdispersi seluruhnya pada matriks mikrosfer (Swarbrick, 2007).



Gambar 2.1. Diagram skematik ilustrasi mikrosfer. (A) mikrokapsul yang terdiri dari partikel inti yang terenkapsulasi dan (B) mikromatriks yang terdiri dari bahan aktif yang terdispersi homogen dalam partikel (Swarbrick, 2007).

Mikrosfer dapat dibuat dari polimer sintetik seperti asam polilaktat dan asam poliglikolat; polimer alam seperti albumin dan gelatin; dan polimer alam yang dimodifikasi seperti pati, gum, protein, lemak dan lilin. Mikrosfer umumnya

digunakan untuk penghantaran obat dengan pelepasan terkendali. Polimer yang digunakan pada mikrosfer dapat memberikan pelepasan obat yang lambat, terkendali dan dapat diprediksi sepanjang waktu tertentu (Swarbrick, 2007).

2.1.2 Keuntungan mikrosfer

Keuntungan dari penggunaan mikrosfer pada industri farmasi antara lain adalah dapat menutupi rasa dan bau yang tidak enak, mengubah minyak dan cairan menjadi padatan, melindungi obat terhadap pengaruh lingkungan (kelembaban, cahaya, panas, dan oksidasi), memperlambat penguapan, memperbaiki proses (kelarutan, dispersi dan sifat alir), serta untuk menghasilkan suatu produk lepas lambat, lepas terkendali dan lepas tertuju (Swarbrick, 2007; Ghosh, 2006).

2.1.3 Komponen mikrosfer

Bahan - bahan yang digunakan pada pembuatan mikrosfer pada prinsipnya ada tiga, yaitu :

2.1.3.1 Bahan inti

Bahan inti adalah bahan yang spesifik akan disalut, dapat berupa cairan atau padatan. Bahan inti cair berupa bahan terdispersi atau terlarut. Bahan inti padat berupa zat tunggal atau campuran zat aktif dengan pembawa lain seperti stabilisator, pengisi, penghambat atau pemacu pelepasan bahan aktif dan sebagainya. Bahan inti yang digunakan sebaiknya tidak bereaksi dengan bahan penyalut dan pelarut yang digunakan (Bakan, 1986; Ghosh, 2006).

2.1.3.2 Bahan penyalut

Bahan penyalut adalah bahan yang digunakan untuk menyalut inti dengan tujuan tertentu. Bahan penyalut harus mampu memberikan suatu lapisan tipis yang kohesif dengan bahan inti, dapat bercampur secara kimia dan tidak bereaksi dengan bahan inti, dan mempunyai sifat yang sesuai dengan tujuan penyalut. Bahan penyalut yang digunakan dapat berupa polimer alam, semi sintesis maupun sintesis (Bakan, 1986).

2.1.3.3 Pelarut

Pelarut adalah bahan yang digunakan untuk melarutkan bahan penyalut dan mendispersikan bahan inti. Pemilihan bahan pelarut berdasarkan sifat kelarutan dan kestabilan zat aktif dan bahan penyalut, keamanan dalam proses, dan pertimbangan ekonomis. Pelarut tidak melarutkan atau hanya sedikit melarutkan bahan inti tetapi dapat melarutkan bahan penyalut (Swarbrick, 2007).

2.1.4 Metode mikroenkapsulasi

Metode mikroenkapsulasi cukup beragam. Berdasarkan sifatnya, tipe pembuatan mikroenkapsulasi dibagi dalam dua proses yaitu proses kimia dan mekanik. Proses kimia terdiri dari kompleks koaservasi, polimer-polimer tidak tercampur, polimerisasi antar permukaan, polimerisasi *in situ*, dan penguapan pelarut. Sedangkan proses mekanik terdiri dari semprot kering, semprot beku, penyalutan dalam panci, ekstruksi sentrifugal dan suspensi kering (Thies, 1996).

Metode yang umum digunakan dalam bidang farmasi meliputi semprot kering, semprot beku, koaservasi, suspensi udara, polimerisasi antar permukaan, penguapan pelarut dan penyalutan dalam panci (Bakan, 1986).

2.1.4.1 Proses kimia

a. Pemisahan koaservasi

Metode koaservasi merupakan salah satu teknik mikroenkapsulasi yang digunakan untuk berbagai produk. Prinsip dari metode ini adalah pemisahan larutan polimer hidrofilik dalam dua fase, yaitu fase kaya polimer dan fase cairan pengencer. Koaservasi dapat dibagi menjadi koaservasi sederhana dan koaservasi kompleks yang bergantung pada jumlah polimer yang digunakan dalam pembuatan mikropartikel. Koaservasi sederhana hanya menggunakan satu polimer contoh gelatin, polivinil alkohol, karboksil metilselulosa. Pemisahan fase dapat dipicu oleh adanya dehidrasi atau desolvasi dari fase polimer. Kondisi ini termasuk penambahan *non-solven* (contoh: etanol, aseton, dioksan, dan isopropanol), penambahan garam-garam anorganik (contoh: natrium sulfat), dan perubahan temperatur. Sedangkan koaservasi kompleks menggunakan dua polimer hidrofilik dengan muatan yang berlawanan (Thies, 1996; Swarbrick, 2007).

b. Polimerisasi antar permukaan

Prinsip metode ini adalah dua cairan yang tidak saling bercampur, yang masing-masing mengandung monomer reaktif yang berbeda, didispersikan satu sama lainnya dalam bentuk globul halus dan pada permukaan kedua cairan tersebut terjadi polimerisasi. Biasanya digunakan dua monomer yang reaktif, yaitu monomer larut dalam air dan monomer yang larut dalam pelarut organik, dimana satu monomer dilarutkan setelah satu tahap emulsifikasi dari fase terdispersi tersebut. Kedua monomer akan berpolimerisasi pada permukaan antara dua cairan sehingga membentuk lapisan penyalut (Swarbrick, 2007).

c. Polimerisasi *in situ*

Prinsip metode ini mirip dengan polimerisasi antarmuka, perbedaannya adalah metode ini hanya menggunakan satu jenis monomer yang berada dalam salah satu fase yaitu fase inti atau fase luarnya saja. Jika inti berupa zat-zat padat, maka monomer dilarutkan kedalam fase luar atau medium, sedangkan jika inti berupa cairan maka monomer dilarutkan didalamnya. Proses polimerisasi terjadi karena penambahan katalis yang dapat dilakukan pada fase luar atau fase inti, sehingga membentuk suatu lapisan polimer yang menyelimuti seluruh permukaan inti. Syarat dari metode ini adalah polimer penyalut yang terbentuk harus tidak larut dalam medium yang digunakan (Thies, 1996).

d. Penguapan pelarut

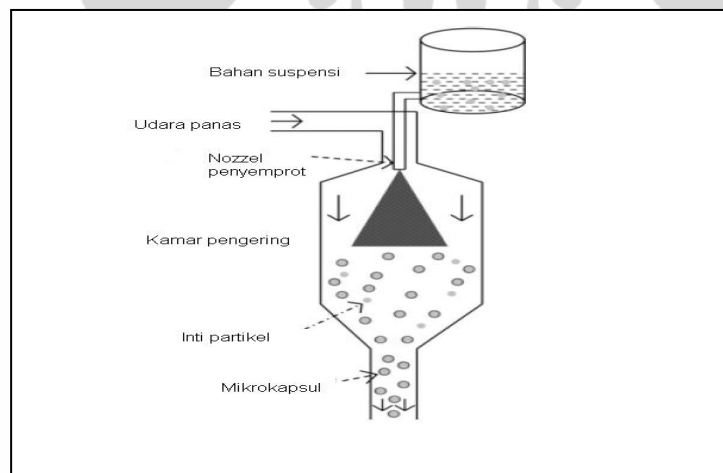
Penyalut mikrokapsul dilarutkan dalam suatu pelarut yang mudah menguap, yang tidak bercampur dengan fase cairan pembawa. Bahan inti dilarutkan atau didispersikan dalam larutan penyalut polimer. Dengan pengocokan campuran bahan penyalut inti terdispersi dalam fase cairan pembawa untuk mendapatkan ukuran mikrokapsul yang sesuai. Campuran jika perlu dipanaskan untuk menguapkan pelarut untuk polimer. Bila bahan inti terdispersi dalam larutan polimer, polimer berkumpul sekeliling inti. Bila bahan inti terlarut dalam larutan polimer penyalut, terbentuk mikrokapsul tipe matriks. Mikrokapsul dapat digunakan dalam bentuk suspensi, terlarut dalam substrat atau diisolasi sebagai serbuk (Bakan, 1986).

2.1.4.2 Proses mekanik

a. Semprot kering

Semprot kering atau *spray drying* dapat didefinisikan sebagai suatu proses perubahan dari bentuk cair (larutan, dispersi atau pasta) menjadi bentuk partikel-partikel kering oleh suatu proses penyemprotan bahan ke dalam medium pengering yang panas (Kissel, 2006).

Prinsip mikroenkapsulasi dengan semprot kering meliputi proses pendispersian bahan inti ke dalam larutan penyalut, kemudian pelarut penyalut tersebut dikeringkan dengan menyemprotkan campuran tersebut dengan udara panas pada kamar pengering (Gambar 2.2). Udara panas tersebut akan menguapkan pelarut sehingga terbentuk mikrosfer (Ghosh, 2006). Proses pengeringan dengan semprot kering terdiri dari empat tahap yaitu pengabutan (*atomization*), pencampuran semprot dan udara, penguapan pelarut, dan pemisahan produk dari alat (Kissel, 2006).



Gambar 2.2. Skematik ilustrasi mikroenkapsulasi dengan semprot kering (Ghosh, 2006)

Bentuk ukuran mikrosfer dengan menggunakan metode semprot kering dikontrol oleh laju penyemprotan, laju pemasukan larutan penyalut dan bahan inti, ukuran nozzel, temperatur dan ukuran kamar pengering. Kualitas dari semprot kering dapat ditingkatkan dengan penambahan *plasticizers* yang mendorong terjadinya pembentukan film dan koalesensi polimer, sehingga meningkatkan permukaan mikrosfer yang halus dan sferis (Swarbrick, 2007).

Beberapa keuntungan penggunaan semprot kering yaitu metodenya sederhana, ekonomis, teknologinya sudah banyak dikuasai, tersedianya peralatan, dan dapat digunakan untuk produksi mikrosfer dalam jumlah besar (Thies, 1996).

b. Semprot beku

Proses semprot beku atau *spray chilling* sama dengan semprot kering, meliputi pendispersian bahan inti dalam bahan penyalut yang dicairkan, dan penyemprotan campuran inti-penyalut ke dalam suatu kondisi lingkungan dimana pemadatan yang relatif cepat dari penyalutan diganggu. Perbedaan antara kedua metode ini adalah cara dilaksanakan pemadatan penyalut. Pemadatan pada metode semprot beku dilaksanakan dengan pembekuan secara termal suatu bahan penyalut yang melebur, atau dengan memadatkan suatu penyalut yang dilarutkan dengan memasukan bahan inti dan bahan penyalut ke dalam suatu bukan pelarut. Penghilangan bahan bukan pelarut atau pelarut dengan cara teknik peresapan, ekstraksi atau penguapan. Sedangkan pada semprot kering dipengaruhi oleh penguapan cepat dari pelarut dimana bahan penyalut dilarutkan (Bakan, 1986).

c. Penyalutan dalam panci

Mikroenkapsulasi dengan menggunakan metode penyalutan dalam panci telah luas digunakan dalam industri farmasi. Pada metode ini penyalut digunakan sebagai satu larutan atau sebagai semprotan halus ke suatu bahan inti padat di dalam panci penyalut. Untuk memindahkan larutan penyalut, biasanya air hangat digunakan pada bahan-bahan tersalut saat penyalutan ada di dalam panci penyalut. Penghilangan penyalut dilakukan dalam oven pengering (Bakan, 1986).

d. Suspensi udara

Prinsip metode ini adalah partikel inti didispersikan ke dalam arus udara dan pada tempat-tempat tertentu mengalami penyalutan oleh polimer yang disemprotkan secara berkala. Metode suspensi udara, digunakan untuk bahan inti yang tahan panas dengan menggunakan medium udara/gas dan penyalut polimer (Deasy, 1984).

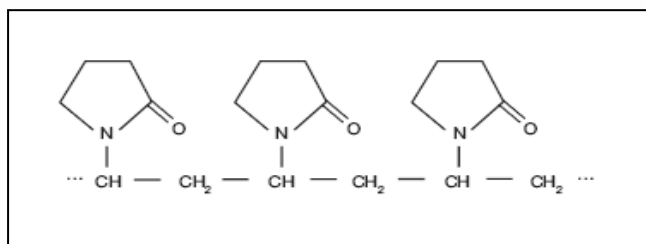
2.2 POLIMER PENYALUT

Pemilihan bahan penyalut yang tepat sangat menentukan hasil sifat fisika dan kimia dari mikrosfer yang dihasilkan. Bahan penyalut yang dapat digunakan pada proses mikroenkapsulasi dengan semprot kering adalah penyalut larut dalam air dan penyalut yang tidak larut air. Contoh bahan penyalut yang larut dalam air antara lain hidroksipropilmetilselulosa, hidroksipropilselulosa, gelatin, polivinilpirolidon, polivinilalkohol, amilum, dan gom arab sedangkan contoh penyalut yang tidak larut dalam air adalah etilselulosa, polimetakrilat, dan spermaceti (Deasy, 1984; Bakan, 1986).

Salah satu pertimbangan pemilihan bahan penyalut adalah bahan penyalut harus dapat memenuhi tujuan penyalutan yaitu untuk meningkatkan pelarutan obat. Dalam penelitian ini, polimer penyalut yang digunakan harus dapat larut dalam air karena bahan obat yang digunakan merupakan bahan yang sukar larut dalam air sehingga dapat mempercepat proses pembasahan partikel dan selanjutnya akan meningkatkan kelarutan. Polimer PVP dan HPMC merupakan polimer yang umum digunakan dalam penyalutan, mudah di dapat, harganya lebih murah, dan sangat mudah larutan dalam air (Ruan *et al.*, 2007)

2.2.1 Polivinilpirolidon

Polivinilpirolidon (PVP) merupakan suatu polimer sintetik yang terdiri atas kelompok linier *1-vinyl-2-pyrrolidinone*. Nama lain dari PVP adalah *kollidon*; *pladone*; *poly[1-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)ethylene]*; *polyvidone*; *povidone*; *PVP*; *1-vinyl-2-pyrrolidinone polymer*. Nama kimia adalah *1-ethenyl-2-pyrrolidinone homopolymer*. PVP diperoleh dari polimerisasi radikal bebas vinilpirolidon di dalam air atau 2-propanolol. Dalam berbagai bentuk polimer PVP memiliki rumus molekulnya $(C_6H_9NO)_n$, bobot molekul berkisar antara 2.500-3.000.000, dan rumus strukturnya dapat dilihat pada Gambar 2.3. (Rowe, 2006).



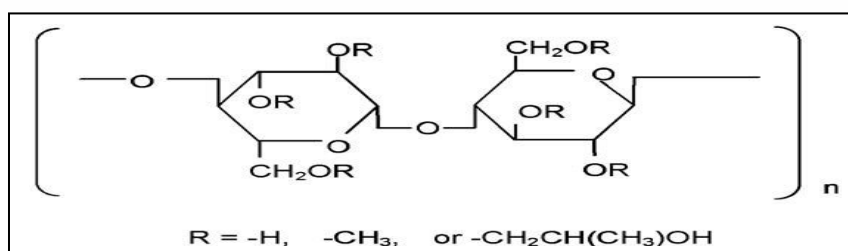
Gambar 2.3. Struktur kimia PVP (Volker, 2005).

PVP memiliki pemerian berupa serbuk halus berwarna putih hingga cream, tidak berbau, tidak berasa, inert, non toksik dan higroskopis. PVP mudah larut dalam air, larut dalam pelarut organik seperti etanol, metanol, alkohol polihidrat, asam ester, keton, metilen klorida, kloroform, etilen diklorida, butilamin, dan piridin. Praktis tidak larut dalam eter, hidrokarbon dan minyak mineral (Rowe, 2006).

PVP telah banyak digunakan dalam bidang farmasi dan kesehatan, antara lain sebagai pengikat, suspending agent, penstabil atau peningkat viskositas. Dalam formulasi sediaan farmasetika PVP digunakan sebagai bahan pengikat atau penyalut (*coating*) 0,5-5%; *suspending agent* dan pendispersi hingga 5%; dan pembawa obat 10-25%. PVP dapat membentuk kompleks larut dalam air dengan zat aktif yang sukar larut. Komplek yang terbentuk dapat digunakan dalam teknologi farmasetik untuk memperbaiki kelarutan obat yang sukar larut (Rowe, 2006; Volker, 2005). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa PVP dapat membantu meningkatkan kelarutan obat yang sukar larut dalam air (Ruan *et al.*, 2005; Alanazi *et al.*, 2007; Ahire *et al.*, 2007)

2.2.2 Hidroksiopropilmetilselulosa

Hidroksiopropilmetilselulosa (HPMC) merupakan polimer semi sintetik turunan selulosa yang bersifat hidrofilik. Nama lain HPMC adalah *benecel MHPC E464*, *hydroxypropyl methylcellulose*, *methocel*, *methylcellulose propylene glycol ether*, *methyl hydroxypropylcellulose*, *metholose*, *pharmacoat*, *thylopur*. Nama kimianya *cellulose,2-hydroxypropyl methyl ether* (Rowe, 2006). Struktur kimia HPMC ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Struktur kimia HPMC (Obara dan Kokubo, 2008)

HPMC merupakan campuran eter selulosa yang terdiri dari 16,5 - 30 % gugus hidroksi yang termetilasi dan 4 - 32 % gugus hidroksipropil, tergantung dari tipe substitusinya masing-masing. Tipe substitusi tersebut akan berpengaruh pada kecepatan hidrasi dari partikel-partikel HPMC serta kekuatan gelnya yang akhirnya akan mempengaruhi profil disolusinya (Leuner dan Jennifer, 2000).

HPMC memiliki pemberian berupa serbuk granul berwarna putih, praktis tidak berbau dan tidak berasa. HPMC mempunyai berat molekul dengan rentang 10.000 – 1.500.000. HPMC larut dalam air, praktis tidak larut dalam kloroform, etanol, dan eter tetapi larut dalam campuran etanol dengan diklormetan, dan campuran metanol dengan diklormetan. HPMC telah banyak digunakan sebagai sistem pembawa untuk memperbaiki laju pelepasan dan bioavailabilitas obat yang sukar larut dalam air. Selain itu HPMC dapat digunakan untuk menghambat rekristalisasi obat (Rowe, 2006; Leuner dan Jennifer, 2000). Penelitian Alanzi (2007) menunjukan HPMC dapat membantu meningkatkan kelarutan obat yang sukar larut dalam air.

2.3 PENINGKATAN KELARUTAN OBAT

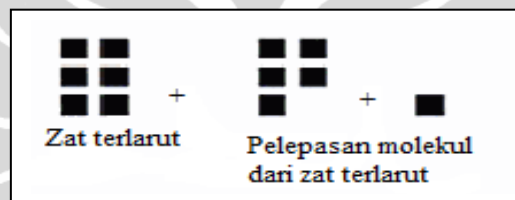
Efektifitas terapi dari suatu obat tergantung pada ketersediaan hayati dan kelarutan molekul obat. Kelarutan merupakan salah satu parameter penting untuk tercapainya konsentrasi obat ke dalam sirkulasi sistemik terhadap respon farmakologi yang diinginkan (Anil, 2007).

Kelarutan adalah massa zat terlarut yang larut dalam sejumlah massa tertentu atau volume terlarut pada suhu tertentu (Shargel, 2005). Kelarutan juga dapat didefinisikan sebagai konsentrasi dari zat terlarut di dalam larutan ketika kesetimbangan terjadi antara fase zat terlarut murni dan fase larutan. Kelarutan

suatu zat dinyatakan sebagai konsentrasi zat terlarut di dalam larutan jenuh pada suhu dan tekanan tertentu (Neau, 2008).

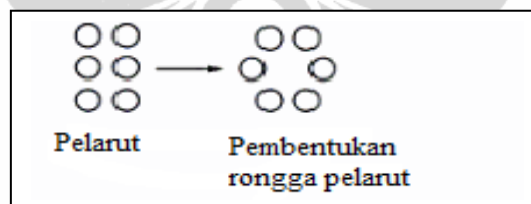
Proses pelarutan suatu bahan dapat digambarkan menjadi tiga tahap, yaitu:

a. Tahap pertama pemindahan suatu molekul zat dari zat terlarut pada temperatur tertentu. Kerja yang dilakukan dalam memindahkan satu molekul dari zat terlarut sehingga dapat lewat ke wujud uap membutuhkan pemecahan ikatan antara molekul-molekul berdekatan. Kerja pemecahan antara dua molekul adalah $2W_{22}$, dimana 22 adalah interaksi antara molekul zat terlarut. Tetapi apabila molekul melepaskan diri dari fase terlarut, rongga yang ditinggalkan tertutup dan setengah dari energi diterima kembali. Penerimaan energi potensial untuk proses ini adalah W_{22} , secara skematis dapat digambarkan sebagai berikut.



Gambar 2.5. Proses pemindahan suatu molekul zat dari zat terlarut

b. Tahap kedua pembentukan rongga dalam pelarut yang cukup besar untuk menerima molekul zat terlarut. Energi yang dibutuhkan pada tahap ini adalah W_{11} . Bilangan 11 menunjukkan bahwa interaksi terjadi antar molekul-molekul pelarut.



Gambar 2.6. Proses pembentukan rongga dalam pelarut

c. Tahap ketiga molekul zat terlarut akhirnya ditempatkan dalam rongga pelarut. Rongga dalam pelarut kemudian tertutup. Pada keadaan ini, terjadi penurunan energi potensial sebesar $-W_{12}$, angka 12 adalah energi interaksi zat terlarut dengan pelarut.



Gambar 2.7. Proses penempatan zat terlarut kedalam rongga pelarut

Secara keseluruhan, energi (W) yang dibutuhkan untuk semua tahapan proses tersebut adalah $W = W_{22} + W_{11} - 2W_{12}$. Semakin besar W atau selisih energi yang dibutuhkan pada tahap satu dan dua dengan energi yang dilepaskan pada tahap tiga, maka semakin kecil kelarutannya (Florence, 2007; Martin, 1993).

Faktor-faktor yang mempengaruhi kelarutan bahan obat antara lain, yaitu :

a. Ukuran partikel

Ukuran partikel mempengaruhi kelarutan karena pengurangan ukuran partikel zat dapat meningkatkan luas permukaan kontak zat aktif dan pelarut.

b. Suhu

Suhu akan mempengaruhi kelarutan. Jika proses larutan menyerap energi maka kelarutan akan meningkat karena suhu meningkat. Jika proses larutan melepaskan energi maka kelarutan akan berkurang dengan meningkatnya suhu. Umumnya, peningkatan suhu larutan akan meningkatkan kelarutan suatu zat terlarut padat.

c. pH

Bentuk terion suatu zat lebih mudah larut dalam pelarut air daripada bentuk tak terion. Kelarutan basa lemah akan turun dengan naiknya pH sedangkan asam lemah akan meningkat kelarutannya dengan naiknya pH.

d. Polaritas

Polaritas dari molekul zat terlarut atau pelarut akan mempengaruhi kelarutan. Molekul zat terlarut nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar dan molekul zat terlarut polar akan larut dalam pelarut polar.

Beberapa teknik yang tersedia untuk meningkatkan kelarutan obat yaitu dengan pendekatan modifikasi fisik dan modifikasi kimia. Contoh modifikasi fisik yaitu dengan penurunan ukuran partikel, perubahan bentuk kristal, mendispersikan obat dalam bahan pembawa, pembentukan kompleks, dan

penambahan surfaktan sedangkan contoh modifikasi kimia yaitu dengan pembentukan garam dan ester (Anil, 2007; Soeratri, 1993).

2.4 DISOLUSI PARTIKEL OBAT

Seperti diketahui laju penyerapan zat aktif merupakan fungsi dari laju disolusi zat aktif dalam cairan biologis. Dengan demikian semua faktor yang mempengaruhi laju disolusi juga akan mempengaruhi laju penyerapan. Untuk zat aktif yang sukar larut, biasanya laju disolusi menjadi langkah penentu dari proses absorpsi, sedangkan untuk zat aktif yang mudah larut biasanya permeabilitas membran saluran pencernaan menjadi penentunya (Shargel *et al*, 2004; Soeratri, 1993).

Laju disolusi dapat didefinisikan sebagai jumlah obat yang terlarut per satuan waktu. Salah satu teori tentang disolusi yang memberikan penjelasan tentang parameter-parameter yang mempengaruhi proses pelarutan, digambarkan dengan persamaan Noyes-Whitney.

$$\frac{dC}{dt} = k S (C_s - C) \quad (2.1)$$

Dimana : $\frac{dC}{dt}$ adalah laju disolusi, k adalah tetapan laju pelarutan, S adalah luas permukaan zat padat yang menyentuh larutan, C_s adalah kelarutan zat aktif dalam pelarut yang relatif sama dengan konsentrasi jenuh dan C adalah jumlah zat aktif yang terlarut pada waktu t .

Selain itu dikenal pula persamaan Nerns-Brunner yang menyatakan bahwa pelarutan terjadi dengan perantara lapisan difusi.

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D S}{v h} (C_s - C) \quad (2.2)$$

Dimana : $\frac{dC}{dt}$ adalah laju disolusi, D adalah koefisien difusi zat aktif yang terlarut dalam pelarut, S adalah luas permukaan zat padat yang menyentuh larutan, v adalah volume medium disolusi, h adalah ketebalan lapisan difusi, C_s adalah konsentrasi jenuh zat aktif, dan C adalah jumlah zat aktif yang terlarut dalam waktu t .

Persamaan Noyes-Whitney atau Nerns-Brunner menunjukkan bahwa laju disolusi berbanding lurus dengan luas permukaan efektif dari zat aktif yang

kontak dengan pelarut. Dengan demikian parameter yang dapat mempengaruhi laju disolusi partikel zat aktif antara lain luas permukaan efektif (S) dan kelarutan obat (C_s) (Shargel *et al.*, 2004; Soeratri, 1993; Abdou, 1989).

Untuk meningkatkan laju disolusi zat aktif dapat dilakukan dengan pendekatan farmasetik dan modifikasi fisik, yakni dengan mengubah atau menambah bahan tambahan dalam formulasinya dan memperkecil ukuran partikel dari bahan obatnya. Keuntungan dari pendekatan ini adalah dapat peningkatan kelarutan dari obat dengan menambah luas permukaan dari obat, sehingga dosis yang akan digunakan menjadi berkurang (Soeratri, 1993; Abdou, 1989). Kedua pendekatan tersebut dapat dicapai dengan mendispersikan bahan obat dalam bahan pembawa yang bersifat hidrofilik dan menerapkan teknik mikroenkapsulasi dengan metode semprot kering. Penyalutan bahan obat yang tidak larut dalam air ke dalam bahan pembawa polimer yang mudah larut dalam air memungkinkan terbentuknya suatu model lapisan mikrodifusi, dimana partikel obat dalam keadaan halus akan terdispersi dalam pembawa yang mudah larut. Selain itu, mikroenkapsulasi dapat menghasilkan produk partikel yang berukuran kecil dan homogen yang memungkinkan bagian-bagian obat dibagikan secara luas dengan demikian dapat meningkatkan laju disolusi zat aktif.

2.5 SAMBILOTO

Sambiloto yang dikenal sebagai "King of Bitter" merupakan tanaman herba semusim. Tanaman ini di duga berasal dari Asia Tropik. Sambiloto dikenal dengan berbagai nama. Masyarakat Jawa Tengah dan Jawa Timur menyebutnya dengan nama bidara, sambitroto, sandiroto, sadilata, sambiloto, takilo, paitan, dan sambiloto. Di Jawa Barat disebut ki oray, takila, atau ki peurat. Di Bali lebih dikenal dengan samiroto. Masyarakat Sumatera dan sebagian masyarakat Melayu menyebutnya dengan pepaitan atau ampadu. Sementara itu nama-nama asing sambiloto adalah *chuan xin lian*, *yi xian xi*, dan *lan he lian* (China), *kalmegh*, *kirayat* dan *kirata* (India), *nilavenbu* (Tamil), *xuyen tam lien* dan *cong-cong* (Vietnam), *quasabhuva* (Arab), *nainehavandi* (Persia), *green chirreta* dan *king of bitter* (Inggris). Nama ilmiah sambiloto adalah *Andrographis paniculata* Nees. Memiliki beberapa sinonim, yakni *Justicia paniculata* Burm., *Justicia stricta*

Lamrk., dan *Justicia latebrosa* Russ (Qiang, 2007; Depkes RI, 1979). Morfologi tanaman sambiloto dapat dilihat pada Gambar 2.8 berikut.



Gambar 2.8. Morfologi tanaman sambiloto.

2.5.1 Klasifikasi

Sambiloto secara taksonomi memiliki klasifikasi sebagai berikut (Chase dan Reveal, 2009; Depkes RI, 2000^a; Tjitrosoepomo, 1991).

Kerajaan	Plantae
Sub kerajaan	Tracheobionta
Super divisi	Magnoliophyta
Divisi	Magnoliopsida
Ordo	Lamiales
Suku	Acanthaceae
Tribe	Justiceae
Marga	<i>Andrographis</i>
Jenis	<i>Andrographis paniculata</i> Nees

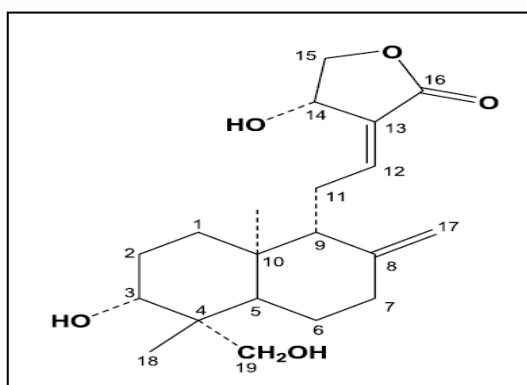
2.5.2 Morfologi tanaman

Tanaman sambiloto mempunyai tinggi 40-90 cm, percabangan banyak dengan letak yang berlawanan, cabang berbentuk segi empat dan tidak berambut. Bentuk daun lanset, ujung daun dan pangkal daun tajam atau agak tajam, tepi daun rata, panjang daun 3-12 cm dan lebar 1-3 cm, panjang tangkai daun

5-25 mm, daun bagian atas bentuknya seperti daun pelindung. Perbungaan tegak bercabang-cabang, gagang bunga 3-7 mm, panjang kelopak bunga 3-4 mm. Bunga berbibir berbentuk tabung, panjang 6 mm, bibir bunga bagian atas berwarna putih dengan warna kuning dibagian atasnya, ukuran 7-8 mm. Bibir bunga bawah lebar berbentuk biji, berwarna ungu dan panjang 6 mm. Tangkai sari sempit dan melebar pada bagian pangkal, panjang 6 mm. Bentuk buah jorong dengan ujung yang tajam, panjang lebih kurang 2 cm, bila tua akan pecah terbagi menjadi empat. Biji kecil, bulat masih muda putih kotor setelah tua coklat. Akar tunggang berwarna putih kecoklatan (Depkes RI, 1979; Depkes RI, 2000^a).

2.5.3 Kandungan kimia

Kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak sambiloto adalah diterpen, flavonoid dan stigmasterol (Kumar, 2004). Kandungan utama tanaman sambiloto adalah diterpen lakton meliputi andrografolid, deoksiandrografolid, 11,12-didehidro-14-deoksiandrografolid, neoandrografolid, andrografisid, deoksiandrografisid, andropanoside, 14-deoksiandrografolid, isoandrografolid, 14-deoksiandrografolid-19- β -D-glukosid, homoandrografolid, andrografan, andrografosterin, dan stigmasterol (Jarukamjorn dan Nabuo, 2008; WHO, 2002). Komponen bioaktif dari sambiloto adalah andrografolid dan beberapa struktur kimia lain. Selain sebagai komponen bioaktif, andrografolid digunakan sebagai *marker* untuk kontrol kualitas produk sambiloto (Daodee *et al*, 2006). Struktur andrografolid dapat dilihat pada Gambar 2.9 berikut.



Gambar 2.9. Struktur molekul andrografolid (Jarukomjorn dan Nobuo, 2008).

Andrografolid berupa kristal berwarna putih, mempunyai rasa sangat pahit dengan rumus molekul $C_{20}H_{30}O_5$, dan berat molekul 350,46. Senyawa ini larut dalam metanol, etanol, aseton, piridin, kloroform, asam asetat, sukar larut dalam air dan tidak larut dalam etil eter. Kelarutan andrografolid dalam air pada suhu $25^{\circ}C$ adalah 60 mg/L. Andrografolid mempunyai titik leleh $218-221^{\circ}C$ dan memiliki panjang gelombang maksimal 223 nm (Qiang, 2007; Ping, 2009). Stabilitas andrografolid dalam fase padat sangat dipengaruhi oleh bentuk kristal. Kristal andrografolid stabil pada suhu $70^{\circ}C$ selama periode 3 bulan dan dalam bentuk amorf mudah mengalami degradasi membentuk 14-deoxy-11,12-dihidroandrografolid (Lomlin *et al.*, 2003).

2.5.4 Aktifitas farmakologi dan penggunaan

Berdasarkan aktifitas farmakologinya sambiloto dapat digunakan sebagai antiinflamasi, antidiare, antiviral, antimalaria, hepatoprotektor, kardiovaskular, antikanker, immunostimulan, hipoglikemik, dan antifertilitas (Jarukomjorn dan Nobuo, 2008).

Sambiloto telah digunakan dalam pengobatan dan di dukung oleh data klinis untuk mencegah dan menangani gejala infeksi saluran pernapasan seperti flu, sinusitis, bronkitis dan faringotonsilitis, infeksi saluran urin, dan diare akut. Sedangkan penggunaan sambiloto dalam sistem pengobatan tradisional digunakan untuk mengobati disentri, bronkitis, kolitis, batuk, dispepsia, demam, hepatitis, malaria, radang tenggorokan, tuberkulosis dan digigit serangga (WHO, 2002).

2.6 EKSTRAKSI

Ekstraksi adalah penyarian senyawa yang terdapat dalam simplisia tanaman dengan menggunakan pelarut atau larutan penyari yang sesuai dengan cara yang tepat sehingga diperoleh hasil secara kualitatif dan kuantitatif memenuhi persyaratan. Pemilihan larutan penyari ini berdasarkan pada kelarutan zat-zat berkhasiat dalam pelarut dan tidak menyebabkan rusaknya zat berkhasiat tersebut. Hasil dari proses ekstraksi disebut ekstrak (Harbone, 1987).

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut

yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 1995).

Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai metode yaitu dengan cara dingin dan cara panas. Ekstraksi pada suhu kamar atau cara dingin dapat dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dan perkolasi. Ekstraksi pada suhu panas dapat dilakukan dengan menggunakan metode refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekok (Depkes RI, 2000^b).

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat dipisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa yang diinginkan. Dalam hal ekstrak total, maka cairan pelarut yang dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Faktor utama untuk pertimbangan pada pemilihan cairan penyari adalah selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan dan keamanan (Depkes, 2000^b).

2.7 UJI SITOTOKSIK

Pengembangan obat baru untuk penyakit kanker diawali dengan uji *in vitro* dan uji *in vivo*. Pengujian secara *in vitro* dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai jenis sel kanker seperti sel MCF7 dan T47D. sedangkan pengujian secara *in vivo* dilakukan menggunakan model tumor pada hewan. Pengujian sitotoksik secara *in vitro* dapat digunakan sebagai penapisan awal untuk mendeteksi senyawa-senyawa yang bersifat sitotoksik. Pengujian ini lebih cepat, murah, hanya membutuhkan sedikit bahan uji jika dibanding dengan pengujian secara *in vivo*.

2.7.1 *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan salah satu metode uji biologi yang bersifat penapisan awal bagi senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Metode ini

dapat dilakukan secara cepat (24 jam), sederhana, mudah, murah, dan jumlah sampel yang digunakan kecil (2-20 mg atau kurang). Tujuan metode ini menyediakan informasi hasil skrining awal untuk dapat mendukung uji biologi yang lebih canggih dan spesifik dari komponen aktif yang diisolasi. Beberapa senyawa bioaktif yang telah berhasil diisolasi dimonitor aktivitasnya dengan BSLT menunjukkan adanya korelasi antara toksisitas BSLT dan sitotoksik ke arah *cell line* dan tumor padat lainnya. BSLT dapat mengidentifikasi aktivitas antikanker tetapi terbatas dalam kapasitas prediksinya untuk membedakan antara potensi komponen antikanker kuat, sedang dan lemah (Meyer *et al.*, 1982; Colegate dan Molyneux, 2008).

Meyer, *et al.*, 1982 menggunakan metode BSLT untuk penapisan senyawa aktif pada ekstrak tanaman, fraksi atau senyawa murni yang ditunjukkan dengan tingkat toksisitas terhadap larva *A. salina* Leach. Dalam metode BSLT, tingkat toksisitas senyawa dinyatakan dengan nilai LC_{50} (*lethal concentration*). LC_{50} adalah nilai konsentrasi senyawa yang memberikan tingkat kematian sebesar 50%. Senyawa aktif akan memberikan kematian yang tinggi. Semakin kecil nilai LC_{50} maka semakin besar toksisitasnya. Suatu sampel dikatakan memperlihatkan toksisitas terhadap larva *A. salina* Leach bila mempunyai LC_{50} kurang dari 1.000 ppm (McLaughlin, 1991).

2.7.2 MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazolium bromida) assay

Salah satu uji sitotoksik terhadap sel kanker yang paling mudah dilakukan adalah menggunakan metode MTT *assay* (Alley *et al.*, 1988; Doyle dan Griffiths, 2000). MTT adalah (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazolium bromida). Pengujian sitotoksik dengan metode MTT bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak melalui pengamatan proliferasi dan viabilitas sel. Prinsip uji MTT adalah konversi garam tetrazolium membentuk formazan berwarna ungu oleh enzim suksinat dehidrogenase dari mitokondria sel hidup yang dapat diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 570 nm. Semakin berwarna ungu menunjukan semakin banyak sel yang hidup. Keuntungan pada pengujian ini relatif cepat, lebih mudah, sensitif, dan akurat. Mudah karena dapat dilakukan terhadap sampel dalam jumlah sedikit. Akurat karena MTT hanya berikatan

dengan sel hidup sehingga hasil absorbansi yang diperoleh menggambarkan dengan tepat dari jumlah sel (Loo dan Rillema, 1998).

Pada uji sitotoksik menggunakan sel kanker, hambatan proliferasi sel dinyatakan dalam IC_{50} (*inhibitory concentration*) (Doyle dan Griffiths, 2000). Nilai IC_{50} adalah nilai respon yang pada konsentrasi tertentu menimbulkan hambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi sel yang sama dalam waktu yang spesifik dan kondisi percobaan yang sesuai. Semakin kecil harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin toksik (Hartati, *et al.*, 2003). Suatu ekstrak dikatakan memiliki potensi sebagai antikanker bila mempunyai nilai IC_{50} kurang dari 20 ppm (Suffnees dan Pezzuto, 1991).

Cell line adalah sel yang berasal dari tumor atau jaringan yang dibiakan secara berkala, ditumbuhkembangkan dan dipelihara dalam medium yang tersedia, serta disimpan dalam nitrogen cair untuk melestarikan hidup sel dan mencegah kontaminasi. Sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel kanker payudara galur MCF7 dan T47D.

Sel MCF7 merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diambil dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel adherent (melekat) dan dapat mengekspresikan reseptor estrogen (ATCC^a).

Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi. Sel T47D dapat mengekspresikan calcitonin, reseptor androgen, reseptor progesterone, glucocorticoid, prolactin, dan reseptor estrogen (ATCC^b).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 LOKASI PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedik (LAPTIAB), Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, BPPT, kawasan PUSPIPTEK Serpong, Tangerang, Banten. Waktu pelaksanaannya dari bulan Juli 2009 hingga Agustus 2010.

3.2 BAHAN DAN ALAT

3.2.1 Bahan

Herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) diperoleh dari “Kebun Litro” Bandung, andrografolid (Sigma-Aldrich Inc, Jerman), Cisplatin® (Kalbe Farma, Indonesia), Polyvinylpyrrolidone K30 (PVP, kollidon K30) (BASF, Jerman), hidroksipropilmetilselulosa 3 mPa.s (HPMC, pharmacoat®) (ShinEtsu, Jepang), etanol destilata, etil asetat destilata, *n*-heksan destilata, metanol untuk KCKT (J.B. Baker, USA), *Artemia salina* Leach (Gold Artemia, USA), garam tanpa yodium, DMSO (Sigma-Aldrich Inc, Jerman), sel kanker payudara MCF7 dan T47D (koleksi Laboratorium Teknologi Farmasi dan Medika BPPT, Indonesia), MTT [3-(4,5-dimetilthiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazolium bromida] (Gibco, USA), medium Roswell Park Memorial Institute 1640 (Gibco, USA), fetal bovine serum (Biowest, USA), phosphate buffer saline (Gibco, Jerman), tripsin-EDTA 0,5% (Gibco, Jerman), trypan blue (Gibco, USA), sodium dodesil sulfat (Sigma-Aldrich Inc, Jerman), metanol (Merck, Jerman), kloroform (Merck, Jerman), etil asetat (Merck, Jerman), asam klorida 37% proanalisis (Merck, Jerman), kalium klorida proanalisis (Merck, Jerman), kalium dihidrogenfosfat proanalisis (Merck, Jerman), natrium hidroksida proanalisis (Merck, Jerman), asam sulfat proanalisis (Merck, Jerman), asam asetat anhidrat proanalisis (Merck, Jerman), etanol 96% proanalisis (Merck, Jerman), ferri klorida proanalisis (Merck, Jerman), amil alkohol (Merck, Jerman), serbuk magnesium (Merck, Jerman), amoniak 25% (Merck, Jerman), gelatin (Merck, Jerman), natrium klorida (Merck, Jerman), reagen Mayer LP, reagen Dragendorff LP.

3.2.2 Alat

Neraca analitik (Radwag, Polandia), mesin pengiling simplisia (Resch, Jerman), homogenizer (Heidolph, Jerman), penguap berputar (Heidolph, Jerman), oven (Memmert, Jerman), lampu TL (Philip, Indonesia), mikropipet (Biorad, USA), inkubator sel dengan aliran oksigen 95% dan CO₂ 5% (Memmet, Jerman), tangki pendingin (Thermo Scientific, Jerman), tangki nitrogen cair (Thermo Scientific, Jerman), autoclave (Hiramaya Hiclave HVE-50, Japan), pelat kultur jaringan 96 sumuran (Nunclon, Jerman), cabinet laminar (ESCO air Stream E-Series Class II, Singapore), microscope inverted (Zeiss, Jerman), haemositometer (Improved Neubaur, Superior Marienfeld), ELISA reader (Thermo Multiscan Ascent, Finland), spray dryer (Lab-plant, North Yorkshire England), viscometer Brookfield (Brookfield Synchroelectric, Amerika), particle size distribution analyzer (Horiba LA-950V2, Japan), kromatografi cair kinerja tinggi (Knauer, Jerman), kolom KCKT Eurospher 100-5C18 150 mm x 4,6 mm (Knauer, Jerman) sieving analyzer (Retsch, Jerman), membran filter milipore 0,45µm (MILLEX®HA, Irlandia), magnetic stirrer with heating (Yellowline MAG HS 7, Inggris), moisture balance (Precisa HA60, Swiss), Incubator shaker (Innova 43 incubator shaker, USA), vortex (Heidolph, Jerman), scanning electron microscope (Joel-JSM-840A, USA).

3.3 CARA KERJA

3.3.1 Pembuatan ekstrak dan fraksi herba sambiloto

3.3.1.1 Pembuatan ekstrak herba sambiloto

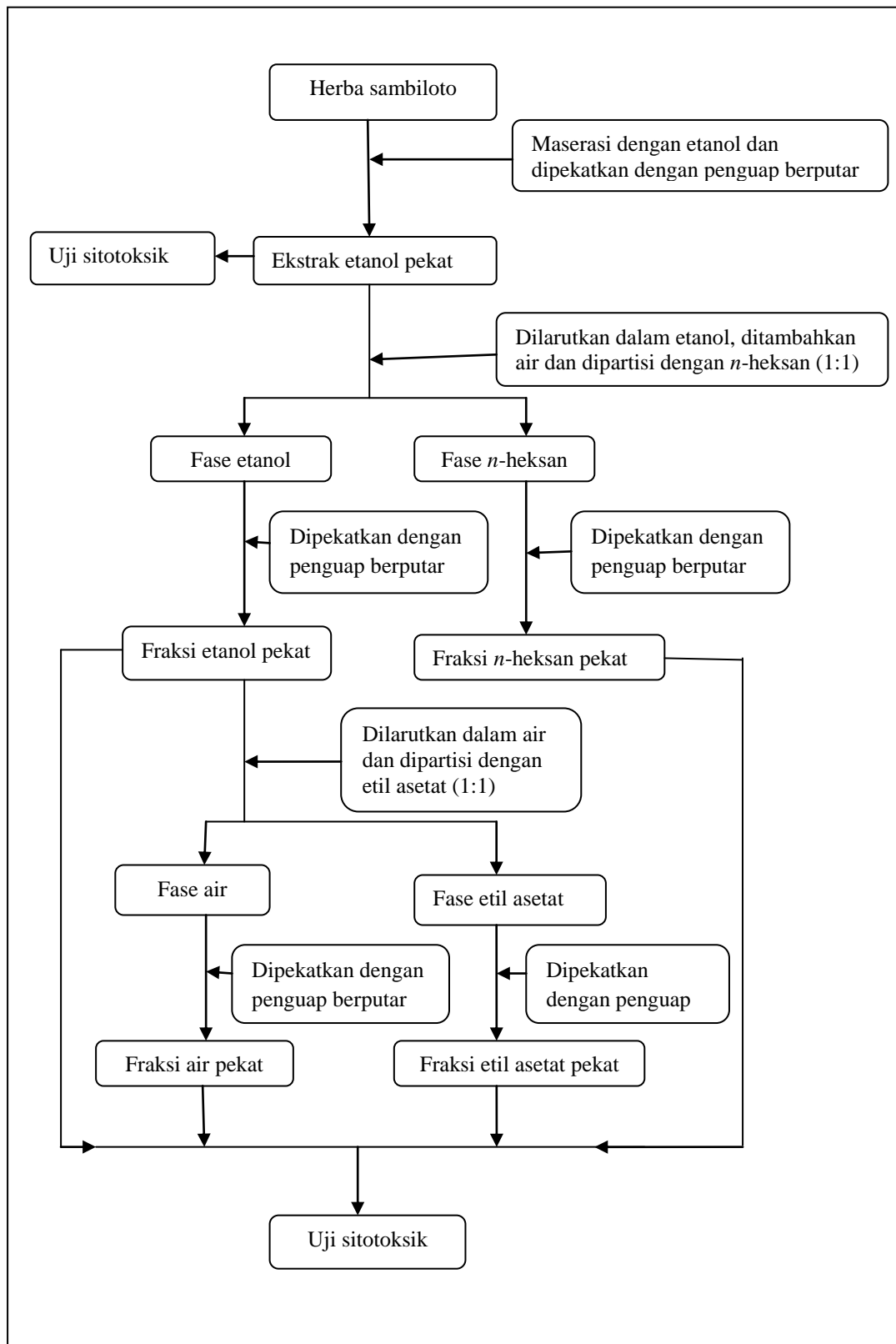
Herba sambiloto dibuat serbuk menggunakan mesin penggiling kemudian diayak hingga derajat kehalusan 35 mesh. Sebanyak 2 Kg serbuk herba sambiloto dimaserasi dengan 10 L etanol 96% (1:5) menggunakan pengaduk berputar dengan kecepatan 130 rpm selama 6 jam. Ekstrak cair yang didapat kemudian disaring menggunakan penyaring bervakum. Filtrat yang didapat kemudian dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan penguap berputar pada suhu 40°C, kecepatan 55 rpm, dan vakum 130 mBar hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstraksi dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Selanjutnya terhadap 2 Kg serbuk herba sambiloto dilakukan ekstraksi dengan metode dan cara yang sama.

Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 betas kemudian ekstrak kental yang di dapat digabungkan menjadi satu, sehingga diperoleh ekstrak yang homogen.

3.3.1.2 Pembuatan fraksi herba sambiloto

Sejumlah 500 g ekstrak etanol kental dilarutkan sedikit demi sedikit kedalam 1.500 mL etanol destilat, dibantu ultrasonik agar larut sempurna. Kemudian dimasukkan ke dalam beaker gelas 5.000 mL, ditambahkan 100 mL air dan 1.500 mL *n*-heksan, kocok menggunakan pengaduk berputar dengan kecepatan 300 rpm selama 1 jam. Kemudian diamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas (fase *n*-heksan) dan lapisan bawah (fase etanol). Fase etanol dituang ke dalam erlenmeyer, fase *n*-heksan di tampung. Fase etanol dimasukkan kembali ke dalam beaker gelas kemudian ditambahkan 1.500 mL *n*-heksan untuk dilakukan partisi kembali. Partisi dilakukan sebanyak 25 kali dengan menambahkan 1.500 mL *n*-heksan redestilasi pada setiap kali partisi. Masing-masing fase cair yang diperoleh yaitu fase *n*-heksan dan fase etanol kemudian dilakukan pemekatan menggunakan penguap berputar pada suhu 40°C, kecepatan 50 rpm, dan vakum 200 mBar hingga diperoleh fraksi kental *n*-heksan dan etanol.

Fraksi kental etanol yang diperoleh kemudian dilarutkan sedikit demi sedikit dalam 1.000 mL etil asetat, aduk menggunakan batang pengaduk dan dimasukkan dalam beaker gelas 5.000 ml. Ditambahkan 1.000 mL air, aduk menggunakan pengaduk berputar dengan kecepatan 300 rpm selama 1 jam. Kemudian diamkan hingga terbentuk dua lapis yaitu lapisan atas (fase etil asetat) dan lapisan bawah (fase air). Fase air dituang dalam Erlenmeyer dan fase etil asetat ditampung. Fase air dimasukkan kembali ke dalam beaker gelas kemudian tambahkan 1.000 mL etil asetat untuk dilakukan partisi kembali. Partisi dilakukan sebanyak 25 kali dengan penambahan 1.000 mL etil asetat. Masing-masing fase cair yang diperoleh yaitu fase air dan fase etil asetat kemudian dilakukan pemekatan menggunakan penguap berputar pada suhu 40°C, kecepatan 55 rpm, dan vakum 200 mBar hingga diperoleh fraksi kental air dan etil asetat. Skema pembuatan ekstrak dan fraksi herba sambiloto dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema pembuatan ekstrak dan fraksi herba sambiloto

3.3.2 Penentuan kadar andrografolid (Kumaran *et. al.*, 2003; Radjaram *et. al.*, 2000)

3.3.2.1 Pembuatan kurva spektrum absorpsi andrografolid

Penentuan panjang gelombang maksimum andrografolid dilakukan pada medium metanol, aquadest, larutan fosfat pH 6,8 dan larutan klorida pH 1,2. Larutan andrografolid dibuat dengan konsentrasi 100 ppm pada masing-masing medium dengan cara ditimbang secara seksama lebih kurang 1,0 mg andrografolid standar kemudian dilarutkan dalam masing-masing medium hingga 10 mL. Untuk larutan andrografolid dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 sebelumnya dilarutkan terlebih dahulu ditambahkan dengan 200 μ L metanol. Selanjutnya larutan tersebut diukur serapannya dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) pada panjang gelombang 190-400 nm, dengan kondisi fase gerak metanol-air (70:30), kecepatan alir 1 mL/menit, detektor PDA dengan menggunakan kolom Eurospher 100-5C18 150 mm x 4,6 mm.

3.3.2.2 Pembuatan kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi di buat dalam medium metanol dibuat konsentrasi sebesar 25; 50; 100; 200; 300; dan 400 ppm. Pembuatan kurva kalibrasi andrografolid dalam aquadest di buat konsentrasi 10; 20; 30; 40; 50; dan 100 ppm. Pembuatan kurva kalibrasi andrografolid dalam larutan fosfat pH 6,8 dan larutan klorida pH 1,2 dibuat konsentrasi sebesar 10; 20; 30; 40; dan 50 ppm. Larutan tersebut disuntikan kedalam KCKT pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari kurva serapan pada masing-masing larutan. Luas puncak yang diperoleh kemudian digunakan untuk membuat kurva kalibrasi dengan memplotkan luas pucak dengan konsentrasi.

3.3.2.3 Penetapan kadar andrografolid dalam ekstrak dan fraksi herba sambiloto

Sejumlah sampel ditimbang secara seksama, dilarutkan dalam metanol pada labu ukur kemudian disonifikasi hingga larut. Larutan kemudian disaring menggunakan membran filter 0,45 μ m selanjutnya disuntikan ke dalam KCKT pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari kurva serapan andrografolid dalam metanol. Luas puncak yang diperoleh kemudian digunakan

untuk menghitung jumlah andrografolid dalam ekstrak dan fraksi menggunakan persamaan linier yang di peroleh dari kurva kalibrasi.

3.3.3 Uji Sitotoksik

3.3.3.1 Uji terhadap *Artemia salina* Leach (Meyer *et al*, 1982).

a. Penetasan telur *A.salina* Leach

Sejumlah lebih kurang 20 mg telur *A.salina* Leach dimasukan dalam media penetasan yang berisi air laut buatan sebanyak 200 mL. Pembuatan air laut buatan dengan cara menimbang 38 g garam tanpa yodium dan dilarutkan dalam 1 L air, kemudian disaring menggunakan kertas saring watman. Selama penetasan diberikan udara menggunakan aerator dan penyinaran lampu pijar 25 watt selama 48 jam untuk mempertahankan suhu media penetasan antara 20-30°C.

b. Persiapan larutan uji

Disiapkan vial untuk tempat pengujian, dinding luar vial diberi tanda batas 10 mL. Ditimbang sejumlah 500 mg sampel (ekstrak etanol, fraksi etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air) kemudian ditambahkan 50 mL pelarut diaduk hingga larut. Diperoleh sampel dengan konsentrasi 10.000 ppm (larutan induk). Dipipet masing-masing larutan induk 1.000; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; dan 100 µL, kemudian dimasukan kedalam vial uji untuk mendapatkan konsentrasi 1.000; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; dan 100 ppm dan tambahkan vial untuk kontrol. Setiap konsentrasi dibuat tiga pengulangan (triplo). Kemudian pelarut diuapkan sampai benar-benar kering.

c. Pengujian sitotoksik terhadap *A.salina* Leach

Ke dalam vial yang mengandung sampel uji (setelah seluruh pelarut telah menguap) dan kontrol ditambahkan 75 µl dimetil sulfoksida (DMSO) sehingga sampel larut sempurna, kemudian tambahkan 5 mL air laut buatan aduk hingga larut dan homogen dengan bantuan ultrasonikator. Masukan sebanyak 10 ekor larva udang yang berusia 48 jam, tambahkan air laut buatan sampai 10 mL. Vial-vial perlakuan kemudian disimpan pada tempat yang terang. Setelah 24 jam dihitung jumlah larva udang yang mati. Tingkat toksisitas ditentukan dengan

menghitung persen kematian atau mortalitas dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dikurangi jumlah larva yang mati pada kontrol dibagi dengan jumlah total larva. Rumus untuk menghitung % kematian adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ kematian larva} = \frac{\Sigma \text{ kematian sampel} - \Sigma \text{ kematian kontrol}}{\Sigma \text{ total larva awal}} \times 100\% \quad (3.1)$$

Hasil data yang diperoleh kemudian dibuat grafik untuk mendapatkan persamaan linier antara log konsentrasi sebagai sumbu X dan nilai probit % kematian sebagai sumbu Y. Dari persamaan tersebut dihitung nilai LC₅₀.

3.3.3.2 Uji terhadap sel kanker payudara galur MCF7 dan T47D (Alley *et al*, 1988; Doyle dan Griffiths, 2000).

a. Pembuatan larutan uji

Sampel ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 200 µL DMSO 100% sehingga diperoleh konsentrasi 50.000 ppm (larutan induk). Kemudian 50 µl larutan induk diencerkan dengan 450 µl medium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) sehingga diperoleh konsentrasi 5.000 ppm (larutan kerja 1). Larutan kerja 1 dari sampel ekstrak etanol, fraksi etanol, fraksi *n*-heksan, dan fraksi etil asetat diencerkan dengan menggunakan pelarut medium RPMI 1640 sehingga diperoleh bermacam-macam konsentrasi yaitu 20; 40; 80; 160; dan 400 ppm. Larutan kerja 1 dari sampel fraksi air diencerkan dengan menggunakan medium RPMI 1640 sehingga diperoleh bermacam-macam konsentrasi yaitu 100; 200; 400; 800; dan 1.000 ppm (larutan kerja 2).

b. Pembuatan larutan andrografolid standard

Andrografolid ditimbang sebanyak 1,0 mg, kemudian dilarutkan dalam 20 µL DMSO 100% sehingga diperoleh konsentrasi 50.000 ppm (larutan induk). Kemudian 50 µl larutan induk diencerkan dengan 450 µl medium RPMI 1640 sehingga diperoleh konsentrasi 5.000 ppm (larutan kerja 1). Larutan kerja 1 diencerkan dengan menggunakan pelarut medium RPMI 1640 sehingga diperoleh bermacam-macam konsentrasi yaitu 6; 12; 18; 24; 36; dan 42 ppm untuk uji

terhadap sel MCF7. Konsentrasi 6; 12; 18; 24; 30; dan 36 ppm untuk uji terhadap sel T47D (larutan kerja 2).

c. Pembuatan larutan Cisplatin®

Larutan induk Cisplatin® dengan konsentrasi 100 ppm dibuat pengenceran dengan penambahan medium RPMI 1640 sampai diperoleh bermacam-macam konsentrasi yaitu 6; 12; 18; 24; 36; dan 42 ppm untuk uji terhadap sel MCF7. Konsentrasi 6; 12; 18; 24; 30; dan 36 ppm untuk uji terhadap sel T47D.

d. Pengujian sitotoksik terhadap sel MCF7 dan T47D

Pengujian sitotoksik terhadap sel kanker MCF7 dan T47D dilakukan dengan tahap sebagai berikut :

1). *Cell thawing*

Sel kanker payudara galur MCF7 atau T47D dalam vial dari penyimpanan Nitrogen cair, dipindahkan ke dalam *T Flasks* ditambahkan medium RPMI 1640 yang mengandung 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% penisilin-streptomisin, dan 20% Phosphate Buffer Saline (PBS). Sel dalam *T flasks* diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% selama 72 jam sehingga terlihat sel tumbuh dengan baik, tidak terjadi kontaminasi dan kerapatan cukup (70-80 % *confluence*).

2). *Platting*

Sel dari *T Flasks* dicuci dengan PBS, ditambahkan 200 µL tripsin untuk melepaskan sel, kemudian ditambahkan 1.800 µL PBS dan diinkubasi selama 3 menit. Amati dibawah mikroskop inverted. Tambahkan dengan media kultur sebanyak 4 mL, sel diresuspensi menggunakan mikropipet. Masukkan ke dalam tabung sentrifugase pada kecepatan 1.000 rpm selama 5 menit. Kemudian supernatan di buang dan selanjutnya didekantasi dan diberi media kultur sebanyak 1 mL. Diambil sejumlah 50 µL dari suspensi diencerkan dg 450 µL media, kemudian ambil sebanyak 50 µL suspensi sel ditambah 50 µL tripan blue, homogen kemudian diletakan dalam hemocytometer, amati di bawah mikroskop untuk mengetahui jumlah koloni sel kanker. Setelah diperoleh jumlah sel yang

diinginkan, masukkan 100 μL suspensi yang mengandung 5×10^3 sel ke dalam tiap sumuran dan inkubasi selama 24 jam.

3). Pengujian ekstrak dan fraksi herba sambiloto

Sel dalam *well plate* yang telah dinkubasi selama 24 jam di inkubator CO_2 5% temperatur 37°C , kemudian dimasukan larutan uji (larutan kerja 2) masing-masing 100 μL . Konsentrasi akhir sampel ekstrak etanol, fraksi etanol, fraksi *n*-heksan, dan fraksi etil asetat yaitu 10; 20; 40; 80; 160; dan 200 ppm. Konsentrasi fraksi air yaitu 50; 100; 200; 400; dan 500 ppm. Kemudian dilakukan hal yang sama terhadap larutan andrografolid standard dan Cisplastin[®] hingga diperoleh konsentrasi 3; 6; 9; 12; 18; dan 21 ppm untuk uji terhadap sel MCF7. Konsentrasi 3; 6; 9; 12; 15; dan 18 ppm untuk uji terhadap sel T47D.

Selanjutnya plate diinkubasi selama 24 jam dan didokumentasi kembali. Pada akhir inkubasi, media pada masing-masing sumuran dibuang dan dicuci dengan 100 μL PBS sebanyak 2 kali, kemudian ditambahkan 100 μL medium baru yang mengandung 10 μL MTT 5 mg/mL ke dalam tiap sumur lalu diinkubasi kembali selama 4 jam pada CO_2 5% temperatur 37°C . Reaksi dihentikan dengan penambahan larutan sodium dodesil sulfat (SDS) 10% dalam HCl 0,01 N, biarkan selama semalam pada suhu ruang dalam ruang gelap. Masukkan pelat kultur 96 sumuran ke dalam ELISA *plate reader*. Serapan kemudian di baca pada panjang gelombang 570 nm. Rumus untuk menghitung % kematian sel adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ kematian sel} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi perlakuan})}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (3.2)$$

Hasil data yang diperoleh kemudian dibuat grafik untuk mendapatkan persamaan linier antara log konsentrasi sebagai sumbu X dan nilai probit % penghambatan proliferasi sebagai sumbu Y. Dari persamaan tersebut dihitung nilai IC_{50} .

3.3.4 Evaluasi dan karakterisasi fraksi aktif herba sambiloto.

Dari hasil uji sitotoksik terhadap ekstrak etanol, fraksi etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air yang memiliki nilai $\text{LC}_{50}/\text{IC}_{50}$ paling

kecil dengan kadar andrografolid tertinggi kemudian dilanjutkan untuk dikarakterisasi dan di buat mikrosfer.

3.3.4.1 Rendemen ekstrak dan fraksi herba sambiloto (Depkes RI, 2000^b)

Ekstrak kental dan fraksi herba sambiloto yang didapat, dituang ke dalam cawan penguap, kemudian dipekatkan di atas penangas air pada suhu tidak lebih 50°C hingga kental. Cawan kemudian dimasukkan ke dalam desikator hingga dingin, lalu ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar ekstrak total dan fraksi dihitung terhadap banyaknya serbuk simplisia.

3.3.4.2 Penetapan parameter spesifikasi (Depkes RI, 2000^b)

a. Identifikasi

Identifikasi fraksi aktif dinyatakan dengan mendeskripsikan nama, meliputi nama ekstrak, nama latin tanaman, bagian tanaman yang digunakan, nama Indonesia dan senyawa identitas dari fraksi aktif.

b. Organoleptik

Organoleptik dari fraksi aktif ditentukan melalui pengamatan dengan mendiskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa.

c. Penetapan kadar senyawa yang larut dalam air

Sejumlah 1,0 g fraksi aktif dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air-kloroform LP menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam kemudian disaring. Sejumlah 20 mL filtrat dituang ke dalam cawan penguap yang telah ditara kemudian diuapkan hingga kering. Residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Selanjutnya, kadar dalam persen senyawa terlarut dalam air dihitung terhadap berat fraksi aktif awal.

d. Penetapan kadar senyawa larut dalam etil asetat

Sejumlah 1,0 g fraksi aktif di maserasi selama 24 jam dengan 100 mL etil asetat menggunakan labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam

pertama dan dibiarkan selama 18 jam kemudian disaring cepat untuk menghindari penguapan etil asetat. Sejumlah 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang telah ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etil asetat dihitung terhadap berat fraksi aktif awal.

e. Identifikasi terhadap kandungan kimia (Fong *et al.* 1980).

1). Identifikasi alkaloid

Sejumlah 0,2 g fraksi aktif dibasahkan dengan 5 mL amoniak 30%, digerus dalam lumpang, kemudian ditambahkan 20 mL kloroform dan digerus kembali dengan kuat. Campuran tersebut disaring dengan kertas saring, filtrat berupa larutan organik diambil (sebagai larutan A). Sebagian larutan A tersebut diekstraksi dengan 10 mL asam klorida 1:10 dengan pengocokan dalam tabung reaksi, ambil larutan bagian atasnya (sebagai larutan B). Larutan A ditetaskan pada kertas saring dan ditetaskan dengan pereaksi Dragendorff, terbentuknya warna merah atau jingga pada kertas saring menunjukkan adanya senyawa golongan alkaloid. Larutan B dibagi dalam dua tabung reaksi, masing-masing ditambahkan pereaksi Dragendorff dan Mayer. Terbentuknya warna merah bata dengan pereaksi Dragendorff dan endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan adanya alkaloid.

2). Identifikasi saponin

Sejumlah 0,2 g fraksi aktif dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air panas, didihkan selama 5 menit, saring dengan kertas saring, dinginkan. Filtrat yang diperoleh kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 menit, terbentuknya busa yang stabil dalam tabung reaksi menunjukkan adanya senyawa golongan saponin.

3). Identifikasi tanin (Fong *et al.*, 1980; Fransworth, 1966)

Sejumlah 0,4 g fraksi aktif dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 20 mL air panas, didihkan selama 5 menit, saring dengan kertas saring dinginkan kemudian dibagi menjadi empat bagian. Kedalam larutan

pertama ditambahkan larutan besi (III) klorida 1%, amati terbentuknya warna biru, biru tua, hijau atau hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa golongan tanin. Kedalam larutan kedua tambahkan 1 mL larutan natrium klorida 10% kemudian disaring dan filtrat yang diperoleh ditambahkan 4-5 tetes larutan gelatin 1% terbentuknya endapan menunjukkan adanya tanin. Kedalam larutan ketiga tambahkan 1 mL larutan natrium klorida 10% saring dan filtrat yang diperoleh ditambahkan 4-5 tetes larutan natrium klorida-gelatin (larutan gelatin 1% dalam larutan natrium klorida 10%) terbentuknya endapan menunjukkan adanya tanin. Selanjutnya kedalam larutan keempat tambahkan 1 mL asam klorida 2 M kemudian dididihkan. Jika terbentuknya endapan berwarna kuning kecoklatan menunjukkan adanya tanin terhidrolisis yaitu tanin pirogalol dan jika terbentuk endapan warna merah kecoklatan menunjukkan adanya terkondensasi yaitu flobafen atau tanin merah.

4). Identifikasi fenol

Sejumlah 0,2 g fraksi aktif dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air panas, didihkan selama 5 menit, saring dengan kertas saring, dinginkan kemudian tambahkan beberapa tetes larutan besi (III) klorida 1%, kemudian diamati terjadinya warna. Jika terbentuk warna ungu menunjukkan adanya senyawa fenol.

5). Identifikasi flavonoid

Sejumlah 0,2 g fraksi aktif dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air panas, didihkan selama 5 menit, saring dengan kertas saring. Kemudian 5 mL larutan filtrat ditambahkan sebungkus magnesium dan 1 mL asam klorida pekat, selanjutnya ditambahkan 5 mL amil alkohol, kocok dengan kuat dan biarkan memisah, terbentuknya warna dalam amil alkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

6). Identifikasi steroid-triterpenoid

Sejumlah 0,2 g fraksi aktif dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam, disaring dan diambil filtratnya sebanyak 5 mL kemudian diuapkan lalu

ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrida dan 1 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Lieberman-Buchard). Jika terbentuk warna hijau atau merah menunjukkan adanya senyawa golongan steroid dan diterpenoid.

3.3.4.3 Penentuan parameter non spesifik (Depkes, 2000^b).

a. Penetapan susut pengeringan

Fraksi aktif ditimbang secara seksama sebanyak 1 g dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal tertutup rapat yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang, fraksi aktif diratakan dalam botol timbang, dengan pengoyangan botol, hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 2-10 mm. kemudian dimasukkan ke dalam oven, dibuka tutupnya dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam deksikator hingga suhu kamar.

b. Penetapan kadar air

Kadar air fraksi aktif ditentukan menggunakan metode gravimetri. Masukkan lebih kurang 1 g fraksi aktif dan ditimbang seksama dalam wadah yang telah ditara. Kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%.

c. Penetapan kadar abu

Kurang lebih 1 g fraksi aktif ditimbang dan dimasukkan kedalam krus yang telah dipijarkan dan ditara. Kemudian dimasukkan ke dalam furnace dan dipijarkan hingga bobot tetap. Sampel diangkat, didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas lalu saring dengan kertas saring bebas abu. Pijarkan residu dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, kemudian ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bobot fraksi aktif awal.

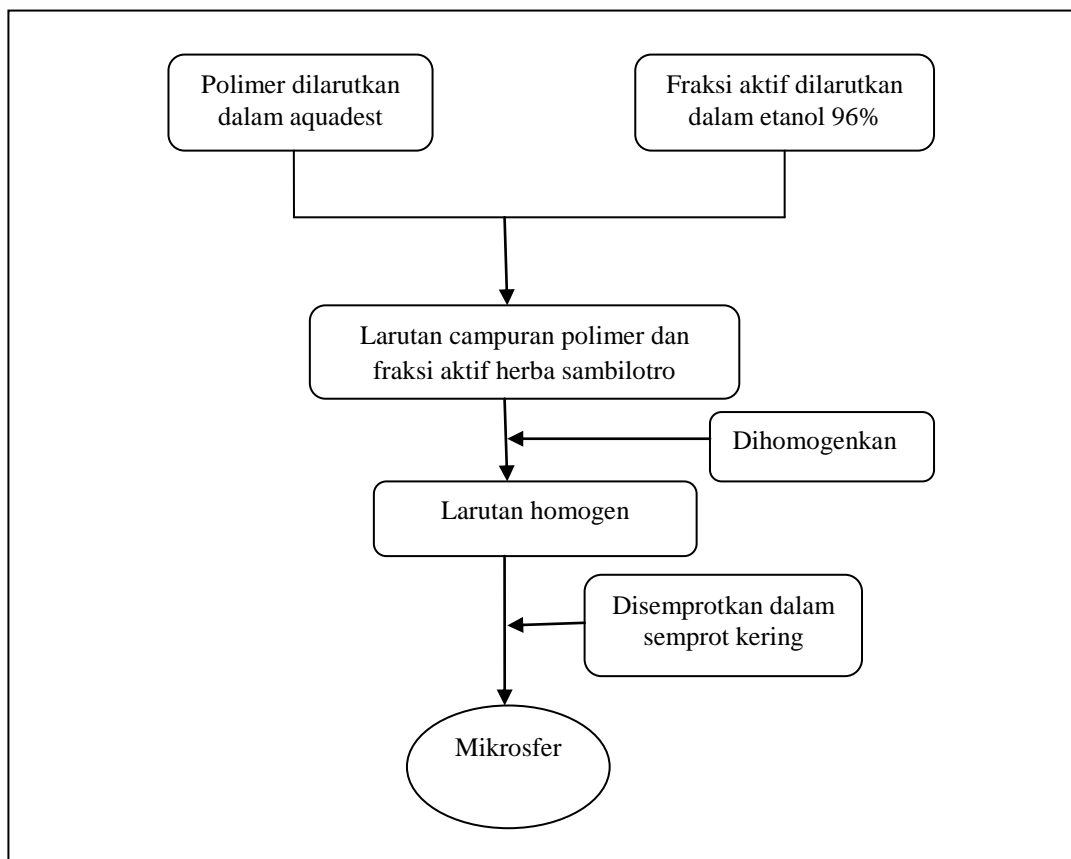
3.3.5 Pembuatan mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto

Berdasarkan hasil uji aktivitas sitotoksik terhadap ekstrak dan fraksi-fraksi herba sambiloto yang memiliki nilai LC_{50}/IC_{50} terkecil dengan kadar

andrografolid tertinggi kemudian dilanjutkan untuk di buat mikrosfer. Mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto dibuat dengan metode semprot kering. Pembuatan mikrosfer dilakukan dengan cara: sejumlah polimer PVP K30 atau HPMC seperti yang tertera pada Tabel 3.1 dilarutkan ke dalam aquadest dan diaduk menggunakan *homogenizer*. Fraksi aktif herba sambiloto dilarutkan dalam etanol 96%, kemudian larutan fraksi aktif didispersikan ke dalam larutan polimer sambil diaduk hingga homogen. Sambil tetap dalam kondisi pengadukan, campuran dispersi tersebut selanjutnya dialirkan ke dalam *spray dryer*. Kondisi proses untuk formula yang menggunakan polimer PVP K30 yaitu suhu masuk 140°C, suhu keluar 80°C, kecepatan pompa 5 mL/menit, kecepatan *deblocker* medium, dan kipas penyedot 15 (2,25 meter/detik). Kondisi proses yang digunakan untuk polimer HPMC yaitu suhu masuk 190°C, suhu keluar 90°C, kecepatan pompa 15 mL/menit, kecepatan *deblocker* medium, dan kipas penyedot 30 (4,5 meter/detik). Mikrosfer yang dihasilkan kemudian dikumpulkan dari tempat pengumpul dan selanjutnya dilakukan evaluasi dan karakterisasi. Skema pembuatan mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto dapat dilihat pada Gambar 3.2.

Tabel 3.1.
Formula mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto

Bahan	Formula					
	A	B	C	D	E	F
PVP K30 (g)	5	7,5	10	-	-	-
HPMC (g)	-	-	-	5	7,5	10
Fraksi aktif herba sambiloto (g)	1	1	1	1	1	1
Etanol 96 % (mL)	25	25	25	25	25	25
Aquadest (mL)	75	75	75	75	75	75



Gambar 3.2 Skema pembuatan mikrosfer fraksi aktif herba sambilotro

3.3.6 Pengukuran viskositas formula mikrosfer fraksi aktif herba sambilotro (FMIPA UI, 2009).

Masing-masing bahan yang dipakai pada tiap formula didispersikan ke dalam 400 mL pelarut dalam beaker gelas 500 mL, dengan jumlah bahan sesuai pada masing-masing formula. Selanjutnya bahan yang telah didispersikan dalam pelarut diaduk merata hingga membentuk cairan hidrokoloid menggunakan alat *homogenizer*. Dispersi dari setiap formula tersebut diukur viskositasnya menggunakan alat *viscometer* Brookfield. Spindel dari alat kemudian dimasukkan ke dalam beaker gelas hingga garis tanda. Setelah itu, alat dinyalakan dan diputar pada kecepatan 5; 10; 20; 50; dan 100 rpm. Hasil pembacaan skala dicatat dan digunakan untuk mengukur viskositas.

3.3.7 Evaluasi dan karakterisasi mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto

3.3.7.1 Penentuan uji perolehan kembali proses (Tewa-tagne *et al*, 2007)

Penentuan uji perolehan kembali atau rendemen proses dihitung berdasarkan perbandingan antara bobot mikrosfer yang diperoleh terhadap bobot bahan pembentuk mikrosfer yang digunakan dan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ uji perolehan kembali} = \frac{\text{Bobot mikrosfer yang diperoleh}}{\text{Bobot bahan pembentuk mikrosfer}} \times 100\% \quad (3.3)$$

3.3.7.2 Penentuan bentuk dan morfologi mikrosfer (Shu *et al*, 2006)

Bentuk dan morfologi mikrosfer diamati menggunakan alat *scanning electron microscope* (SEM). Mikrosfer dilapisi dengan logam emas dan palladium menggunakan fine coater (Polaron SC-7610) pada kondisi vakum dan sampel diperiksa menggunakan *scanning electron microscope*.

3.3.7.3 Penentuan distribusi ukuran partikel (Horiba, 2007)

Penentuan distribusi ukuran partikel dari mikrosfer dilakukan menggunakan alat *particle size distribution analyze* menggunakan metode wet. Mikrosfer yang sudah disiapkan didispersikan ke dalam pelarut yang sesuai kemudian dimasukkan dalam *fraction cell*. Parameter pada alat diatur dan diukur diameter rata-rata partikel secara otomatis. Alat akan memperlihatkan diagram distribusi ukuran partikel dari mikrosfer.

3.3.7.4 Penentuan kadar air (Amini, 2009)

Kadar air ditentukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Alat dipanaskan terlebih dahulu selama kurang lebih 10 menit. Parameter pada alat diatur dan suhu diatur menjadi 105°C. Mikrosfer ditimbang kurang lebih 1 g dan diletakkan di atas wadah aluminium secara merata dalam alat. Alat kemudian dinyalakan dan nilai kadar air akan terbaca setelah mencapai kadar air yang konstan. Nilai yang terbaca pada alat kemudian dicatat.

3.3.7.5 Penentuan efisiensi penjerapan andrografolid dalam mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto (Shu *et al.*, 2006)

Mikrosfer yang diketahui beratnya dilarutkan dalam metanol pada labu takar, kemudian disonikasi hingga larut. Larutan kemudian disaring menggunakan membran filter 0,45. Filtrat yang diperoleh diukur luas areanya menggunakan KCKT. Luas area yang diperoleh kemudian digunakan untuk menghitung jumlah andrografolid dalam mikrosfer menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva kalibrasi.

Efisiensi penjerapan dihitung dengan membandingkan jumlah andrografolid yang diperoleh atau yang terjerap dalam mikrosfer dengan jumlah teoritis andrografolid dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ efisiensi penjerapan} = \frac{\text{Jumlah zat aktif terjerap dalam mikrosfer}}{\text{Jumlah teoritis zat aktif dalam mikrosfer}} \times 100\% \quad (3.4)$$

3.3.7.6 Penentuan uji kelarutan andrografolid (Ruan *et al.*, 2005)

Uji kelarutan andrografolid dilakukan terhadap andrografolid standar, fraksi aktif, dan mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto. Pengujian dilakukan dalam tiga medium yaitu medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2. Masing-masing sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer berukuran 50 mL, kemudian ditambahkan medium sebanyak 10 mL. Erlenmeyer kemudian dimasukkan dalam *incubator shaker* pada suhu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ selama 12 jam dengan kecepatan 100 rpm. Jika ada endapan yang larut selama pengocokan tambahkan lagi sejumlah tertentu sampel sampai diperoleh larutan yang jenuh. Saring larutan dengan membran filter 0,45 μm . Konsentrasi andrografolid dalam masing-masing sampel kemudian di analisa menggunakan KCKT pada panjang gelombang yang diperoleh dari kurva serapan andrografolid.

3.3.7.7 Penentuan uji disolusi andrografolid secara *in vitro* (Amini, 2009)

Uji disolusi andrografolid secara *in vitro* dilakukan dengan menggunakan alat *magnetic stirrer with heating* yang dimodifikasi. Uji disolusi dilakukan terhadap andrografolid standar, fraksi etil asetat dan mikrosfer fraksi etil asetat

herba sambiloto. Sejumlah sampel yang setara dengan 2,5 mg andrografolid dimasukkan kedalam kantong yang terbuat dari kertas saring. Kertas saring kemudian digantung dengan menggunakan kenur dalam beaker gelas 100 mL yang telah berisi 50 mL medium. Pengujian dilakukan dalam medium aquadest, larutan fosfat pH 6,8 dan larutan klorida pH 1,2 pada suhu $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ di bawah pengadukkan yang kontinu dengan kecepatan 100 rpm. Pengambilan cuplikan dilakukan pada tempat yang sama pada menit ke-5; 10; 15; 30; 60; dan 120. Tiap 1 mL sampel kemudian di analisa menggunakan KCKT pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari kurva serapan andrografolid pada masing-masing medium.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan ekstrak dan fraksi herba sambiloto

Ekstrak herba sambiloto dibuat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol. Maserasi merupakan proses ekstraksi yang sederhana menggunakan pelarut dan dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukkan pada suhu kamar. Keuntungan menggunakan teknik maserasi yaitu alat yang digunakan sederhana, dapat digunakan untuk sampel dengan tekstur yang lunak dan tidak tahan terhadap pemanasan secara langsung, dan pelarut yang digunakan lebih sedikit (Depkes RI, 2000^b).

Pelarut yang dipilih untuk proses ekstraksi adalah pelarut yang dapat melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung dalam simplisia. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96% merupakan pelarut yang mudah di dapat, ekonomis, memiliki selektifitas yang tinggi, ramah lingkungan, tidak toksik, mudah menguap, serta dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme dan kerja enzim (Depkes RI, 2000^b).

Fraksi herba sambiloto dibuat dengan cara separasi berdasarkan tingkat kepolaran, menggunakan pelarut *n*-heksan (nonpolar), etil asetat (semi polar), dan air (polar). Separasi bertujuan untuk menghilangkan atau memisahkan senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki, sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni (Depkes RI, 2000^b).

Perhitungan perolehan ekstrak dan fraksi herba sambiloto atau rendemen proses merupakan faktor yang penting untuk mengetahui keefektifan proses ekstraksi dan fraksinasi. Efektifitas ekstraksi dan fraksinasi dapat dipengaruhi oleh ukuran partikel simplisia, pelarut yang digunakan, cara dan lamanya proses ekstraksi atau fraksinasi. Nilai perolehan kembali ekstrak atau fraksi dihitung dengan membandingkan berat ekstrak atau fraksi yang diperoleh dengan jumlah serbuk simplisia yang digunakan pada proses ekstraksi. Nilai perolehan kembali ekstrak dan fraksi aktif herba sambiloto yang diperoleh menunjukkan bahwa ukuran partikel simplisia, pelarut yang digunakan, cara ekstraksi, dan lama proses

ekstraksi/fraksinasi yang dilakukan relatif cukup efektif untuk menarik senyawa yang terkandung dalam simplisia. Perolehan ekstrak dan fraksi herba sambiloto yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 4.1

Tabel 4.1
Perolehan ekstrak dan fraksi herba sambiloto

Keterangan	Berat (g)	Perolehan ekstrak atau fraksi (%)
Herba sambiloto	6.000,00	-
Ekstrak etanol	745,80	12,43
Fraksi etanol	449,00	7,48
Fraksi <i>n</i> -heksan	62,15	1,04
Fraksi etil asetat	200,00	3,33
Fraksi air	11,60	0,19

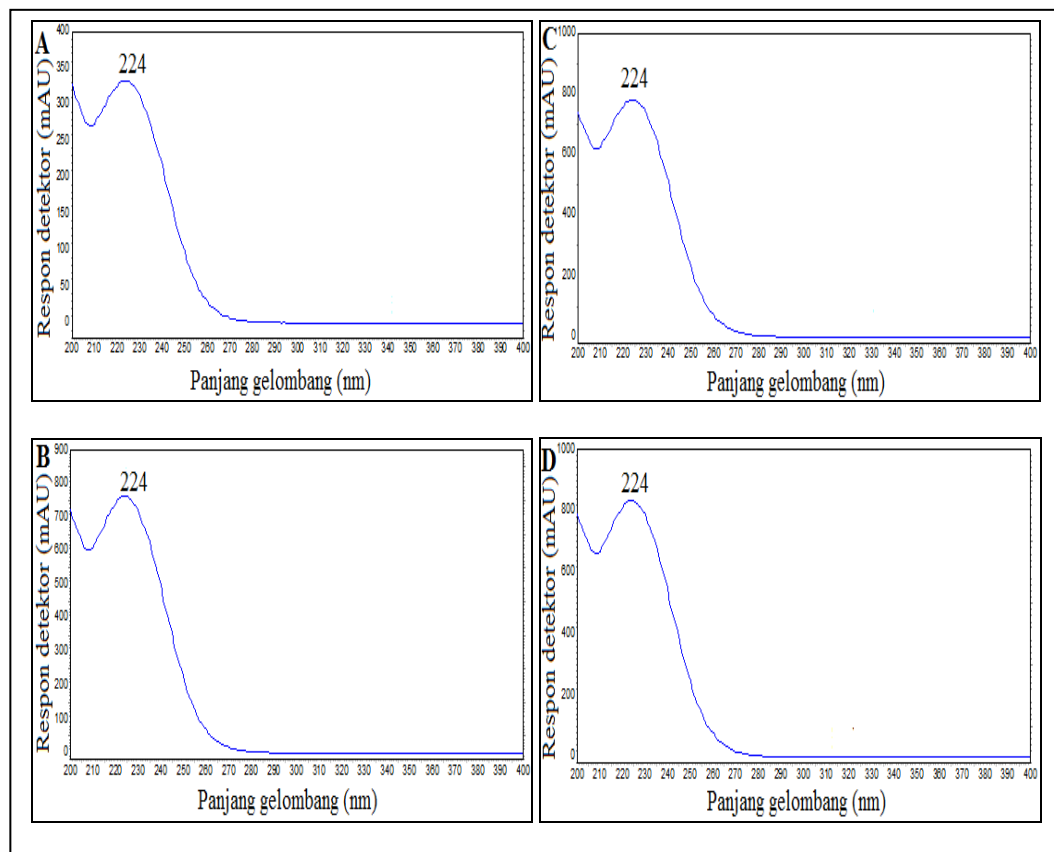
Keuntungan penggunaan ekstrak kental dibandingkan dengan simplisia asal yaitu penggunaannya dapat lebih mudah dan lebih sedikit pemakaiannya dibandingkan dengan simplisia, sedangkan kelebihan menggunakan fraksi dibandingkan dengan ekstrak yaitu lebih murni sehingga dosis yang digunakan lebih kecil.

4.2 Penentuan kadar andrografolid dalam ekstrak dan fraksi herba sambiloto

4.2.1 Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum andrografolid dibuat dalam bentuk larutan andrografolid dengan konsentrasi 100 ppm pada medium metanol, aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 dengan metode KCKT. Dari hasil analisa menunjukkan panjang gelombang maksimum yang sama pada keempat medium yaitu masing-masing 224 nm seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.1. Andrografolid mempunyai gugus kromofor berupa ikatan rangkap terkonjugasi dan gugus fungsional yang menyebabkan terjadinya serapan di daerah ultraviolet (190–400 nm). Panjang gelombang maksimum andrografolid menurut literatur adalah 223 nm (Qiang, 2007; Ping, 2009), sedangkan panjang gelombang maksimum dari hasil percobaan adalah 224 nm, selisih 1 nm. Hal ini sesuai dengan persyaratan di Farmakope Indonesia 1995 yaitu suatu pernyataan dalam satuan penetapan kadar pengujian mengenai panjang gelombang serapan

maksimum mengandung implikasi bahwa maksimum tersebut tepat pada atau dalam batas 2 nm dari panjang gelombang yang ditentukan (Depkes RI, 1995).



Gambar 4.1. Kurva serapan andrografolid pada konsentrasi 100 ppm. (A) medium metanol, (B) medium aquadest, (C) medium fosfat pH 6,8 dan (D) medium klorida pH 1,2.

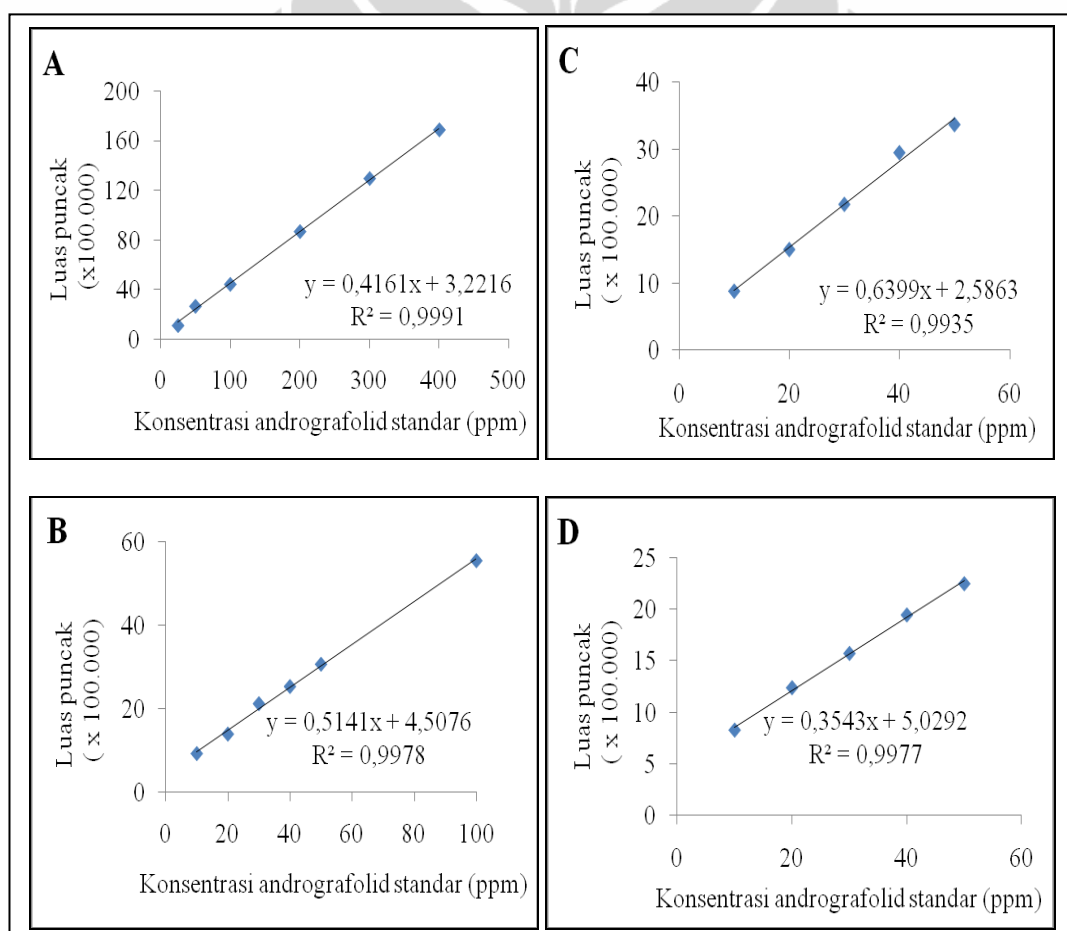
4.2.2 Pembuatan kurva kalibrasi

Pembuatan kurva kalibrasi dilakukan dalam empat medium yaitu medium metanol, aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 dengan metode KCKT pada panjang gelombang 224 nm. Pembuatan kurva kalibrasi dalam medium metanol dilakukan untuk menentukan konsentrasi andrografolid dalam ekstrak dan fraksi herba sambiloto serta konsentrasi andrografolid pada uji efisiensi penyerapan. Kurva kalibrasi dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 dilakukan untuk menentukan konsentrasi andrografolid pada uji kelarutan dan uji pelepasan obat secara *in vitro*. Data luas puncak yang diperoleh dari hasil

pengukuran dengan KCKT kemudian diplotkan dengan masing-masing konsentrasi yang digunakan, sehingga diperoleh persamaan garis sebagai berikut:

- Medium metanol $y = 41605x + 322157$, $r = 0,9991$
- Medium aquadest $y = 51411x + 450763$, $r = 0,9978$
- Medium fosfat pH 6,8 $y = 63987x + 258629$, $r = 0,9935$
- Medium klorida pH 1,2 $y = 35431x + 502921$, $r = 0,9977$

Hasil kurva kalibrasi dapat dilihat pada Gambar 4.2. Karena nilai koefisien korelasi (r) mendekati angka 1, maka persamaan yang di dapat adalah persamaan garis linier, sehingga dapat digunakan untuk penentuan konsentrasi andrografolid dalam ekstrak, fraksi, dan mikrosfer.



Gambar 4.2. Kurva kalibrasi andrografolid pada λ 224 nm. (A) medium metanol, (B) medium aquadest, (C) medium fosfat pH 6,8 dan (D) medium klorida pH 1,2

4.2.3 Penentuan kadar andrografolid dalam ekstrak dan fraksi herba sambiloto

Hasil penentuan kadar andrografolid dalam ekstrak dan fraksi herba sambiloto dapat dilihat pada Tabel 4.2. Berdasarkan hasil penentuan kadar andrografolid menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki kadar andrografolid tertinggi yakni sebesar 32,13% bila dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi herba sambiloto lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa andrografolid memiliki sifat kelarutan tertinggi dalam fase semi polar yakni fraksi etil asetat.

Tabel 4.2.
Kadar andrografolid dalam ekstrak dan fraksi herba sambiloto

Sampel	Kadar andrografolid (%)
Ekstrak etanol	21,52 ± 0,22
Fraksi etanol	20,76 ± 0,19
Fraksi <i>n</i> -heksan	0,07 ± 0,01
Fraksi etil asetat	32,13 ± 0,20
Fraksi air	0,63 ± 0,02

4.3 Uji sitotoksik

4.3.1 Uji terhadap *A.salina* leach

Terhadap ekstrak dan fraksi herba sambiloto yang diperoleh dilakukan uji toksisitas pendahuluan dengan menggunakan metode BSLT (Meyer *et al.*, 1982) yang dimodifikasi. BSLT merupakan salah satu metode skrining untuk menentukan ketoksikan suatu ekstrak atau senyawa. Parameter pengamatan untuk menunjukkan adanya toksisitas suatu ekstrak atau senyawa adalah kematian *A.salina* Leach yang dinyatakan dalam nilai LC_{50} . LC_{50} adalah konsentrasi senyawa yang dapat memberikan tingkat kematian sebesar 50% *A.salina* Leach. Nilai LC_{50} merupakan nilai yang menunjukkan sifat toksik bahan uji yang diperoleh dengan menggunakan analisa regresi linier antara log konsentrasi dengan probit persen kematian. Semakin kecil nilai LC_{50} sifat toksiknya semakin kuat. Hasil uji toksisitas pendahuluan terhadap ekstrak dan fraksi herba sambiloto dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Pada Tabel 4.3 memperlihatkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas tertinggi dengan nilai LC_{50} sebesar 30,13 ppm dibandingkan dengan ekstrak etanol dan fraksi-fraksi herba sambiloto lainnya. Berdasarkan literatur andrografolid yang diuji dengan BSLT memiliki nilai LC_{50} sebesar 199,21 ppm (Quality Control

Universitas Indonesia

Dept Natural Remedies). Dari hasil uji menunjukkan nilai LC₅₀ fraksi etil asetat lebih kecil bila dibandingkan dengan nilai LC₅₀ andrografolid menurut penelitian dari Quality Control Dept Natural Remedies. Menurut Meyer (1982), suatu ekstrak termasuk dalam kategori toksik apabila memiliki nilai LC₅₀ lebih kecil 1.000 ppm terhadap larva *A.salina* Leach. Dengan demikian fraksi etil asetat dikatakan memiliki efek sitotoksik yang kuat karena memperlihatkan efek mematikan *A. salina* Leach pada konsentrasi kurang dari 1.000 ppm .

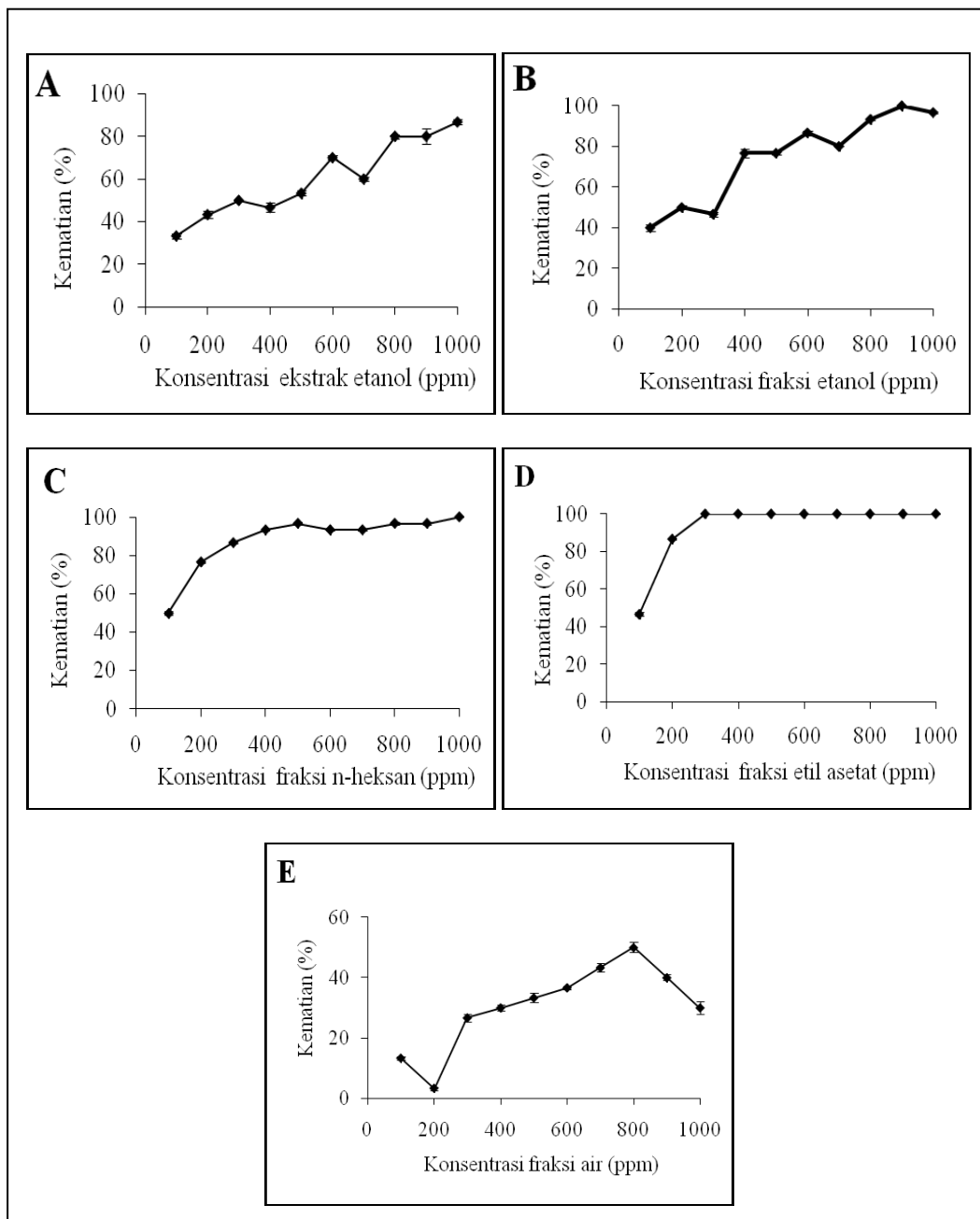
Tabel 4.3.
Nilai LC₅₀ ekstrak dan fraksi herba sambiloto terhadap *A. salina* Leach

Sampel	Nilai LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etanol	274,53
Fraksi etanol	196,08
Fraksi <i>n</i> -heksan	99,57
Fraksi etil asetat	30,13
Fraksi air	1.263,90

Apabila dilihat data Tabel 4.2 dan 4.3, maka tingkat keaktifan sebagai sitotoksik fraksi etil asetat > fraksi *n*-heksan > fraksi etanol > ekstrak etanol > fraksi air, namun bila dilihat dari kadar andrografolid yang tertinggi fraksi etil asetat > ekstrak etanol > fraksi etanol > fraksi air > fraksi *n*-heksan. Berdasarkan hasil uji menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktifitas dan kadar andrografolid yang tertinggi dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi herba sambiloto lainnya. Akan tetapi pada fraksi *n*-heksan tingkat aktifitas tidak sejalan dengan besarnya kadar andrografolid. Fenomena ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa yang terdapat pada masing-masing ekstrak atau fraksi ikut berperan dalam meningkatkan aktifitas sitotoksik terhadap *A.salina* Leach. Fraksi etil asetat merupakan fraksi relatif semipolar sehingga selain zat utama yang tersari berupa senyawa semipolar ada kemungkinan senyawa polar dan nonpolar yang ikut berperan dalam meningkatkan aktivitas sitotoksiknya. Namun demikian, senyawa andrografolid tetap dijadikan sebagai senyawa *marker* untuk kontrol kualitas produk sambiloto (BPOM, 2004; Daodee *et al.*, 2006).

Gambar 4.3 memperlihatkan bahwa persen kematian tertinggi terhadap *A.salina* Leach dimiliki oleh fraksi etil asetat, kemudian diikuti oleh fraksi *n*-heksan, fraksi etanol, ekstrak etanol, dan fraksi air. Fraksi etil asetat memiliki

aktivitas tertinggi terhadap *A.salina* Leach karena pada konsentrasi 300 ppm memiliki persen kematian tertinggi (100%) bila dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi-fraksi herba sambiloto lainnya.



Gambar 4.3. Hubungan antara konsentrasi ekstrak/fraksi herba sambiloto (ppm) dengan kematian *A.salina* Leach (%). (A) ekstrak etanol, (B) fraksi etanol, (C) fraksi *n*-heksan, (D) fraksi etil asetat, (E) fraksi air.

4.3.2 Uji terhadap kultur sel kanker payudara

Pengujian terhadap kultur sel kanker payudara dimaksud untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak dan fraksi herba sambiloto. Uji sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara galur MCF7 dan T47D dilakukan dengan menggunakan metode MTT *assay* (Alley *et al.*, 1988). Metode MTT merupakan metode kolorimetrik, dimana pereaksi MTT ini merupakan garam tetrazolium yang dapat membentuk kristal formazan oleh sistem suksinat dehidrogenase yang terdapat pada mitokondria sel hidup (Loo dan Rillema, 1998). Kristal formazan ini memberikan warna ungu yang dapat dibaca absorbansinya dengan menggunakan ELISA reader.

Parameter pengamatan untuk menunjukkan adanya sitotoksik suatu ekstrak atau senyawa adalah penghambatan proliferasi sel kanker yang dinyatakan dalam IC_{50} (Doyle dan Griffiths, 2000). Nilai IC_{50} adalah konsentrasi yang dapat menyebabkan penghambatan proliferasi 50% dari populasi sel yang sama dalam waktu yang spesifik dan kondisi percobaan yang sesuai (Hartati *et al.*, 2003). Nilai IC_{50} merupakan nilai yang menunjukkan sifat sitotoksik bahan uji yang diperoleh dengan menggunakan analisa regresi linier antara log konsentrasi dengan nilai probit persen kematian. Semakin kecil nilai IC_{50} sifat sitotoksiknya semakin kuat.

4.3.2.1 Uji terhadap kultur sel kanker payudara galur MCF7

Berdasarkan hasil uji sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara galur MCF7 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas hambatan proliferasi tertinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 82,82 ppm jika dibandingkan dengan ekstrak etanol dan fraksi-fraksi herba sambiloto lainnya. Namun aktivitas fraksi etil asetat lebih rendah jika dibandingkan dengan andrografolid standard dan Cisplatin[®] yang digunakan sebagai pembanding seperti yang terlihat pada Tabel 4.4.

Andrografolid standard dan Cisplatin[®] digunakan sebagai pembanding. Hal ini dikarenakan andrografolid merupakan *marker* pada ekstrak dan fraksi herba sambiloto sedangkan Cisplatin[®] merupakan sediaan obat yang umum digunakan untuk pengobatan kanker.

Tabel 4.4
 Nilai IC₅₀ ekstrak dan fraksi herba sambiloto, andrografolid standar, dan
 Cisplatin[®] terhadap kultur sel kanker payudara galur MCF7

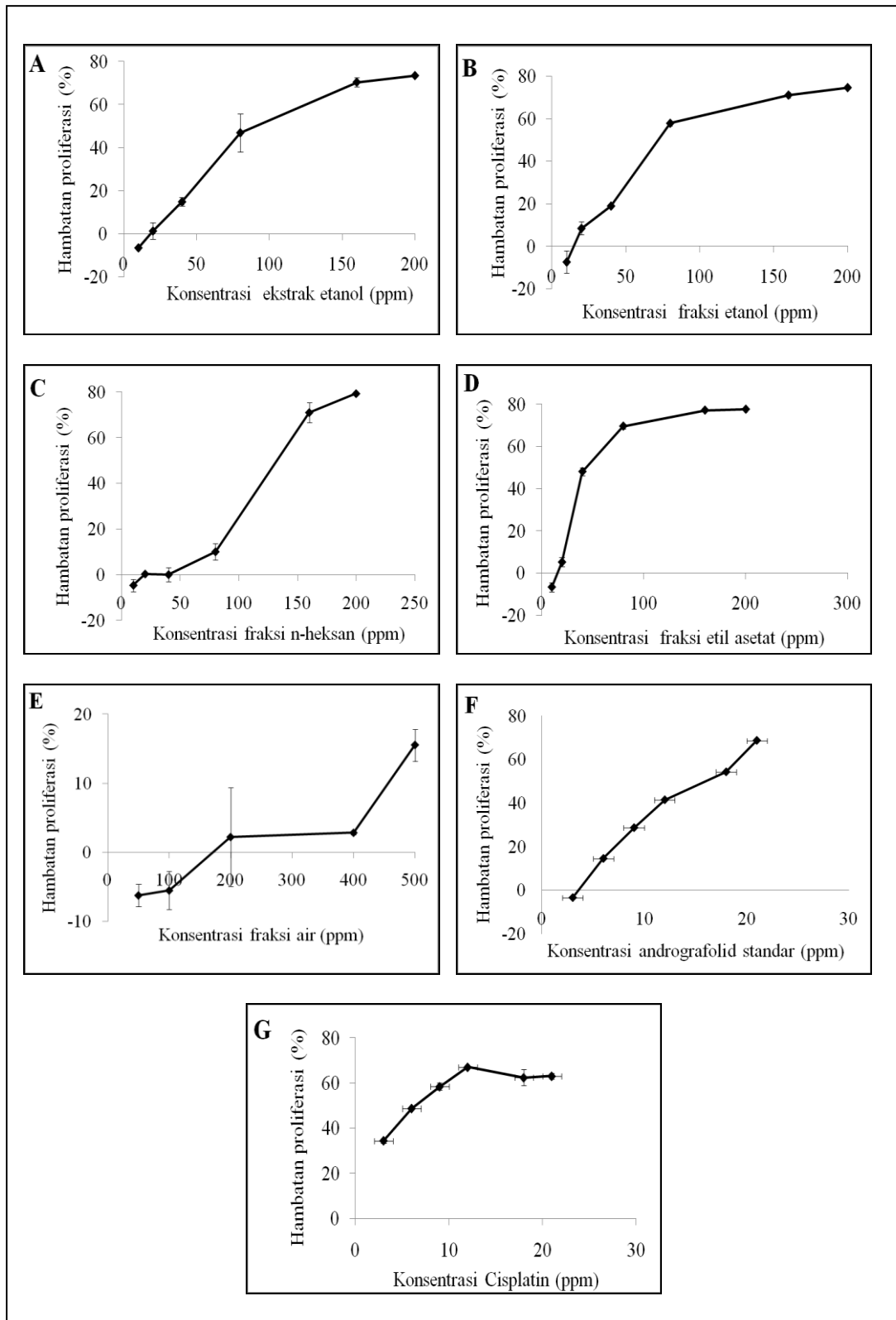
Sampel	Nilai IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etanol	105,20
Fraksi etanol	94,76
Fraksi <i>n</i> -heksan	158,94
Fraksi etil asetat	82,82
Fraksi air	934,16
Andrografolid standar	14,32
Cisplatin [®]	6,66

Menurut Syarifah (2007), fraksi etil asetat dari daun sambiloto memiliki nilai IC₅₀ sebesar 6,1 ppm yang diuji terhadap kultur sel kanker payudara galur MCF7. Dari data hasil uji menunjukkan bahwa fraksi etil asetat herba sambiloto memiliki nilai IC₅₀ lebih besar bila dibandingkan dengan nilai IC₅₀ fraksi etil asetat daun sambiloto yang diteliti oleh Syarifah. Hal ini mungkin dikarenakan sumber dan bagian tanaman yang digunakan berbeda sehingga senyawa yang terekstraksi/terfraksinasi memiliki jumlah dan kadar berbeda terhadap kultur sel kanker payudara.

Menurut Jada (2007), senyawa andrografolid yang diisolasi dari herba sambiloto memiliki nilai IC₅₀ sebesar 81,1 ppm yang di uji terhadap sel kanker payudara MCF7. Berdasarkan data hasil uji menunjukkan bahwa andrografolid standar memiliki nilai IC₅₀ lebih kecil bila dibandingkan dengan nilai IC₅₀ yang diteliti Jada. Hal ini mungkin lebih dikarenakan waktu dan kondisi sel yang digunakan berbeda sehingga memberikan penghambat proliferasi sel yang berbeda.

Berdasarkan kriteria yang ditetapkan oleh National Cancer Institute (NCI) bahwa suatu senyawa dinyatakan sitotoksik apabila senyawa tersebut mempunyai nilai IC₅₀ lebih kecil dari 20 ppm untuk ekstrak dan kurang dari 4 ppm untuk senyawa murni (Suffnes dan Pezzuto, 1991). Dengan demikian, fraksi etil asetat herba sambiloto dikatakan tidak memiliki efek sitotoksik karena memperlihatkan nilai IC₅₀ lebih besar dari 20 ppm tetapi memiliki persen hambatan yang tertinggi jika dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi herba sambiloto lainnya.

Pada Gambar 4.4 memperlihatkan bahwa hasil uji ekstrak dan fraksi herba sambiloto memberikan nilai presentase hambatan pertumbuhan terhadap sel MCF7 bersifat *dose dependent*, dalam hal ini semakin tinggi dosis persentase hambatan pertumbuhan sel semakin besar. Namun pada fraksi air, memperlihatkan persentase hambatan yang sangat kecil. Hal ini mungkin dikarenakan senyawa dalam fraksi air memiliki jumlah yang sangat kecil untuk menghambat pertumbuhan sel sehingga pada konsentrasi 500 ppm persentase hambatan sel MCF7 sebesar 15,50%. Nilai IC_{50} fraksi air herba sambiloto diperoleh sebesar 934,16 ppm. Hal seperti ini dilaporkan juga oleh Syarifah, bahwa fraksi air dari daun sambiloto memiliki nilai IC_{50} lebih besar 100 ppm dan diindikasikan tidak aktif terhadap sel kanker payudara galur MCF7 dan T47D. Pada gambar memperlihatkan juga bahwa andrografolid standard dan Cisplatin[®] sebagai pembanding menunjukkan efek hambatan proliferasi yang lebih kuat karena efek tersebut dicapai pada konsentrasi yang lebih rendah dibanding dengan ekstrak dan fraksi-fraksi herba sambiloto lainnya.



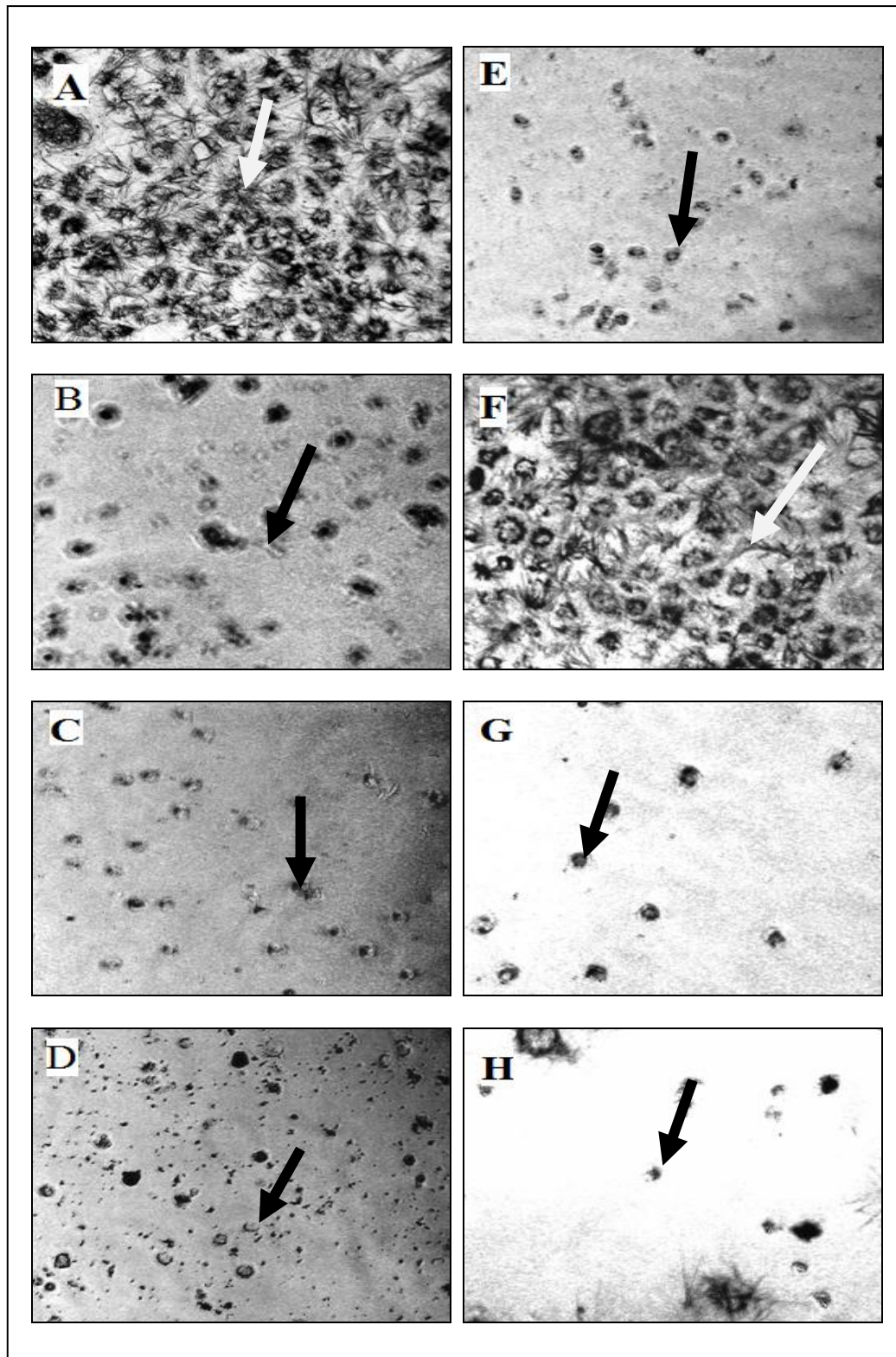
Gambar 4.4. Hubungan antara konsentrasi ekstrak/fraksi herba sambiloto (ppm) dengan hambatan proliferasi sel kanker payudara galur MCF7 (%). (A) ekstrak etanol, (B) fraksi etanol, (C) fraksi *n*-heksan, (D) fraksi etil asetat, (E) fraksi air, (F) andrografolid standar, dan (G) Cisplatin®

Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan menggunakan *microscope inverted*. Pengamatan secara mikroskopis setelah penambahan MTT dapat digunakan untuk melihat perbedaan morfologi sel MCF7 yang hidup dan mati atau rusak. Sel yang mati atau rusak memperlihatkan adanya pengkerutan pada sel sedangkan pada sel yang hidup tampak adanya kristal formazan pada permukaan sel. Uji MTT didasarkan atas pemecahan garam tetrazolium yang terjadi pada mitokondria sel yang hidup oleh enzim suksinat dehidrogenase sedangkan sel yang mati atau rusak tidak memiliki kemampuan mereduksi garam tetrazolium. Hasil pengamatan secara mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 4.5.

Dari Gambar tersebut terlihat bahwa untuk sel MCF7 dengan perlakuan ekstrak etanol, fraksi etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, andrografolid standard dan Cisplatin® memperlihatkan sel mengalami kerusakan. Sementara itu sel MCF7 tanpa perlakuan dan dengan perlakuan fraksi air memperlihatkan masa kristal seperti jarum pada permukaan sel. Hal ini mungkin disebabkan fraksi air memiliki pesentase hambatan yang sangat kecil, sehingga sel MCF7 yang diberi perlakuan fraksi air pada konsentrasi 500 ppm mampu mereduksi garam tetrazolium dan memperlihatkan kristal formazan pada permukaan sel.

Kemungkinan lain yang menyebabkan terbentuknya kristal formazan adalah adanya senyawa-senyawa yang terkandung dalam fraksi air. Fraksi air merupakan fraksi yang larut dalam pelarut polar sehingga diduga senyawa-senyawa bersifat polar yang terkandung dalam fraksi air ikut berperan dalam menginduksi pembentukan kristal formazan.

Kristal formazan seperti jarum yang melekat pada permukaan sel di duga berasal dari butiran-butiran formazan yang terdapat pada intraseluler sel MCF7. Hal yang sama dilaporkan oleh Liu (2007), bahwa terbentuknya kristal formazan seperti jarum pada permukaan sel berasal dari butiran formazan dari intraseluler sel B12 setelah diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C dan dikeluarkan ke permukaan sel melalui *exocytosis*.



Gambar 4.5. Mikrofotograf dari sel kanker payudara galur MCF7 tanpa dan dengan perlakuan setelah penambahan MTT. (A) tanpa perlakuan (B) ekstrak etanol 200 ppm, (C) fraksi etanol 200 ppm, (D) fraksi *n*-heksan 200 ppm, (E) fraksi etil asetat 200 ppm, (F) fraksi air 500 ppm, (G) andrografolid standar 21 ppm, (H) Cisplatin® 21 ppm. Tanda panah hitam menunjukkan sel mengalami kematian dan tanda panah putih menunjukkan kristal formazan.

Universitas Indonesia

4.3.2.2 Uji terhadap sel kanker payudara galur T47D

Ekstrak dan fraksi herba sambiloto kemudian dilakukan uji lebih lanjut terhadap sel kanker payudara galur T47D. Tabel 4.5 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas hambatan proliferasi yang lebih tinggi dengan nilai IC_{50} 45,27 ppm dibanding dengan ekstrak etanol, fraksi etanol, fraksi *n*-heksan, dan fraksi air. Akan tetapi, aktivitasnya lebih rendah bila dibandingkan dengan andrografolid standar dan Cisplatin[®]. Menurut Syarifah (2007), fraksi etil asetat dari daun sambiloto yang diuji terhadap sel kanker T47D memiliki nilai IC_{50} sebesar 8,3 ppm. Jika dibandingkan dengan hasil uji, fraksi etil asetat herba sambiloto memiliki nilai IC_{50} yang lebih besar dibandingkan dengan IC_{50} yang diteliti oleh Syarifah. Hal yang sama pada uji terhadap sel MCF7, mungkin dikarenakan sumber dan bagian tanaman yang digunakan berbeda sehingga senyawa yang terekstraksi/terfraksinasi memiliki jumlah dan kadar yang berbeda sehingga memberikan tingkat aktivitas yang berbeda terhadap sel kanker galur T47D. Berdasarkan kriteria yang ditetapkan oleh NCI, fraksi etil asetat dikatakan tidak memiliki efek sitotoksik karena memiliki nilai IC_{50} lebih dari 20 ppm tetapi memiliki persen hambatan yang tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak atau fraksi herba sambiloto lainnya.

Tabel 4.5.
Nilai IC_{50} ekstrak dan fraksi herba sambiloto, andrografolid standar, dan Cisplatin[®] terhadap sel kanker payudara galur T47D

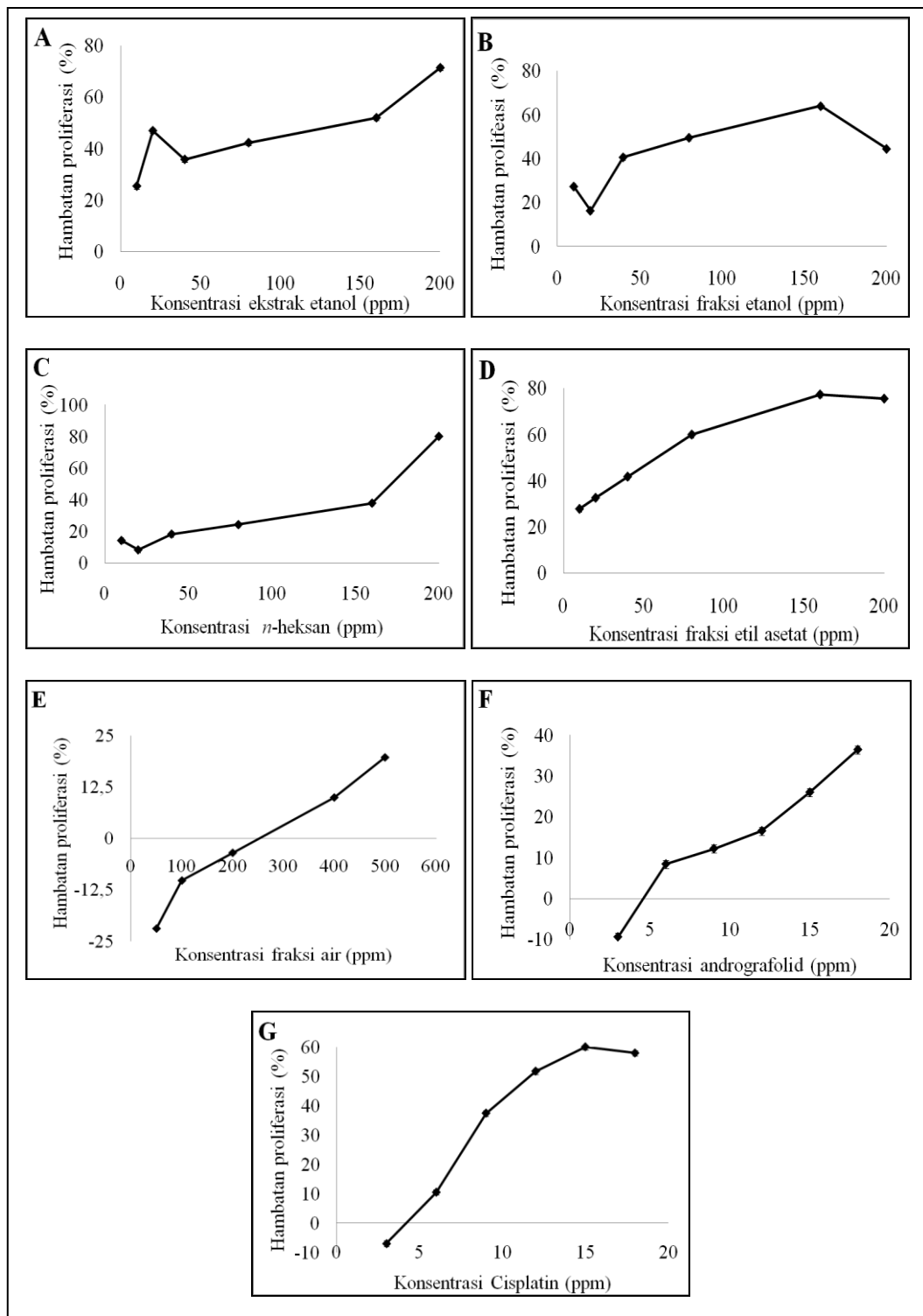
Sampel	Nilai IC_{50} (ppm)
Ekstrak etanol	79,11
Fraksi etanol	121,76
Fraksi <i>n</i> -heksan	153,63
Fraksi etil asetat	45,27
Fraksi air	1.064,56
Andrografolid standar	17,66
Cisplatin [®]	12,82

Pada Gambar 4.6 memperlihatkan bahwa hasil uji untuk ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan, dan fraksi air herba sambiloto menunjukkan nilai presentase hambatan pertumbuhan terhadap sel MCF7 yang bersifat *dose dependent*. Namun pada fraksi etanol terjadi penurunan persentase hambatan pertumbuhan pada dosis 200 ppm. Hal ini mungkin dikarenakan adanya

kandungan senyawa yang dapat menginduksi proliferasi sel atau senyawa yang bersifat *dual effect*, yaitu senyawa yang dapat mendorong dan menghambat proliferasi sel, tergantung besarnya konsentrasi senyawa tersebut. Hal seperti ini dilaporkan juga oleh Sumaryono dan Wibowo (2010), yaitu bahwa senyawa pada ekstrak etanol daun *Aglaia elliptica* Blume bersifat *dual effect* terhadap sel kanker servik (HeLa). Pada konsentrasi lebih kecil 250 ppm senyawa pada ekstrak etanol dapat mendorong proliferasi sel HeLa, tetapi pada konsentrasi 500 ppm senyawa tersebut justru mendorong kematian sel HeLa. Pada penelitian ini kadar senyawa dalam fraksi etanol yang mungkin bersifat *dual effect* relatif kecil dihitung terhadap total senyawa dalam fraksi, sehingga baru pada dosis 200 ppm muncul efek yang berlawanan, yaitu peningkatan proliferasi sel. Kemungkinan lain yang menyebabkan hasil uji pada fraksi etanol tidak bersifat *dose dependent* adalah adanya senyawa dalam sampel uji yang memberikan reduksi intrinsik terhadap pereaksi MTT. Pada uji MTT perlu dihindari terjadinya reduksi senyawa MTT oleh senyawa-senyawa ekstraseluler seperti adanya senyawa antioksidan, senyawa fitoestrogen, dan berbagai ekstrak tanaman dapat menginduksi pembentukan formazan dari MTT meskipun tidak ada sel hidup. Tahapan pencucian sel setelah pemberian sampel uji sebelum penambahan MTT juga menjadi salah satu faktor penting dalam menghindari terjadinya reduksi intrinsik (Sumaryono dan Wibowo, 2010).

Fraksi air memiliki persen hambatan yang rendah dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi-fraksi herba sambiloto lainnya (Gambar 4.6), pada konsentrasi 500 ppm memiliki persen hambatan sebesar 19,77%. Hal yang sama pada sel MCF7, mungkin dikarenakan senyawa yang terkandung dalam fraksi air memiliki jumlah yang sangat kecil untuk menghambat pertumbuhan sel kanker. Hal seperti ini dilaporkan juga oleh Syarifah (2007), bahwa fraksi air dari daun sambiloto memiliki nilai IC_{50} lebih besar 100 ppm yang diindikasikan tidak aktif terhadap sel kanker payudara MCF7 dan T47D. Gambar 4.6 memperlihatkan bahwa secara keseluruhan persen hambatan tertinggi dimiliki oleh Cisplatin[®], kemudian diikuti oleh andrografolid standar, fraksi etil asetat, fraksi etanol, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, dan fraksi air. Cisplatin[®] memiliki efek hambatan proliferasi yang lebih

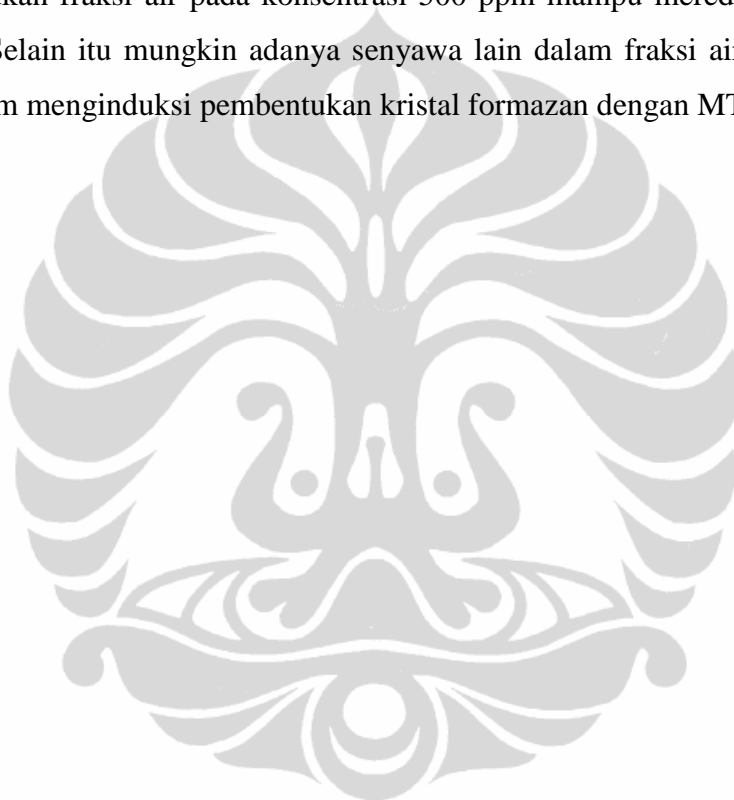
kuat karena efek tersebut dicapai pada konsentrasi yang rendah dibandingkan dengan andrografolid standar, ekstrak atau fraksi-fraksi herba sambiloto lainnya.

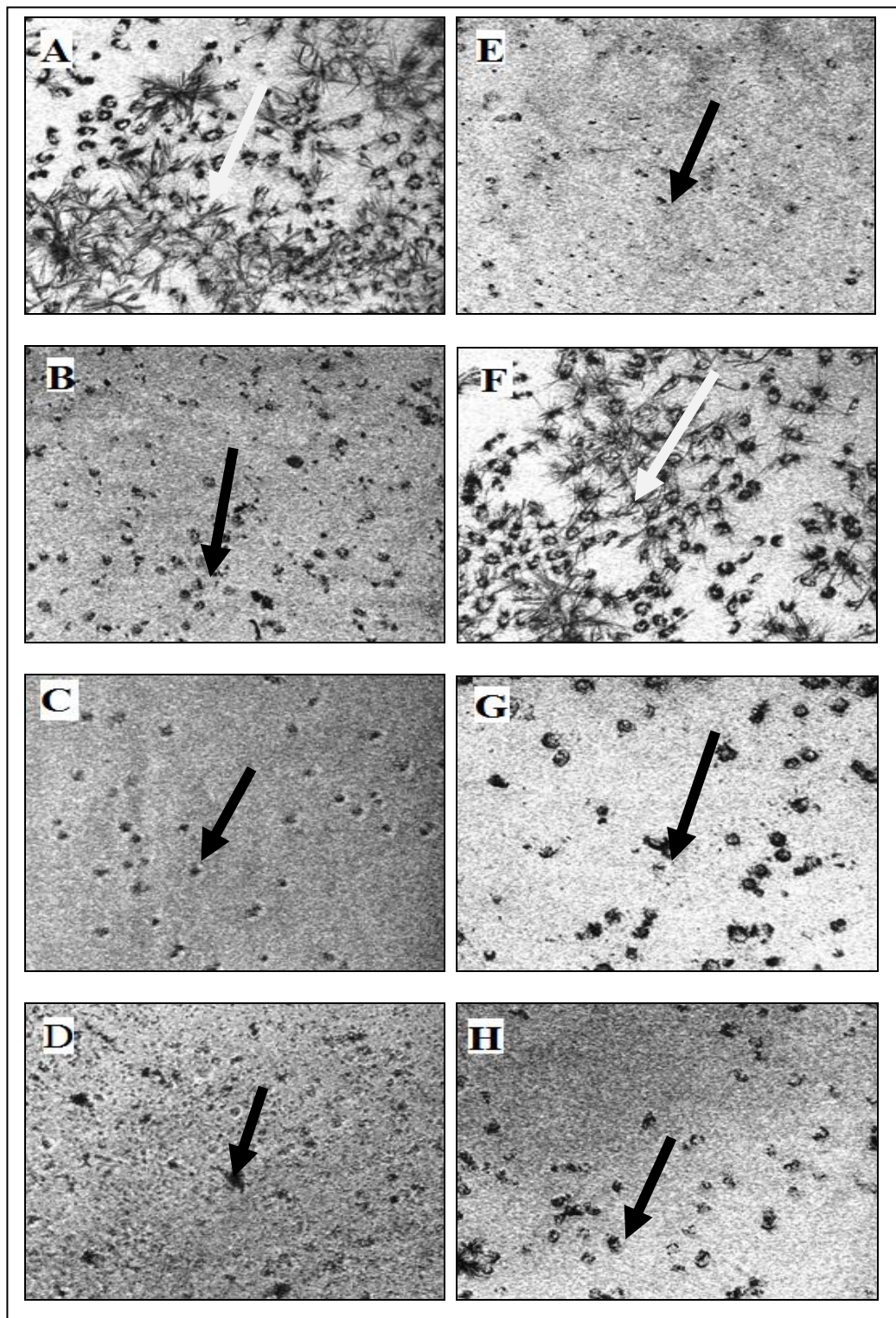


Gambar 4.6. Hubungan antara konsentrasi ekstra/fraksi herba sambiloto (ppm) dengan hambatan proliferasi sel kanker payudara galur T47D (%). (A) ekstrak etanol, (B) fraksi etanol, (C) fraksi *n*-heksan, (D) fraksi etil asetat, (E) fraksi air, (F) andrografolid standar, dan (G) Cisplatin®.

Universitas Indonesia

Pengamatan sel T47D secara mikroskopis setelah penambahan MTT dapat dilihat pada Gambar 4.7. Dari Gambar tersebut dapat dilihat bahwa pada sel yang diberi perlakuan ekstrak etanol, fraksi etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, andrografolid dan Cisplatin® memperlihatkan sel mengalami kerusakan dan pengkerutan. Namun pada sel tanpa perlakuan dan sel yang diberi perlakuan fraksi air memperlihatkan masa kristal seperti jarum pada permukaan sel. Hal yang sama pada pengamatan sel MCF7, mungkin dikarenakan sel T47D yang diberi perlakuan fraksi air pada konsentrasi 500 ppm mampu mereduksi garam tetrazolium. Selain itu mungkin adanya senyawa lain dalam fraksi air yang ikut berperan dalam menginduksi pembentukan kristal formazan dengan MTT.

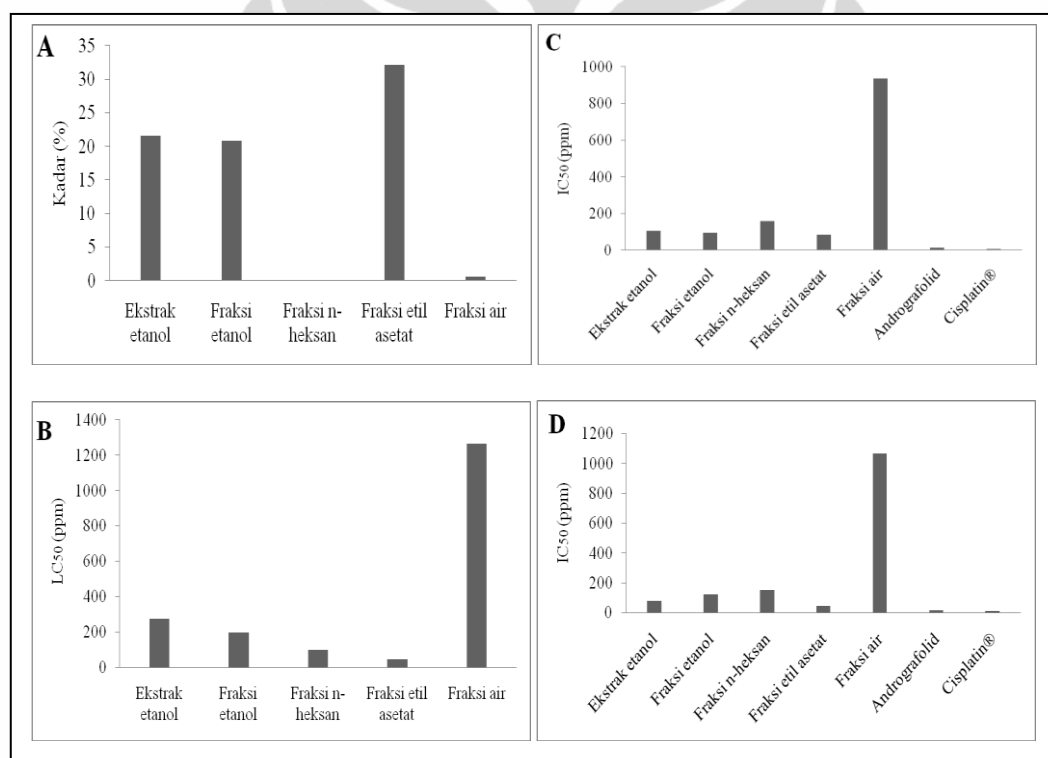




Gambar 4.7. Mikrofotograf dari sel kanker payudara galur T47D tanpa dan dengan perlakuan setelah penambahan MTT. (A) sel tanpa perlakuan (B) ekstrak etanol 200 ppm, (C) fraksi etanol 200 ppm, (D) fraksi *n*-heksan 200 ppm, (E) fraksi etil asetat 200 ppm, (F) fraksi air 500 ppm, (G) andrografolid standar 18 ppm, dan (H) Cisplatin 18 ppm[®]. Tanda panah hitam menunjukkan sel mengalami kematian dan tanda panah putih menunjukkan kristal formazan.

Universitas Indonesia

Secara keseluruhan uji sitotoksik pada ekstrak dan fraksi herba sambiloto menunjukkan adanya korelasi antara uji sitotoksik pendahuluan menggunakan BSLT dan uji sitotoksik menggunakan metode MTT *assay*. Fraksi etil asetat dengan kadar andrografolid tertinggi (Gambar 4.8 A) dan yang di uji dengan menggunakan metode BSLT memiliki nilai LC_{50} terkecil dibandingkan dengan ekstrak etanol, fraksi etanol, fraksi *n*-heksan, dan fraksi air (Gambar 4.8 B). Hal yang sama juga ditunjukkan pada uji sitotoksik dengan metode MTT *assay*, fraksi yang memberikan nilai IC_{50} terkecil yaitu fraksi etil asetat (Gambar 4.8 C dan D). Dengan demikian fraksi etil asetat adalah fraksi yang dipilih untuk dilakukan karakterisasi dan dilanjutkan ke formulasi dalam upaya memperbaiki kelarutan andrografolid.



Gambar 4.8. Hubungan kadar andrografolid (%) dengan nilai LC_{50}/IC_{50} (ppm). (A) kadar andrografolid, (B) nilai LC_{50} terhadap *A. salina* Leach, (C) nilai IC_{50} terhadap sel MCF7, dan (D) nilai IC_{50} terhadap sel T47D.

4.4 Evaluasi dan karakterisasi fraksi etil asetat herba sambiloto

Fraksi aktif atau fraksi etil asetat berdasarkan hasil uji sitotoksik kemudian dilakukan evaluasi dan karakterisasi dengan tujuan untuk mengetahui standar mutu fraksi aktif yang akan digunakan sebelum dilakukan formulasi. Standarisasi

dalam kefarmasian adalah serangkaian parameter, prosedur, dan cara pengukuran yang hasilnya merupakan unsur-unsur terkait paradigma mutu kefarmasian, mutu dalam artian memenuhi syarat standar kimia, biologi dan farmasi. Standarisasi ini dimaksud agar dapat menjamin bahwa fraksi aktif mempunyai nilai parameter tertentu yang konstan (Depkes RI, 2000^b).

Persyaratan mutu ekstrak terdiri dari parameter spesifik dan parameter non spesifik. Parameter spesifik terkait dengan senyawa kandungan asli dari tumbuhan asal dan senyawa hasil perubahan dari senyawa asli. Sedangkan parameter non spesifik terkait dengan senyawa kontaminan baik sebagai polutan atau aditif proses dan senyawa hasil interaksi kontaminan dengan senyawa asli (Depkes RI, 2000^b). Data hasil evaluasi dan karakterisasi fraksi etil asetat pada berbagai parameter pengujian diringkas pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6
Hasil evaluasi dan karakterisasi fraksi etil asetat herba sambiloto

Parameter	Hasil
Deskripsi	
Nama fraksi	Fraksi etil asetat herba sambiloto
Nama latin	<i>Andrographis paniculata</i> Nees
Bagian tanaman	Herba
Organoleptik	
Bentuk	Ekstrak sangat kental
Warna	Hijau tua kekuningan
Bau	Khas
Rasa	Sangat pahit
Parameter spesifik	
Kadar senyawa larut dalam pelarut air	0,58%
Kadar senyawa larut dalam etil asetat	1,53%
Identifikasi terhadap kandungan kimia	
a. Alkaloid	Positif
b. Saponin	Negatif
c. Tanin	Negatif
d. Fenol	Negatif
e. Flavonoid	Positif
f. Steroid dan triterpenoid	Positif
Parameter nonspesifik	
Susut pengeringan	0,23%
Kadar air	8,03%
Kadar abu	1,90%
Kadar andrografolid	32,13%

4.4.1 Penetapan parameter spesifik

4.4.1.1 Identifikasi

Sebelum dilakukan pengujian, simplisia dideterminasi terlebih dahulu di Herbarium *Bogoriense*, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, Jawa Barat. Dari hasil determinasi menunjukkan bahwa simplisia yang digunakan adalah tumbuhan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees). Determinasi perlu dilakukan untuk mengetahui jenis simplisia yang akan digunakan dalam proses standarisasi.

4.4.1.2 Pemeriksaan organoleptik

Hasil pemeriksaan organoleptik dari fraksi etil asetat herba sambiloto berupa ekstrak kental, berwarna hijau tua kekuningan, bau spesifik, dan rasa sangat pahit. Penentuan organoleptik dilakukan dengan menggunakan pancaindera bertujuan untuk pengenalan awal secara sederhana dan subjektif.

4.4.1.3 Penentuan senyawa larut dalam pelarut tertentu

Penentuan kadar senyawa terlarut dalam pelarut tertentu sangat penting untuk mengetahui gambaran awal jumlah senyawa kandungan yang larut dalam pelarut tertentu dalam hal ini adalah pelarut air dan etil asetat. Kadar senyawa yang larut dalam air dan etil asetat dari fraksi etil asetat herba sambiloto adalah 0,58 dan 1,53%. Kadar senyawa larut dalam air yang diperoleh memberikan arti bahwa fraksi etil asetat dapat larut dalam air dengan jumlah zat terlarut yang identik 0,58%. Kadar senyawa larut dalam etil asetat yang diperoleh menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dapat larut dalam etil asetat dengan jumlah zat terlarut yang identik 1,53%. Ini berarti ekstrak lebih banyak terlarut dalam etil asetat dibanding dengan air. Untuk syarat kemurnian dari simplisia maupun ekstrak minimum harus dilakukan uji penetapan kadar zat terekstraksi dalam air dan pelarut tertentu.

4.4.1.4 Identifikasi kandungan kimia

Hasil identifikasi kandungan kimia yang terkandung dalam fraksietil asetat herba sambiloto, menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, dan triterpenoid.

4.4.2 Penetapan parameter non spesifik

4.4.2.1 Penetapan kadar susut pengeringan

Penetapan kadar susut pengeringan suatu fraksi etil asetat bertujuan untuk mengetahui batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Susut pengeringan fraksi etil asetat herba sambiloto adalah 0,23%. Susut pengeringan menunjukkan bahwa sisa bahan yang mudah menguap/atsiri dan sisa pelarut organik yang menguap dalam fraksi etil asetat herba sambiloto maksimal 0,23%.

4.4.2.2 Penetapan kadar air

Kadar air dalam fraksi etil asetat herba sambiloto diperoleh 8,03%. Penetapan kadar air sangat penting ditetapkan untuk menjaga kualitas fraksi etil asetat. Disamping untuk menetapkan kadar air, dapat juga untuk menentukan jumlah zat lain yang mudah menguap. Menurut literatur kadar air dalam ekstrak tidak boleh lebih dari 10% (Arifin *et al.*, 2006). Hal ini bertujuan untuk menghindari terjadinya pertumbuhan mikroba (bakteri atau jamur), terjadinya reaksi hidrolisis/penguraian oleh enzim yang menyebabkan terjadinya perubahan spesifikasi bahan dan penurunan kualitas produk. Kadar air yang rendah kemungkinan dapat dipengaruhi oleh cukup efisiennya proses pengeringan simplisia yang dilakukan pada pasca panen dan proses penguapan pelarut pada fraksinasi. Air dapat berasal dari kandungan simplisia, proses ekstraksi atau penyerapan uap air dari udara, baik saat penyimpanan simplisia maupun ekstrak.

4.4.2.3 Penetapan kadar abu

Penetapan kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya fraksi. Kadar abu fraksi etil asetat herba sambiloto di dapat sebesar 1,90%. Hal

ini menunjukkan bahwa sisa anorganik yang terdapat dalam fraksi etil asetat sebesar 1,90%. Sisa senyawa anorganik ini dapat berasal dari simplisia dan pelarut yang digunakan pada saat ekstraksi dan fraksinasi.

4.5 Pengukuran viskositas formula mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto

Dalam penelitian ini, mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto dibuat dengan menggunakan dua polimer yang berbeda yaitu PVP K30 dengan konsentrasi 5%, 7,5%, dan 10 % (formula A, B, dan C) dan HPMC dengan konsentrasi 5%, 7,5%, dan 10% (formula D, E, dan F). Kedua polimer tersebut merupakan polimer hidrofilik yang dapat digunakan sebagai penyalut obat yang sukar larut dalam air (Rowe, 2006; Leuner dan Jennifer, 2000).

Pengukuran viskositas dilakukan untuk mengetahui kekentalan dari masing-masing formula sehingga dapat mengetahui respon aliran formula ketika akan disemprotkan ke dalam alat semprot kering. Evaluasi viskositas dilakukan dengan *viscometer* Brookfield menggunakan spindel 1 pada variasi kecepatan yang berbeda. Viskositas dari keenam formula dalam medium campuran etanol-air menunjukkan hasil yang berbeda-beda yaitu berkisar antara 10-76 cps seperti yang terlihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7.
Viskositas formula mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto

Formula	Viskositas (cps)
A	10 - 20
B	10 - 23
C	10 - 29,5
D	17,50 - 36,5
E	30 - 56,5
F	50- 76

Tabel 4.7 menunjukkan bahwa seiring dengan kenaikan jumlah dan konsentrasi polimer dalam formula maka viskositas yang dihasilkan juga semakin besar. Oleh karena itu, viskositas formula yang mengandung polimer PVP K30 tertinggi dimiliki oleh formula C kemudian diikuti formula B dan A. Hal yang sama pada formula yang mengandung polimer HPMC, viskositas tertinggi dimiliki oleh formula F kemudian diikuti formula E dan D. Viskositas PVP K30

dan HPMC dalam larutan dipengaruhi oleh berat molekul, konsentrasi, dan temperatur. Semakin tinggi berat molekul dan konsentrasi PVP K30 atau HPMC maka viskositas larutan akan semakin meningkat, sedangkan kenaikan suhu akan menyebabkan penurunan viskositas larutan (Siepmann dan Peppas, 2001; Volker, 2005).

4.6 Pembuatan mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto

Mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto dibuat dengan metode semprot kering. Metode semprot kering dipilih karena mempunyai beberapa keuntungan yaitu metodenya sederhana, ekonomis, teknologinya sudah banyak dikuasai, tersedianya peralatan, dan dapat digunakan untuk produksi mikrosfer dalam jumlah besar (Thies, 1996).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Alanazi (2007), kondisi proses yang digunakan untuk memperbaiki laju disolusi albendazol menggunakan polimer hidrofilik yaitu suhu masuk 160°C, suhu keluar 90°C, dan kecepatan 16 mL/menit. Namun pada penelitian ini tetap dilakukan optimasi suhu masuk dan suhu keluar terlebih dahulu dengan mempertimbangan suhu terhadap kondisi penyimpanan dan stabilitas kedua polimer. Suhu yang dipakai untuk pengeringan dipilih melalui optimasi untuk menghasilkan mikrosfer yang kering dan tidak lembab, karena jika mikrosfer yang dihasilkan lembab maka serbuk mikrosfer akan saling melekat dan membentuk agregat. Kondisi yang dipilih untuk mikrosfer yang menggunakan polimer PVP K30 yaitu suhu masuk 140°C, suhu keluar 80°C, dan kecepatan 5 mL/menit, sedangkan mikrosfer yang menggunakan polimer HPMC yaitu suhu masuk 190°C, suhu keluar 90°C, dan kecepatan 15 mL/menit. Kondisi proses yang digunakan untuk pengeringan kedua polimer berbeda hal ini dikarenakan sifat polimer yang digunakan berbeda.

Polimer PVP K30 mempunyai sifat higroskopis, stabil pada suhu 110-130°C dalam jangka pendek dan memberikan warna gelap pada suhu 150°C. Jika suhu masuk yang digunakan lebih rendah maka proses pengeringan mikrosfer yang dihasilkan kurang sempurna dan serbuk banyak tertinggal pada kamar pengering sehingga perolehan mikrosfer sangat kecil, sedangkan jika suhu masuk yang digunakan terlalu tinggi dikhawatirkan mikrosfer yang dihasilkan akan tidak

stabil. Laju alir yang digunakan pada pembuatan mikrosfer ini adalah 5 mL/menit, hal ini dikarenakan viskositas larutan yang akan disemprot sangat rendah. Apabila digunakan laju alir yang lebih besar maka pengeringan tidak berjalan sempurna sehingga mikrosfer yang dihasilkan banyak menempel pada kamar pengering dan tidak diperoleh hasil pada tempat pengumpul.

Suhu yang digunakan pada pembuatan mikrosfer yang menggunakan polimer HPMC lebih tinggi dibanding dengan PVP K30. Kondisi ini ditetapkan berdasarkan uji pendahuluan. Jika suhu masuk yang digunakan lebih rendah atau lebih tinggi maka proses pengeringan mikrosfer yang dihasilkan kurang sempurna. Laju yang digunakan untuk pengeringan pada mikrosfer yang menggunakan polimer HPMC lebih tinggi dibandingkan dengan polimer PVP yakni sebesar 15 mL/menit. Hal ini dikarenakan viskositas larutan HPMC lebih besar dibanding dengan PVP K30. Kondisi proses pengeringan ini menghasilkan serbuk sangat halus, kering dan tidak mengalami agregasi. Hal ini dikarenakan proses semprot kering berjalan dengan kecepatan penguapan yang tinggi, sehingga kandungan air pada mikrosfer menjadi rendah dan serbuk tidak saling melekat (Thies, 1996).

Pelarut yang digunakan dalam pembuatan mikrosfer adalah campuran etanol-air karena fraksi etil asetat sebagai bahan obat tidak larut dalam air. Oleh karena itu untuk mendispersikan ke dalam larutan penyalut, fraksi etil asetat terlebih dahulu dilarutkan dengan bantuan pelarut etanol 96%.

Proses pembuatan mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto terdiri dari beberapa tahap yang diawali dari preparasi, yaitu pendispersian dan homogenisasi penyalut PVP K30 atau HPMC di dalam air dengan jumlah yang sesuai dengan konsentrasi setiap formula (Tabel 3.1). Fraksi etil asetat herba sambiloto sebagai zat aktif dilarutkan dalam etanol 96%, kemudian didispersikan kedalam larutan penyalut tersebut. Tahap berikutnya adalah atomisasi, yaitu mengubah larutan penyalut yang berisi zat aktif menjadi tetes-tetes kecil yang kemudian diupkan dengan udara panas. Tahap terakhir, pengumpulan dan pengambilan mikrosfer yang telah kering dari tempat pengumpul. Mikrosfer yang di peroleh berbentuk serbuk sangat halus, warna kuning kecoklatan, bau spesifik, dan rasa pahit.

4.7 Evaluasi dan karakterisasi mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto

Hasil evaluasi dari keenam formula mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto pada berbagai parameter pengujian diringkas pada Tabel 4.8, kecuali pengujian pemeriksaan bentuk dan morfologi mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto.

Tabel 4.8.
Ringkasan hasil evaluasi mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto

Formula	UPK (%)	Diameter rata-rata (μm)	Kadar air (%)	Efisiensi penjerapan (%)
A	19,50	13,13	13,44	94,83 \pm 0,93
B	24,00	19,23	12,08	97,38 \pm 2,25
C	31,64	12,61	12,95	99,82 \pm 0,32
D	30,84	1,50	6,01	112,15 \pm 2,17
E	29,10	1,44	5,96	111,92 \pm 2,21
F	31,20	1,45	5,15	96,55 \pm 1,93

4.7.1 Uji perolehan kembali proses (UPK)

Nilai UPK atau rendemen mikrosfer merupakan faktor yang penting untuk melihat apakah metode mikroenkapsulasi yang digunakan baik atau tidak. Nilai UPK dari serbuk mikrosfer yang dihasilkan berkisar antara 19,50-31,64%.

Tabel 4.8 menunjukkan bahwa seiring dengan meningkatnya jumlah bahan yang digunakan maka nilai UPK yang dihasilkan juga semakin tinggi. Pada formula A, B, dan C yang menggunakan polimer PVP K30 memiliki nilai UPK masing-masing sebesar 19,50; 24,00; dan 31,64%. Sedangkan formula D, E, dan F yang menggunakan HPMC memiliki nilai masing-masing sebesar 30,85; 29,09; dan 31,18%. Formula C memiliki nilai UPK lebih besar dibanding formula A dan B, hal ini dikarenakan jumlah bahan yang digunakan untuk membentuk mikrosfer pada formula C lebih banyak. Hal yang sama juga pada formula F memiliki nilai UPK yang besar dibanding dengan formula D dan E.

Hasil UPK yang diperoleh memberikan persentase hasil yang rendah, hal ini mungkin dikarenakan viskositas pada masing-masing formula sangat rendah sehingga mempengaruhi proses atomisasi dalam pembentukan droplet. Viskositas larutan yang rendah membutuhkan energi dan tekanan yang lebih kecil sehingga droplet yang dihasilkan dapat lolos dan terbawa keluar oleh adanya tekanan. Hasil UPK rendah juga dilaporkan oleh Tewa-tagne (2007) pada pembuatan nanokapsul

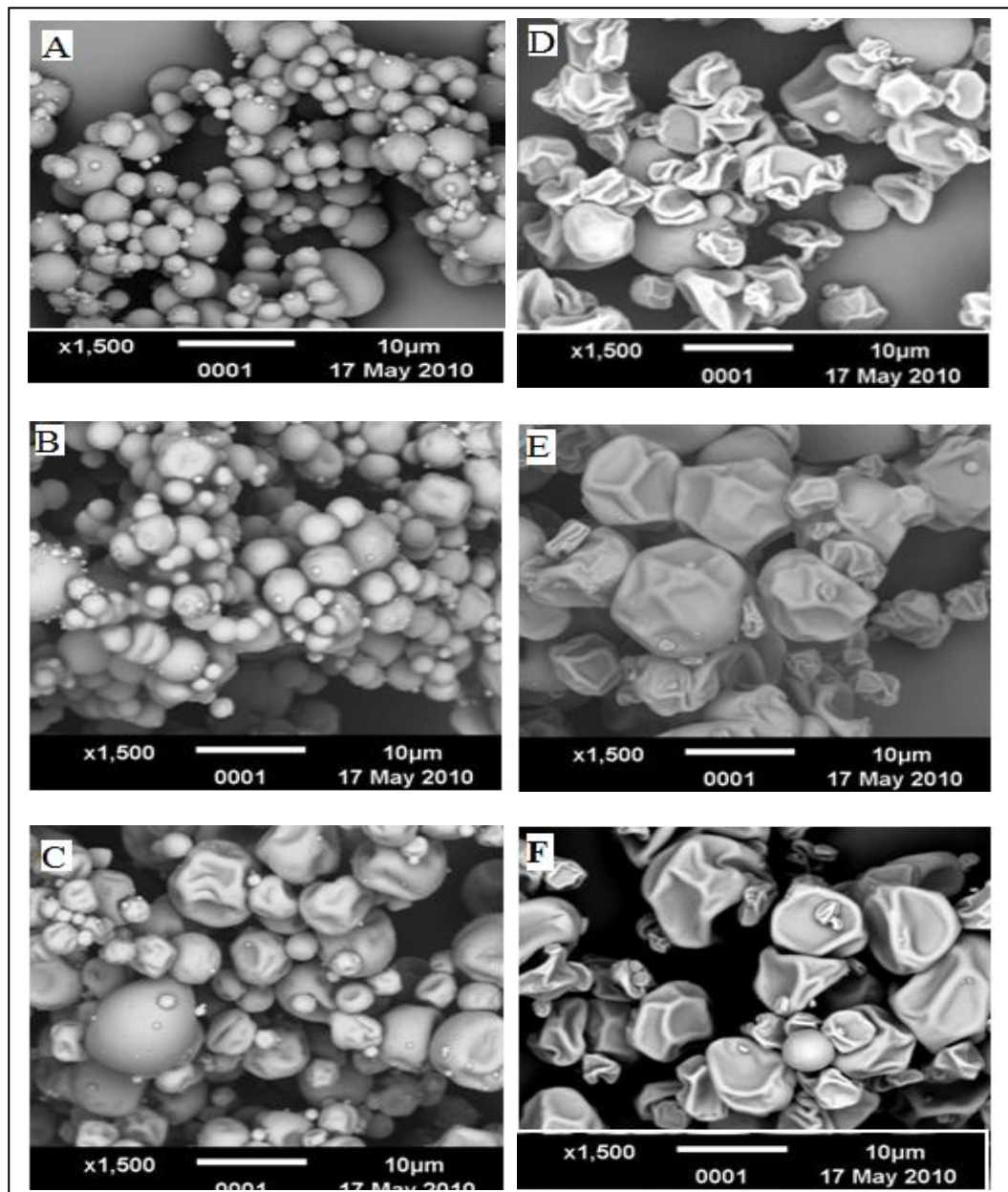
menggunakan polimer PVP K90 dengan konsentrasi 5% diperoleh nilai sebesar 43%. Hal yang sama dilaporkan oleh Alanazi (2007), pada pembuatan mikropartikel yang menggunakan PVP K15 dan HPMC diperoleh nilai UPK kurang dari 50% dan tidak berbeda signifikan antara rasio dan jenis polimer dengan nilai UPK.

4.7.2 Pemeriksaan bentuk dan morfologi

Pemeriksaan bentuk dan morfologi mikrosfer dilakukan dengan menggunakan alat *Scanning Electron Microscope* (SEM). Hasil SEM dari keenam formula dengan perbesaran 1.500x ditunjukkan pada Gambar 4.9. Mikrosfer yang dihasilkan berbentuk bulat dengan permukaan halus hingga tidak beraturan.

Mikrosfer yang terbuat dari polimer PVP K30 (formula A, B, dan C) memiliki tekstur yang khas yaitu berbentuk bulat dengan permukaan yang halus hingga sedikit cekung. Formula A dan B memiliki bentuk bulat dengan permukaan halus, sedangkan formula C ditemukan bentuk bulat dengan permukaan sedikit cekung. Hal ini mungkin disebabkan adanya peningkatan viskositas. Formula C memiliki viskositas yang lebih tinggi dibandingkan dengan formula A dan B, sehingga mempengaruhi proses pengeringan selama atomisasi. Ketika tetesan mengalami kontak dengan udara pengering, penguapan berlangsung kurang sempurna sehingga beberapa partikel memperlihatkan permukaan sedikit cekung.

Mikrosfer yang dibuat dari polimer HPMC (formula D, E, dan F) memiliki bentuk bulat dengan permukaannya cekung dan tidak beraturan. Mikrosfer yang terbuat dari HPMC memiliki bentuk yang berbeda dengan mikrosfer yang terbuat dari PVP K30. Hal ini mungkin dikarenakan perbedaan sifat dan jenis polimer. HPMC merupakan polimer semi sintesis derivat selulosa yang banyak mengandung gugus hidroksi sehingga lebih mudah mengikat air daripada PVP K30 (Rowe, 2005). Pada saat proses pengeringan berlangsung terjadi pengurangan volume air yang lebih banyak, sehingga struktur seluler dari HPMC mengalami penyusutan bentuk partikel dan mengakibatkan air yang semula terperangkap dalam matrik meninggalkan bekas yakni berupa permukaan yang cekung (Surini *et al.*, 2009).



Gambar 4.9 Mikrofotograf dari mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto pada perbesaran 1.500x. (A) formula A, (B) formula B, (C) formula C, (D) formula D, (E) formula E, dan (F) formula F.

4.7.3 Distribusi ukuran partikel

Penentuan distribusi ukuran partikel mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto dimaksud untuk mengetahui ukuran rata-rata partikel. Evaluasi distribusi ukuran partikel dinyatakan berdasarkan perbedaan diameter volume partikel menggunakan alat *particle size distribution analyzer*. Penyiapan sampel dilakukan dengan mendispersikan sampel dalam medium yang sesuai. Medium

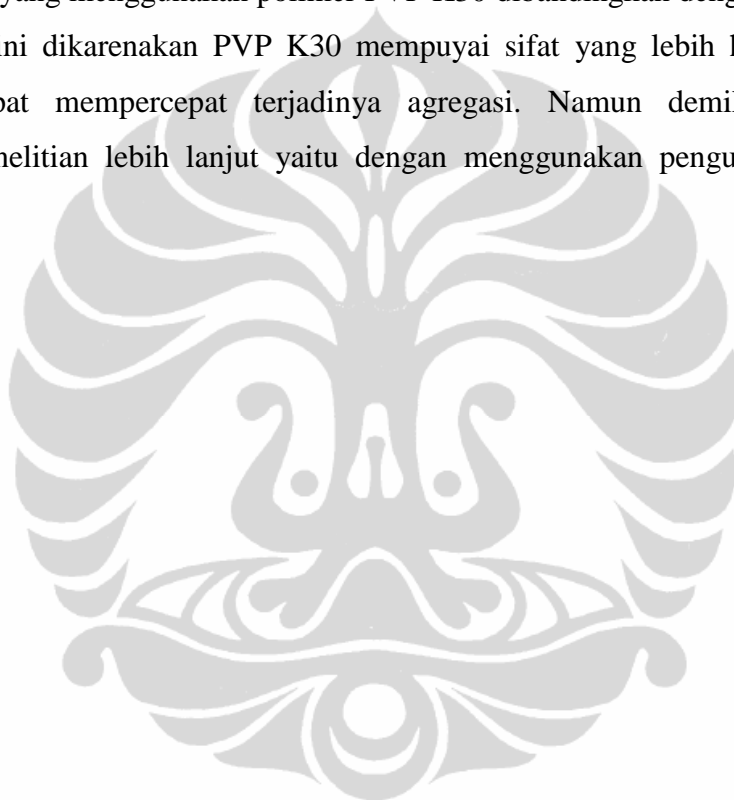
yang digunakan untuk mendispersikan formula yang mengandung PVP K30 adalah minyak mineral. Medium yang digunakan untuk mendispersikan formula yang mengandung HPMC adalah etanol 96%. Medium yang digunakan untuk penentuan distribusi ukuran partikel berbeda dikarenakan kelarutan kedua polimer bahan pembentuk mikrosfer juga berbeda. Medium yang digunakan adalah medium yang dapat mendispersikan mikrosfer dengan baik.

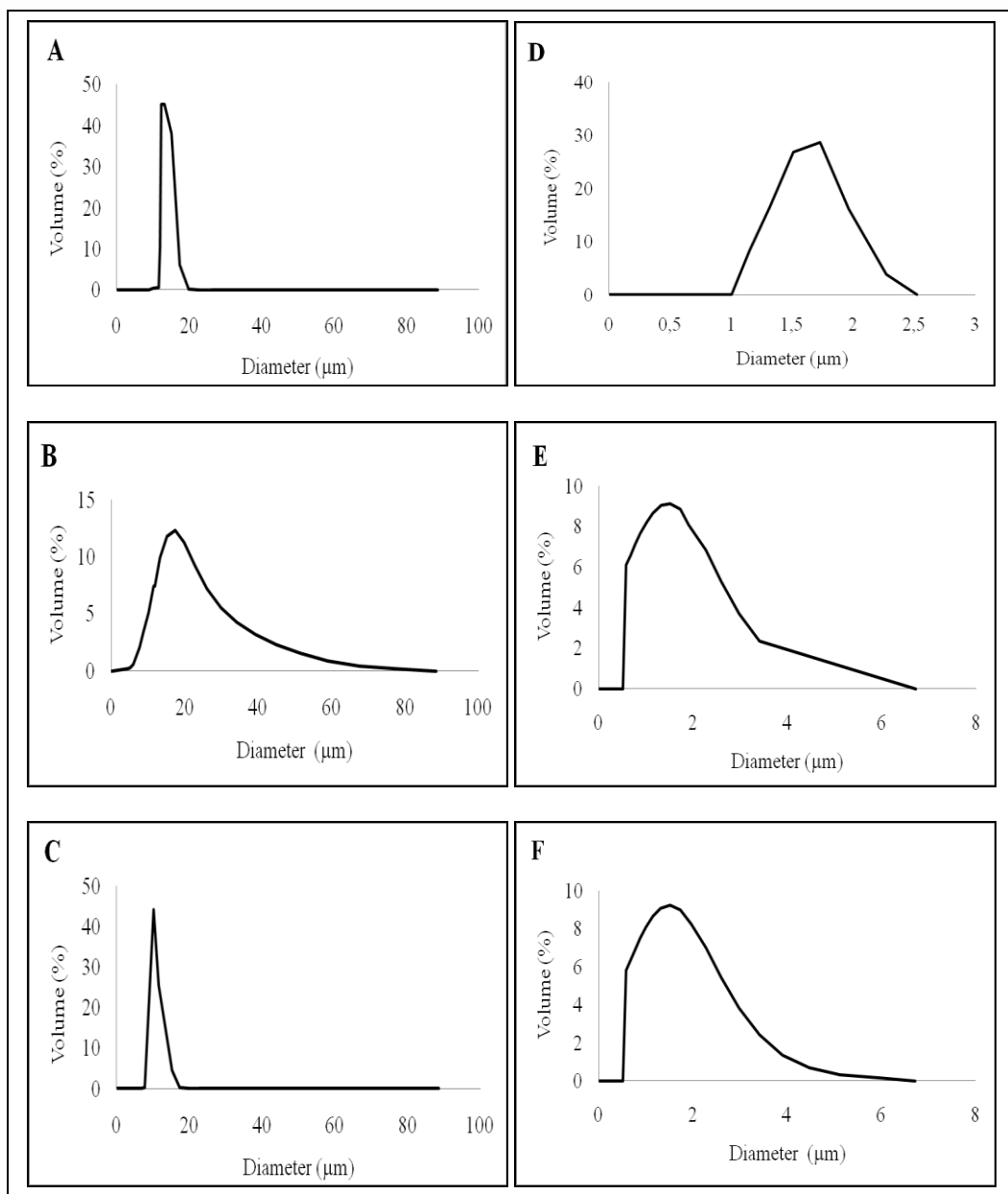
Profil distribusi ukuran partikel menunjukkan bahwa formula yang menggunakan polimer HPMC memiliki nilai diameter rata-rata lebih kecil dibandingkan dengan formula yang menggunakan PVP K30 (Gambar 4.10). Formula A, B, dan C yang menggunakan polimer PVP K30 mempunyai diameter volume rata-rata 13,13; 19,24; dan 12,61 μm secara berturut-turut. Formula D, E, dan F yang menggunakan polimer HPMC mempunyai diameter rata-rata 1,51; 1,44; dan 1,46 μm secara berturut-turut (Tabel 4.10). Hal ini mungkin terkait dengan jenis dan jumlah polimer pada masing-masing formula yang digunakan. Jenis polimer yang berbeda akan memiliki viskositas berbeda dan semakin banyak jumlah polimer yang digunakan maka viskositas di dalam formula juga akan meningkat.

Viskositas yang rendah dapat mempengaruhi proses pembuatan mikrosfer dengan metode semprot kering yaitu menghasilkan tetesan mikrosfer yang lebih kecil dibandingkan formula dengan viskositas yang lebih tinggi. Hal ini dikarenakan ketika formula dengan viskositas yang lebih rendah disemprot melalui udara panas, maka bagian yang paling banyak terdapat pada tetesan mikrosfer adalah air. Selama proses pengeringan, tetesan tersebut akan menyusut seiring dengan hilangnya air yang meninggalkan tetesan sehingga menyebabkan ukuran mikrosfer yang dihasilkan menjadi lebih kecil. Sebaliknya, formula dengan viskositas yang lebih tinggi akan mampu untuk mempertahankan bentuknya, sehingga proses kehilangan air yang terjadi tidak diikuti dengan menyusutnya tetesan mikrosfer (Surini *et al.*, 2009).

Sementara itu, pada formula yang menggunakan polimer PVP K30 dan HPMC menunjukkan fenomena yang tidak sama. Pada formula yang menggunakan PVP K30 mungkin telah terjadi peningkatan ukuran partikel. Hal ini bisa dilihat secara bentuk dan morfologi partikel pada formula PVP K30 lebih

kecil dibandingkan dengan formula yang menggunakan HPMC (Gambar 4.9). Partikel-partikel yang berukuran kecil ini lebih memungkinkan untuk terjadinya kohesi antara partikel sehingga menyebabkan terjadinya agregasi. Agregasi atau penggumpalan dapat dengan mudah terjadi pada partikel-partikel yang berukuran sangat kecil (Hinrichs *et al.*, 2006). Pada saat uji distribusi ukuran partikel dilakukan maka ukuran partikel yang terukur adalah hasil agregasi dari partikel-partikel yang berukuran kecil. Kemungkinan untuk terjadinya agregasi lebih besar pada formula yang menggunakan polimer PVP K30 dibandingkan dengan polimer HPMC. Hal ini dikarenakan PVP K30 mempunyai sifat yang lebih higroskopis sehingga dapat mempercepat terjadinya agregasi. Namun demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yaitu dengan menggunakan pengukuran zeta potensial.





Gambar 4.10. Distribusi ukuran partikel mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto. (A) formula A, (B) formula B, (C) formula C, (D) formula D, (E) formula E, dan (F) formula F.

4.7.4 Pemeriksaan kadar air mikrosfer fraksi etil asetat

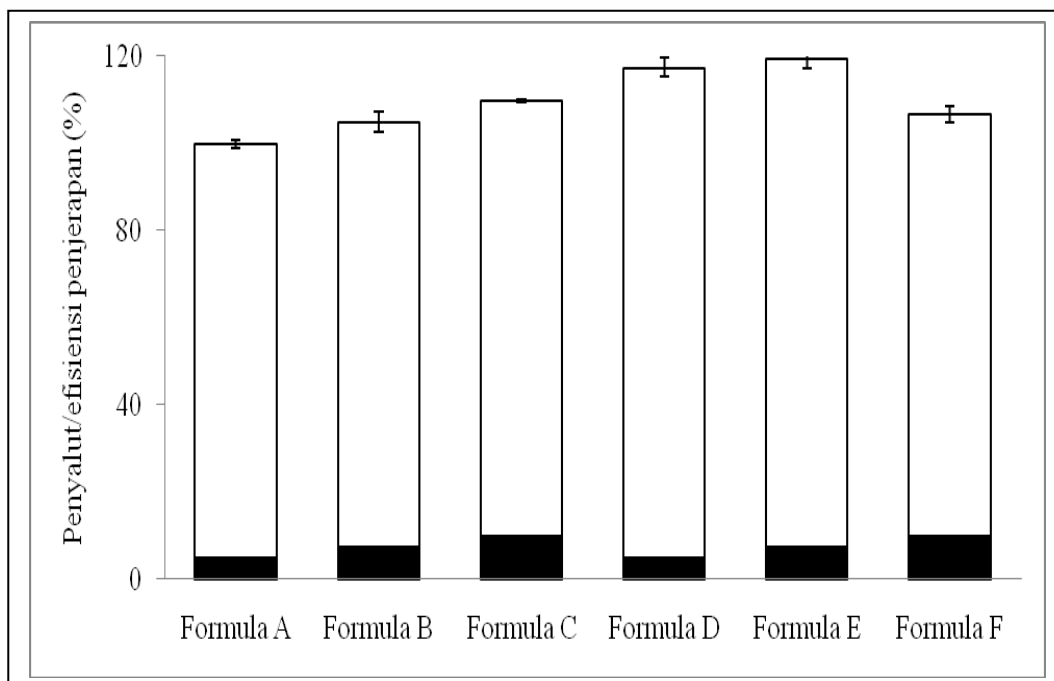
Pemeriksaan kadar air mikrosfer fraksi etil asetat dilakukan dengan alat *moisture balance*. Hasil analisa kadar air mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto yang menggunakan PVP K30 berkisar antara 12,08-13,44% sedangkan yang menggunakan HPMC berkisar antara 5,15-6,01%. Hasil analisa kadar air dapat dilihat pada ringkasan Tabel 4.8.

Dari keenam formula menunjukkan bahwa kadar air yang menggunakan polimer PVP K30 lebih besar dibandingkan formula yang menggunakan polimer HPMC. Hal ini mungkin disebabkan oleh sifat penyalut yang digunakan. Seperti diketahui bahwa PVP K30 mempunyai sifat lebih higroskopis dibanding dengan HPMC. Sehingga formula yang menggunakan PVP K30 mudah menyerap dan berinteraksi dengan air dari lingkungan sekitar yang menyebabkan air terperangkap di dalam mikrosfer. Kemungkinan lain oleh kondisi suhu pada saat proses pengeringan, kadar air menurun dengan meningkatnya suhu masuk pengeringan (Rathananand *et al.*, 2007). Hal ini sesuai dengan kondisi proses yang digunakan, suhu masuk pada formula yang menggunakan polimer HPMC lebih tinggi dibanding dengan formula yang menggunakan polimer PVP K30.

Kadar air mikrosfer yang dihasilkan dari proses semprot kering penting diketahui karena kadar air dapat mempengaruhi stabilitas suatu produk. Persyaratan kadar air suatu matrik adalah 3-5% (Voight, 1994). Dari hasil uji kadar air menunjukkan bahwa keenam formula memiliki kadar air melebihi dari 5%. Hal ini dapat dipertimbangkan untuk mendapatkan pengeringan lebih lanjut setelah melalui proses semprot kering misalnya melalui pengeringan dengan vakum.

4.7.5 Penentuan efisiensi penjerapan andrografolid dalam mikrosfer fraksi etil asetat

Evaluasi terhadap efisiensi penjerapan dilakukan untuk mengetahui kemampuan polimer dalam menyerap obat dan mengetahui efisiensi dari metode yang digunakan. Nilai efisiensi penjerapan dari formula A, B dan C yang menggunakan polimer PVP K30 masing-masing sebesar 94,83; 97,38 dan 99,82%. Nilai efisiensi penjerapan dari formula D, E dan F yang menggunakan polimer HPMC masing-masing sebesar 112,15; 111,92 dan 96,55% seperti yang terlihat pada ringkasan Tabel 4.8. Bila dibuat hubungan antara jumlah penyalut dan efisiensi penjerapan dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11. Hubungan antara jumlah penyalut dengan efisiensi penyerapan andrografolid dalam mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto. (■) persen penyalut dan (□) persen efisiensi penyerapan

Formula C yang menggunakan polimer PVP K30 memiliki nilai efisiensi penyerapan yang lebih tinggi dan berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan formula A dan B. Dari hasil uji menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi polimer PVP K30 yang digunakan maka semakin tinggi nilai efisiensi penyerapannya. Hal ini mungkin dikarenakan semakin tingginya konsentrasi polimer yang digunakan, lapisan penyalut yang terbentuk semakin kuat sehingga fraksi etil asetat lebih terlindungi yang menyebabkan tingginya efisiensi penyerapan.

Formula F yang menggunakan polimer HPMC memiliki nilai efisiensi penyerapan yang lebih rendah dan berbeda signifikan ($P < 0,05$) dibandingkan dengan formula D dan E. Dari hasil menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi polimer HPMC yang digunakan maka semakin rendah nilai efisiensi penyerapannya. Adanya penurunan nilai efisiensi dengan meningkatnya konsentrasi polimer dapat diakibatkan karena viskositas polimer yang digunakan lebih tinggi. Viskositas yang tinggi mengakibatkan proses pengeringan dengan semprot kering berjalan kurang sempurna, sehingga kemampuan retensi polimer terhadap fraksi etil asetat menjadi lebih rendah.

Namun secara keseluruhan formula yang menggunakan polimer PVP K30 dan HPMC memberikan nilai efisiensi penjerapan yang baik yakni di atas 90%. Hal ini menandakan bahwa semprot kering dapat menjadi salah satu metode yang efisien dalam pembuatan mikrosfer. Tingginya efisiensi penjerapan dengan metode semprot kering adalah akibat penguapan dari fase larutan sehingga serbuk yang tersisa segera menjerap obat dan obat yang berada di luar matriks jumlahnya menjadi kecil (Rathananad *et al*, 2007).

4.7.6 Uji kelarutan

Uji kelarutan dimaksud untuk mengetahui kelarutan andrografolid dari andrografolid standar, fraksi etil asetat dan mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto dalam tiga medium yaitu medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2. Uji kelarutan andrografolid dilakukan menggunakan *incubator shaker*, suhu dijaga pada $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, dengan kecepatan pengadukan konstan 100 rpm selama 12 jam. Hasil uji kelarutan dapat dilihat pada Gambar 4.12 dan Tabel 4.9.

Berdasarkan hasil uji kelarutan, semua formula yang menggunakan polimer PVP K30 dan HPMC memberikan tingkat kelarutan lebih tinggi pada ketiga medium dan berbeda signifikan dengan fraksi etil asetat dan andrografolid standar ($P < 0,05$). Formula yang menggunakan polimer PVP K30 (formula A, B, dan C) menunjukkan tingkat kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan formula yang menggunakan polimer HPMC (formula D, E, dan F) pada ketiga medium seperti yang terlihat pada Gambar 4.12.

Pada formula yang menggunakan PVP K30 menunjukkan bahwa kelarutan andrografolid meningkat dengan meningkatnya jumlah konsentrasi polimer. Hal ini dapat dilihat pada formula C yang mengandung polimer PVP K30 dengan rasio fraksi etil asetat-PVP K30 (1:10) memiliki kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan formula B (1:7,5) dan A (1:5). Begitu juga formula B mempunyai kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan formula A. Formula B dan C masing-masing tidak berbeda signifikan ($P > 0,05$) pada ketiga medium tetapi formula A berbeda signifikan ($P < 0,05$).

Hal ini sejalan dengan penelitian yang menggunakan polimer PVP K30 untuk meningkatkan kelarutan albendazol (Torrado *et al*, 1996). Penelitian

tersebut memberikan hasil bahwa peningkatan konsentrasi polimer PVP K30 dalam dispersi padat dapat meningkatkan kelarutan obat.

Sama halnya dengan polimer PVP K30, kelarutan andrografolid pada formula yang menggunakan polimer HPMC meningkat dengan meningkatnya jumlah konsentrasi polimer. Formula F yang mengandung fraksi etil asetat-HPMC (1:10) memiliki kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan formula E (1:7,5) dan D (1:5). Formula E memiliki kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan formula D pada medium fosfat dan klorida tetapi kelarutannya lebih rendah pada medium aquadest. Namun kelarutan andrografolid pada formula D, E, dan F masing-masing berbeda signifikan ($P < 0,05$) pada ketiga medium.

Tabel 4.9 menunjukkan hasil uji kelarutan andrografolid pada semua formula berbeda signifikan dalam ketiga medium ($P < 0,05$). Formula yang memberikan jumlah kelarutan tertinggi pada ketiga medium adalah formula C yang berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan fraksi etil asetat, andrografolid standar, dan formula-formula lainnya. Kelarutan andrografolid pada formula C dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 masing-masing memiliki nilai sebesar 1.821,95; 1.742,67; dan 1.518,98 ppm. Fraksi etil asetat dan andrografolid standar memiliki kelarutan yang rendah pada ketiga medium dan kelarutannya tidak berbeda signifikan ($P > 0,05$) antara fraksi etil asetat dan andrografolid standar. Kelarutan andrografolid pada fraksi etil asetat dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8, dan klorida pH 1,2 masing-masing sebesar 46,32; 50,03; dan 39,72 ppm. Sementara itu, kelarutan andrografolid pada andrografolid standar dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 masing-masing sebesar 63,86; 50,45; dan 56,53 ppm.

Kelarutan andrografolid pada formula C dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 masing-masing meningkat sebesar 39,34; 34,83; dan 38,25 kali bila dibandingkan dengan fraksi etil asetat tetapi bila dibandingkan dengan andrografolid standar masing-masing meningkat sebesar 28,53; 34,54; dan 26,87 kalinya.

Formula F yang menggunakan polimer HPMC memiliki kelarutan yang tinggi dibandingkan dengan formula yang menggunakan polimer HPMC lainnya

(formula D dan E). Pada medium aquadest formula F tidak berbeda signifikan dengan formula A dan D ($P>0,05$). Formula F tidak berbeda signifikan dengan formula A dalam medium fosfat dan formula E dalam medium klorida ($P>0,05$). Kelarutan andrografolid pada formula F dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 masing-masing berturut-turut sebesar 1.222,15; 1.176,12; dan 1.064,66 ppm.

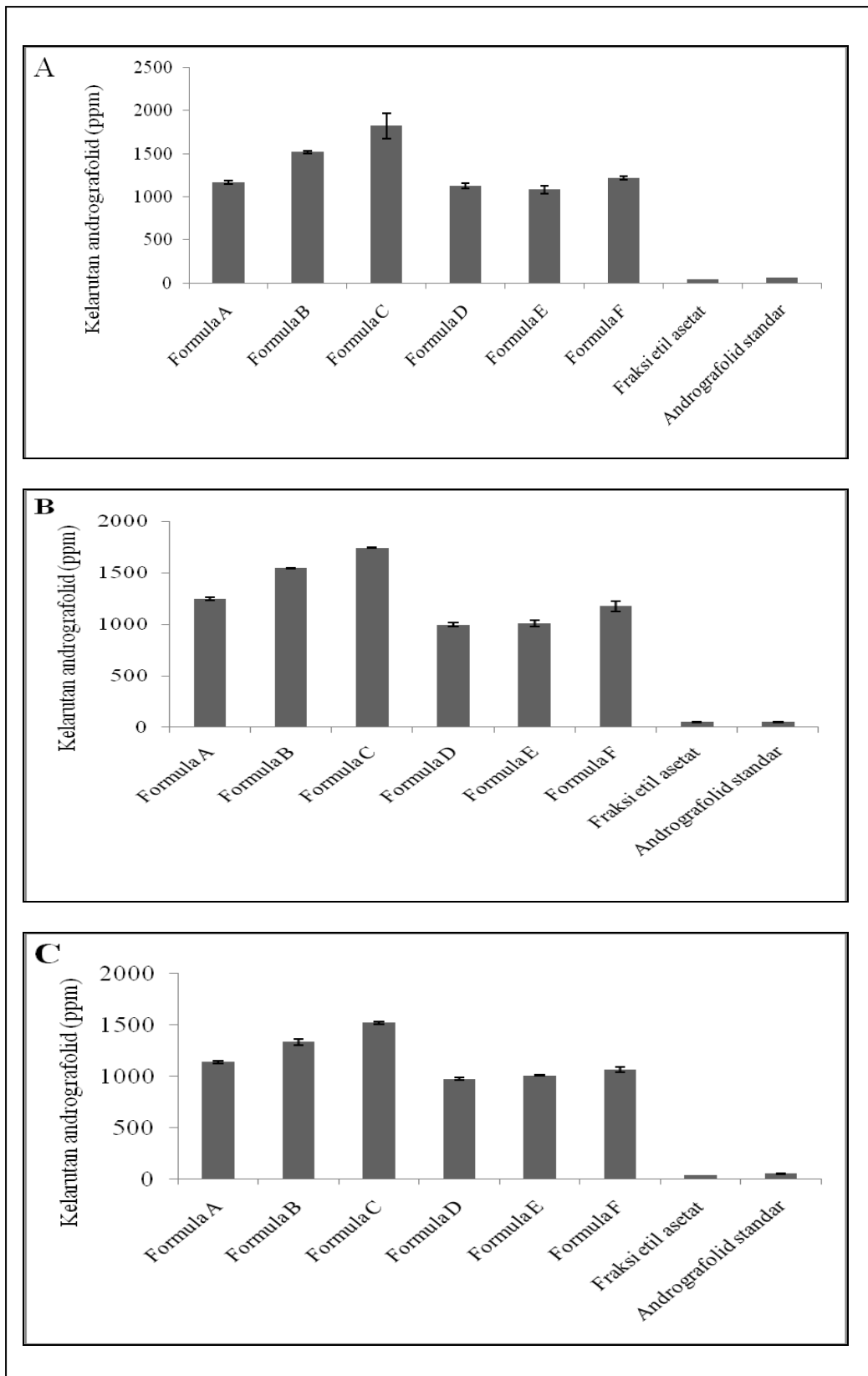
Kelarutan andrografolid pada formula F dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida masing-masing meningkat sebesar 26,39; 23,15; 26,81 kali jika dibandingkan dengan fraksi etilasetat dan meningkat 19,41; 23,31; dan 18,83 kali jika dibandingkan dengan andrografolid standar

Dari Tabel 4.9 memperlihatkan bahwa tingkat kelarutan andrografolid pada semua formula berbeda-beda bila dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan andrografolid standar pada ketiga medium yang digunakan. Hal ini dikarenakan kelarutan andrografolid pada fraksi etil asetat dan andrografolid standar juga berbeda. Fraksi etil asetat memiliki kelarutan yang lebih rendah jika dibandingkan dengan andrografolid standar. Fraksi etil asetat sebagai bahan obat merupakan bahan yang belum murni sehingga kelarutan andrografolid mungkin dipengaruhi oleh adanya senyawa-senyawa lain yang terkandung dalam fraksi etil asetat.

Secara keseluruhan semua formula menunjukkan tingkat kelarutan yang tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan andrografolid standar pada ketiga medium. Hal ini mungkin disebabkan adanya pengaruh polimer yang bersifat hidrofilik sehingga dapat memperbaiki pembasahan partikel andrografolid dengan membentuk ikatan hidrogen antara molekul andrografolid dan polimer (Leuner dan Jennifer., 2000; Ruan *et al.*, 2005). Andrografolid mampu membentuk ikatan hidrogen baik sebagai donor dan akseptor pada interaksi hidrofobik. Ikatan hidrogen yang dimiliki andrografolid terdiri dari tiga ikatan hidrogen donor (atom H pada gugus hidroksi yang terikat di C-3, C-19 dan C-14) dan lima ikatan hidrogen akseptor (atom O pada gugus hidroksi yang terikat di C-3, C-19, C-14, karbonil, dan lakton) (Levita *et al.*, 2010). Mekanisme terbentuknya ikatan hidrogen antara andrografolid dengan polimer PVP K30 mungkin terjadi antara ikatan atom C=O dan C=N dari PVP K30 dengan atom H dari gugus hidroksi (C-3, C-19 dan C-14) dari andrografolid (Shiende *et al.*, 2010;

Levita *et al.*, 2010). Sedangkan ikatan hidrogen antara andrografolid dengan HPMC mungkin terjadi antara ikatan atom OH dari HPMC dengan atom O dari gugus hidroksi (C-3, C-19, C-14, karbonil dan lakton) dari andrografolid (Shiende *et al.*, 2010; Levita *et al.*, 2010).

Kemungkinan lain yang menyebabkan meningkatnya kelarutan jenuh andrografolid pada formula yaitu adanya pengaruh dari sifat kelarutan andrografolid. Andrografolid bersifat basa konjugasi (memiliki nilai pKa 12,32) yang lebih terionisasi pada suasana asam, sehingga kelarutannya lebih baik dalam suasana asam dari pada suasana basa (Chemical Dictionary, 2009; Ritschel dan Kearns, 1999). Hal ini sesuai dengan hasil uji kelarutan andrografolid pada andrografolid standar yakni kelarutan andrografolid lebih tinggi dalam medium asam (pH 1,2) dibandingkan dengan medium basa (pH 6,8). Namun, kelarutan andrografolid dalam medium aquadest menunjukkan hasil yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan medium asam dan basa. Hal ini mungkin disebabkan andrografolid dapat terionisasi dan membentuk ikatan hidrogen antar molekul andrografolid yang lebih kuat sehingga kelarutan di dalam medium aquadest lebih tinggi dibandingkan dengan medium klorida pH 1,2 dan fosfat pH 6,8.



Gambar 4.12. Hubungan antara formula dengan kelarutan andrografolid (ppm). (A) medium aquadest, (B) medium fosfat pH 6,8 dan (C) medium klorida pH 1,2

Tabel 4.9.
Kelarutan andrografolid dalam dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 pada suhu 37°C selama 12 jam

Sampel	Medium aquadest			Medium fosfat pH 6,8			Medium klorida pH 1,2		
	Kadar andrografolid (ppm)	Tingkat kelarutan andrografolid terhadap-		Kadar andrografolid (ppm)	Tingkat kelarutan andrografolid terhadap-		Kadar andrografolid (ppm)	Tingkat kelarutan andrografolid terhadap-	
		Fraksi etil asetat	Andrografolid standar		Fraksi etil asetat	Andrografolid standar		Fraksi etil asetat	Andrografolid standar
Formula A	1.166,91	25,19x	18,27x	1.247,29	24,93x	24,72x	1.140,50	28,72x	20,18x
Formula B	1.518,27	32,78x	23,78x	1.545,44	30,89x	30,63x	1.333,14	33,57x	23,58x
Formula C	1.821,95	39,34x	28,53x	1.742,67	34,83x	34,54x	1.518,98	38,25x	26,87x
Formula D	1.129,17	24,38x	17,68x	996,72	19,92x	19,76x	975,64	24,56x	17,26x
Formula E	1.084,90	23,42x	16,99x	1.005,37	20,10x	19,93x	1.007,44	25,37x	17,82x
Formula F	1.222,15	26,39x	19,14x	1.176,12	23,51x	23,31x	1.064,66	26,81x	18,83x
Fraksi etil asetat	46,32	1,00x	0,73x	50,03	1,00x	0,99x	39,72	1,00x	0,70x
Andrografolid standar	63,86	1,38x	1,00x	50,45	1,01x	1,00x	56,53	1,42x	1,00x

4.7.8 Uji disolusi

Uji disolusi obat secara *in vitro* dimaksud untuk mengetahui laju disolusi andrografolid dari mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto menggunakan polimer PVP K30 dan HPMC. Uji disolusi obat dilakukan dalam tiga medium yaitu medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2. Uji disolusi obat dilakukan dalam medium aquadest karena ingin diketahui laju disolusi andrografolid dalam aquadest. Uji disolusi obat dilakukan dalam medium fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 karena ingin diketahui laju disolusi andrografolid pada kondisi usus dan lambung. Uji disolusi andrografolid dilakukan menggunakan alat *magnetic stirrer with heating*, suhu dijaga tetap $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, dan pengadukan kontinu pada kecepatan 100 rpm. Cuplikan diambil pada tempat yang sama pada menit ke-5, 10, 15, 30, 60, dan 120. Profil dan laju disolusi andrografolid dapat dilihat pada Gambar 4.13-4.15 dan Tabel 4.10.

Berdasarkan hasil uji disolusi semua formula yang menggunakan polimer PVP K30 dan HPMC pada ketiga medium menunjukkan laju disolusi yang lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan andrografolid standar. Formula A, B, C, D, E, fraksi etil asetat masing-masing memiliki laju disolusi berbeda signifikan pada ketiga medium ($P < 0,05$). Namun, formula F dan andrografolid standar masing-masing memiliki laju disolusi tidak berbeda signifikan pada ketiga medium ($P > 0,05$).

Pada medium aquadest, formula yang menggunakan polimer PVP K30 (formula A, B, C) dan formula yang menggunakan polimer HPMC (formula D, E dan F) menunjukkan laju disolusi yang lebih tinggi dan berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan fraksi etil asetat dan andrografolid standar. Formula A, B, C, D, E dan F masing-masing memiliki laju disolusi sebesar 14,87; 12,90; 13,31; 11,30; 11,06; dan 6,89 ppm/menit sedangkan fraksi etil asetat dan andrografolid standar masing-masing memiliki laju disolusi sebesar 2,69 dan 3,16 ppm/menit (Tabel 4.10).

Profil disolusi andrografolid secara *in vitro* ditampilkan juga dalam bentuk jumlah dan persentase kumulatif andrografolid yang terdisolusi terhadap waktu (Gambar 4.13). Profil disolusi menunjukkan bahwa formula A, B, C, D, dan E memiliki jumlah andrografolid terdisolusi lebih dari 100% pada menit kelima

yakni masing-masing sebesar 144,22; 125,64; 126,20, 108,85; dan 109,28 % tetapi formula F memiliki jumlah andrografolid terdisolusi sebesar 63,40%. Dengan demikian laju disolusi tertinggi sudah dapat dicapai dengan jumlah konsentrasi polimer terendah yakni formula A dengan rasio fraksi etil asetat-PVP K30 (1:5). Sementara formula yang menggunakan polimer HPMC laju tertinggi dapat dicapai dengan menggunakan formula D (1:5) atau formula E (1:10) yang keduanya tidak berbeda signifikan ($P>0,05$). Hal ini menandakan bahwa laju disolusi andrografolid meningkat dengan menurunnya jumlah konsentrasi polimer yang digunakan. Hasil ini sejalan dengan penelitian Alanazi (2007) yakni jumlah albendazole terdisolusi meningkat dengan menurunnya jumlah konsentrasi polimer HPMC. Hal yang sama dilihat dari hasil uji kelarutan jenuh andrografolid (Tabel 4.9), formula A dan D sudah menunjukkan kelarutan andrografolid yang tinggi bila dibanding dengan fraksi etil asetat dan andrografolid.

Laju disolusi andrografolid pada formula A, B, C, D, E, dan F dalam medium aquadest masing-masing meningkat sebesar 5,53; 4,80; 4,95; 4,20; 4,11; dan 2,56 kali jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat (2,69 ppm/menit) dan meningkat sebesar 4,71; 4,08; 4,21; 3,58; 3,50; dan 2,18 kali jika dibandingkan dengan andrografolid standar (3,16 ppm/menit) seperti yang terlihat pada Tabel 4.10.

Semua formula pada medium fosfat menunjukkan laju disolusi lebih tinggi dan berbeda signifikan ($P<0,05$) dengan fraksi etil asetat dan andrografolid standar. Formula A, B, dan C yang menggunakan polimer PVP K30 memiliki laju disolusi masing-masing sebesar 7,22; 8,10; dan 6,07 ppm/menit. Formula A tidak berbeda signifikan dengan formula B dan C ($P<0,05$) tetapi formula B berbeda signifikan dengan formula C ($P>0,05$). Sementara itu formula D, E dan F yang menggunakan polimer HPMC memiliki laju disolusi masing-masing sebesar 4,17; 3,88; dan 3,64 ppm/menit dan ketiganya tidak berbeda signifikan ($P>0,05$). Dengan demikian laju disolusi tertinggi pada medium fosfat dapat dicapai dengan menggunakan konsentrasi polimer yang rendah yakni formula A (1:5) atau B (1:10) yang menggunakan polimer PVP K30 dan formula D (1:5) yang menggunakan polimer HPMC.

Profil disolusi andrografolid dalam medium fosfat menunjukkan bahwa formula A, B, C, D, E, F, fraksi etil asetat dan andrografolid standar memiliki jumlah andrografolid terdisolusi masing-masing sebesar 70,96; 78,68; 60,35; 41,34; 37,37; 36,08; 4,34 dan 13,59 % yang dicapai pada menit kelima (Gambar 4.14). Hal ini menunjukkan bahwa semua formula yang menggunakan polimer PVP K30 dan HPMC dapat meningkatkan jumlah disolusi andrografolid dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan andrografolid standar.

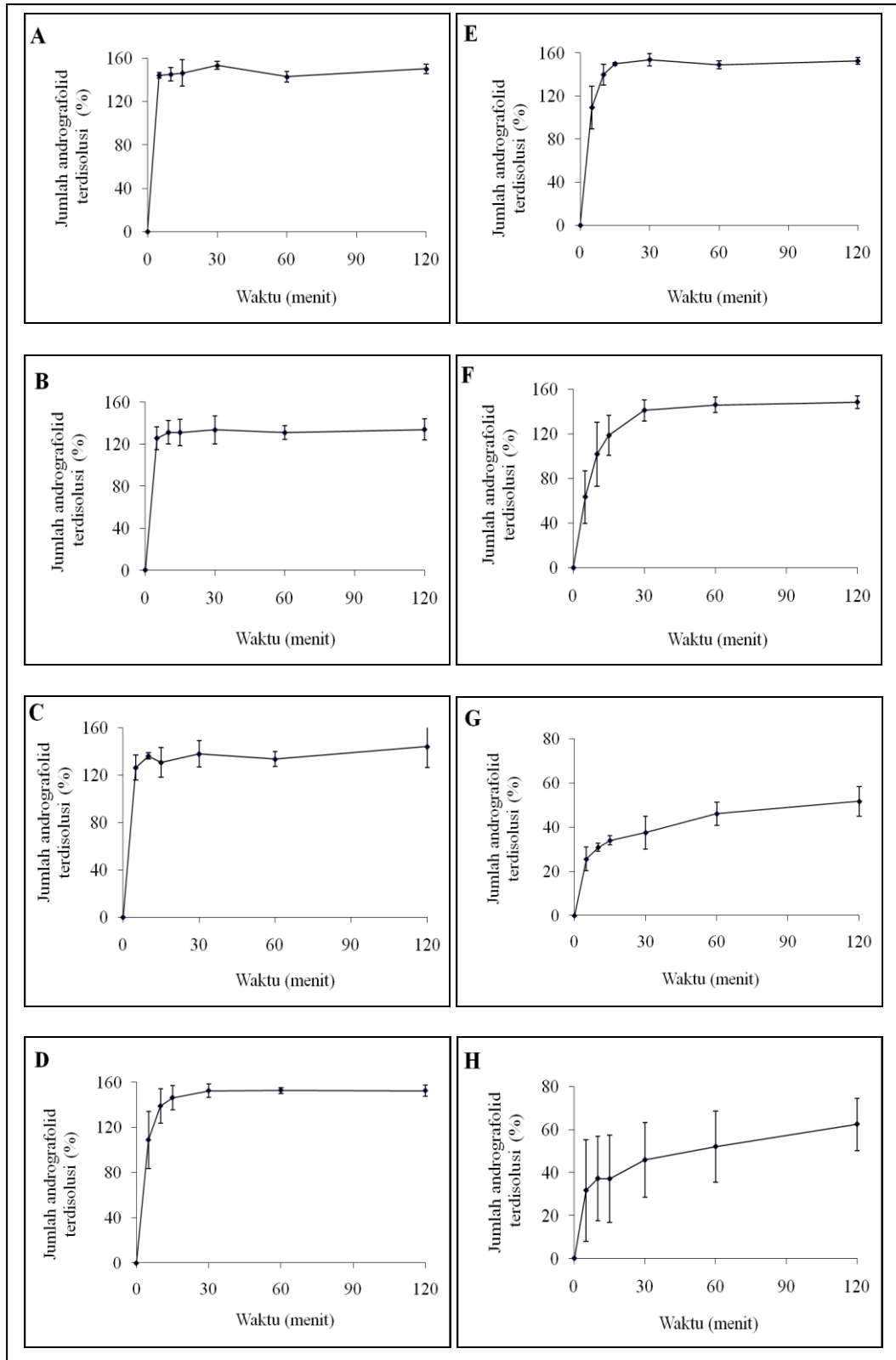
Laju disolusi formula A, B, C, D, E, dan F dalam medium fosfat masing-masing meningkat sebesar 16,04; 18,00; 13,49; 9,27; 8,62; dan 8,09 kali jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat herba sambiloto (0,45 ppm/menit) dan meningkat sebesar 5,19; 5,83; 4,37; 3,00; 2,79; dan 2,62 kali jika dibandingkan dengan andrografolid standar (1,39 ppm/menit).

Pada medium klorida formula A, B, C, D, E, F, fraksi etil asetat, dan andrografolid standar masing-masing memiliki laju disolusi sebesar 11,12; 12,01; 9,44; 6,42; 7,88; 5,28; 0,13; dan 1,07 ppm/menit. Laju disolusi formula A, B, dan C yang menggunakan polimer PVP K30 tidak berbeda signifikan ($P>0,05$) pada medium klorida. Begitu juga formula D, E, dan F yang menggunakan polimer HPMC tidak berbeda signifikan ($P>0,05$). Sementara itu fraksi etil asetat, dan andrografolid standar berbeda signifikan ($P>0,05$) dengan semua formula (formula A, B, C, D, E, dan F). Dengan demikian penambahan konsentrasi polimer PVP K30 atau HPMC pada masing-masing formula A atau D tidak menunjukkan perbedaan laju disolusi yang signifikan. Laju disolusi tertinggi sudah dapat dicapai dengan rasio fraksi etil asetat:polimer (1:5).

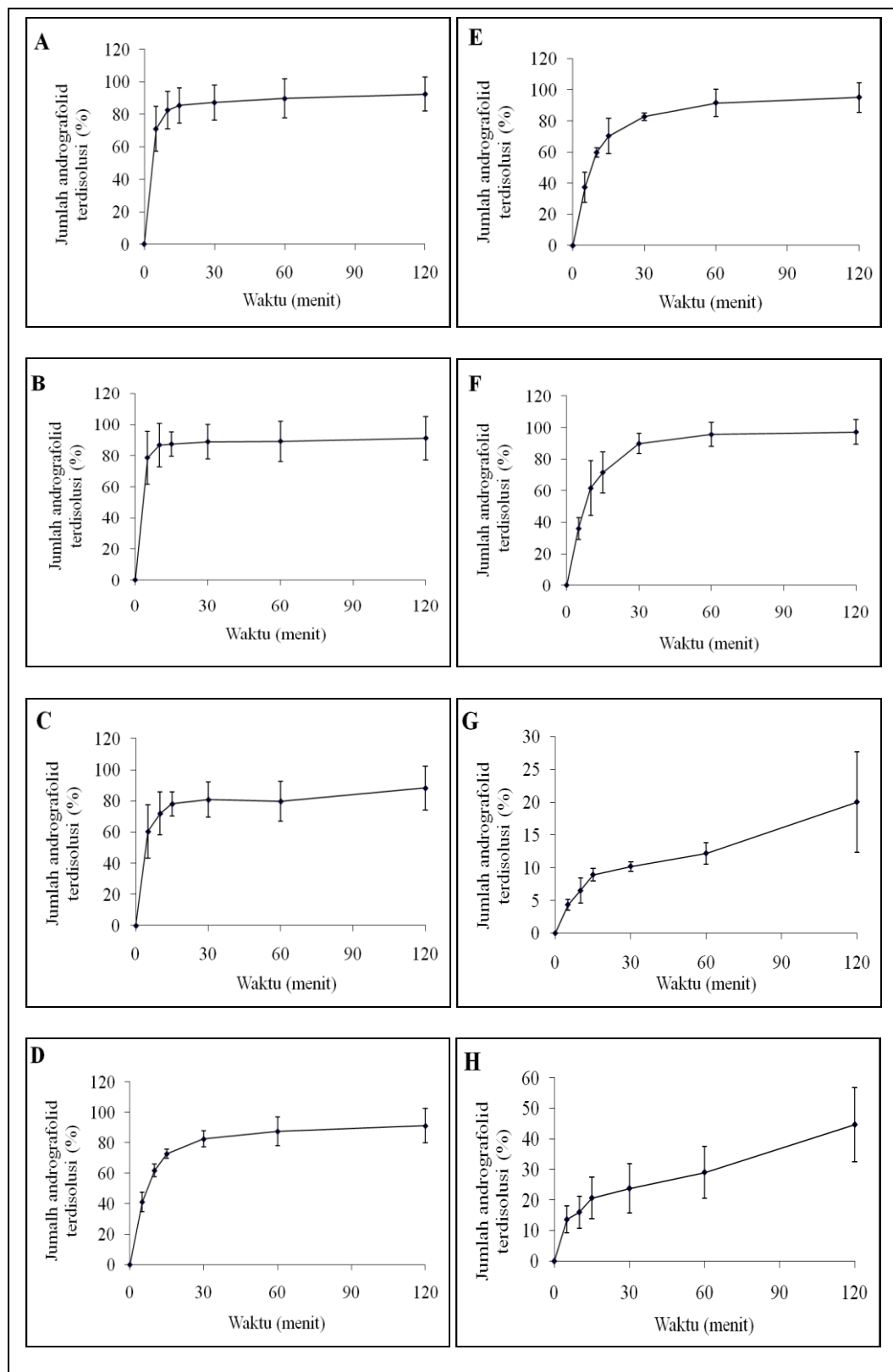
Profil disolusi andrografolid dalam medium klorida ditampilkan pada Gambar 4.15. Formula A, B, C, D, E, F, dan andrografolid standar memiliki jumlah andrografolid terdisolusi masing-masing sebesar 109,55; 120,24; 92,52; 62,58; 76,90; 49,01; dan 10,33 % dicapai pada menit kelima. Sementara itu fraksi etil asetat memiliki jumlah andrografolid terdisolusi sebesar 7,58% pada menit ketiga puluh. Hal ini menunjukkan secara jelas bahwa semua formula dapat meningkatkan kelarutan andrografolid dibanding dengan fraksi etil asetat dan andrografolid standar.

Formula A, B, C, D, E, dan F dalam medium klorida masing-masing meningkat laju disolusinya sebesar 85,54; 92,38; 72,62; 49,38; 60,62; dan 40,62 kali jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat (0,13 ppm/menit) dan meningkat sebesar 10,39; 11,22; 8,82; 6,00; 7,36; dan 4,93 kali jika dibandingkan dengan andrografolid standar (1,07 ppm/menit) seperti yang terlihat pada Tabel 4.10.

Secara keseluruhan semua formula memiliki laju disolusi andrografolid yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan andrografolid standar pada ketiga medium. Semua formula pada medium aquadest dan klorida memiliki kecepatan laju disolusi yang tinggi jika dibandingkan dengan medium fosfat. Hal ini mungkin dikarenakan laju disolusi andrografolid dipengaruhi oleh kondisi pH medium yang digunakan. Hal yang sama dengan hasil uji kelarutan jenuh andrografolid pada andrografolid standar, kelarutan andrografolid dalam medium aquadest dan klorida lebih tinggi jika dibandingkan dalam medium fosfat. Selain itu, kemungkinan lain yang dapat meningkatkan laju disolusi yaitu adanya pengaruh jenis polimer yang digunakan. PVP K30 dan HPMC merupakan polimer yang bersifat hidrofilik sehingga dapat memperbaiki pembasahan partikel andrografolid dengan membentuk ikatan hidrogen antara molekul andrografolid dengan polimer (Leuner dan Jennifer., 2000; Ruan *et al.*, 2005).



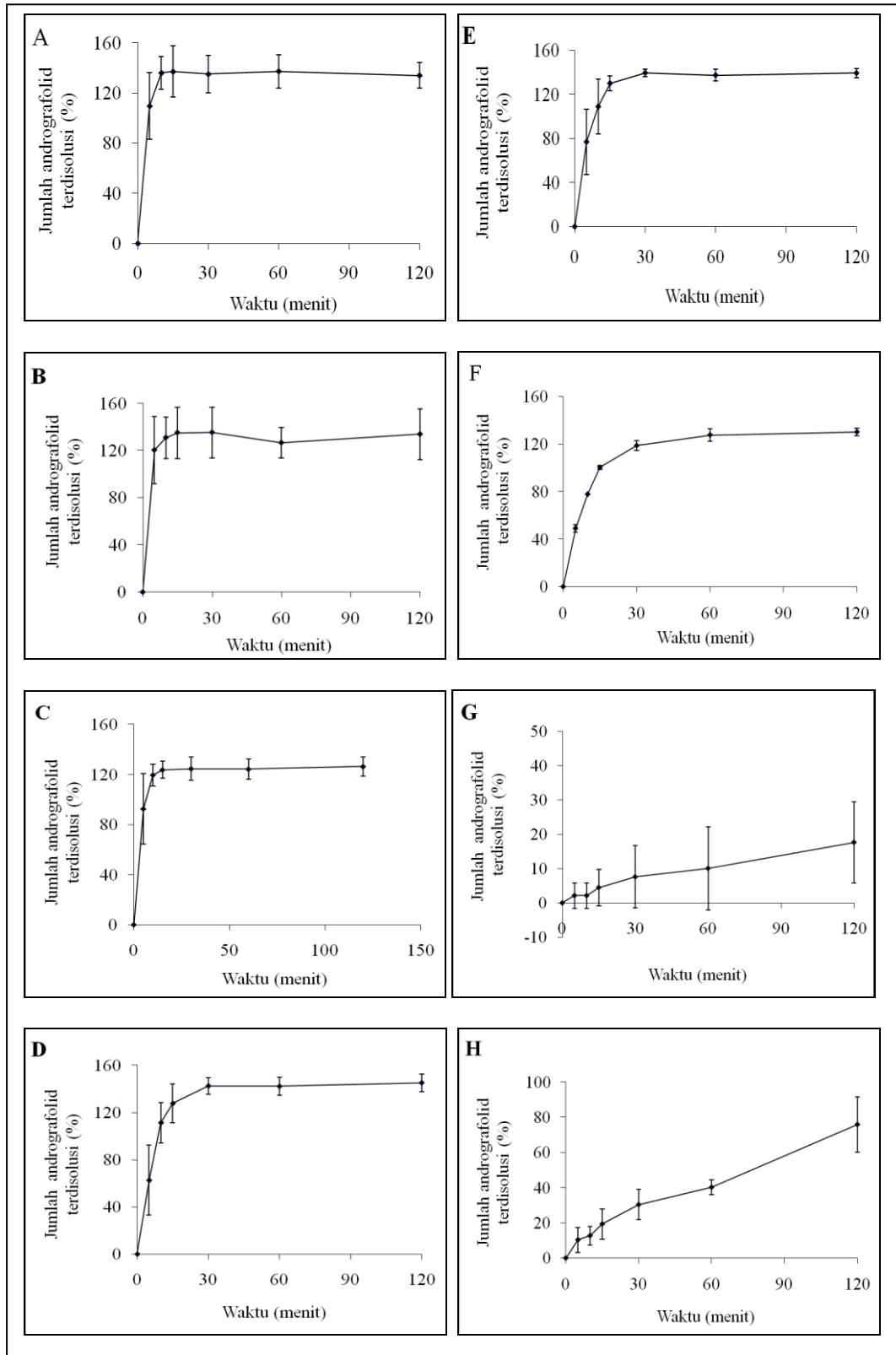
Gambar 4.13. Profil disolusi andrografolid dari mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto dalam medium aquadest pada suhu 37°C selama 2 jam. (A) formula A, (B) formula B, (C) formula C, (D) formula D, (E) formula E, (F) formula F, (G) fraksi etil asetat, dan (H) andrografolid standar



Gambar 4.14. Profil disolusi andrografolid dari mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto dalam medium fosfat pH 6,8 pada suhu 37°C selama 2 jam.

(A) formula A, (B) formula B, (C) formula C, (D) formula D, (E) formula E, (F) formula F, (G) fraksi etil asetat, dan (H) andrografolid standar.

Universitas Indonesia



Gambar 4.15. Profil disolusi andrografolid dari mikrosfer fraksi etil asetat dalam medium klorida pH 1,2 pada suhu 37°C selama 2 jam. (A) formula A, (B) formula B, (C) formula C, (D) formula D, (E) formula E, dan (F) formula F, (G) fraksi etil asetat, dan (H) andrografolid standar.

Universitas Indonesia

Tabel 4.10

Laju disolusi andrografolid dalam medium aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2 pada suhu 37°C

Sampel	Medium aquadest			Medium fosfat pH 6,8			Medium klorida pH 1,2		
	Laju disolusi (ppm/menit)	Tingkat laju disolusi terhadap		Laju disolusi (ppm/menit)	Tingkat laju disolusi terhadap		Laju disolusi (ppm/menit)	Tingkat laju disolusi terhadap	
		Fraksi etil asetat	Andrografolid standar		Fraksi etil asetat	Andrografolid standar		Fraksi etil asetat	Andrografolid standar
Formula A	14,87	5,53x	4,71x	7,22	16,04x	5,19x	11,12	85,54x	10,39x
Formula B	12,90	4,80x	4,08x	8,10	18,00x	5,83x	12,01	92,38x	11,22x
Formula C	13,31	4,95x	4,21x	6,07	13,49x	4,37x	9,44	72,62x	8,82x
Formula D	11,30	4,20x	3,58x	4,17	9,27x	3,00x	6,42	49,38x	6,00x
Formula E	11,06	4,11x	3,50x	3,88	8,62x	2,79x	7,88	60,62x	7,36x
Formula F	6,89	2,56x	2,18x	3,64	8,09x	2,62x	5,28	40,62x	4,93x
Fraksi etil asetat	2,69	1x	0,85x	0,45	1x	0,32x	0,13	1x	0,12x
Andrografolid standar	3,16	1,17x	1x	1,39	3,09x	1x	1,07	8,23x	1x

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

- 5.1.1 Fraksi herba sambiloto yang menunjukkan aktifitas tertinggi terhadap *A.salina* Leach adalah fraksi etil asetat dengan nilai LC_{50} sebesar 30,13 ppm.
- 5.1.2 Fraksi herba sambiloto yang menunjukkan aktifitas tertinggi terhadap kultur sel kanker payudara galur MCF7 dan T47D adalah fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 82,82 dan 45,27 ppm.
- 5.1.3 Mikroenkapsulasi fraksi etil asetat herba sambiloto dengan polimer PVP K30 dan HPMC dapat meningkatkan kelarutan andrografolid dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan andrografolid standar.
- 5.1.4 Mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto yang terbuat dari polimer PVP K30 dan HPMC dapat meningkatkan laju disolusi dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan andrografolid standar

5.2 SARAN

Saran yang dapat diberikan berdasarkan penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai :

- 5.2.1 Senyawa yang bertanggung jawab dalam fraksi etil asetat herba sambiloto yang memberikan aktifitas terhadap *A.salina* Leach dan kultur sel kanker payudara galur MCF7 dan T47D.
- 5.2.2 Pemanfaatan polimer lain dan dengan menggunakan metode lain untuk menguji tingkat kelarutan andrografolid.
- 5.2.3 Pengujian mikrosfer fraksi aktif herba sambiloto secara *in vitro* dan *in vivo* dengan menggunakan sel kanker payudara dan hewan model kanker.

DAFTAR REFERENSI

- Abdou, H.M. (1989). *Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence*. USA: Mack Publishing Company. 215-220
- Ahire, B. R., *et al.* (2007). Solubility Enhancement of Poorly Water Soluble Drug by Solid Dispersion Techniques. *International Journal of PharmTech Research*, 2, 3, 2007-2015
- Alanazi, F.K., *et al.* (2007). Improvement of Albendazole Disolution by Preparing Microparticle Using Spray-drying Technique. *Scientia Pharmaceutica (Sci. Pharm.)*, 75, 63-79
- Alley, M.C, *et al.* (1988). Feasibility of Drug Screening with Panel of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium assay. *Cancer Reseach*, 48, 589-601
- Anil, J.S. (2007). *Solubilization of Poorly Soluble Drugs: A Review*. Des 06, 2010 Pk. 06.00 WIB. <http://www.pharmainfo.net/reviews/solubilization-poorly-soluble-drugs-review>.
- Arifin, H., *et al.* (2006). Sandarisasi Ekstrak Etanol Daun Eugenia Cumini Merr. *J. Sains Tek Far*, 11, 2.
- American Type Culture Collection (ATCC^a). (n.d). MCF7. Nop 11, 2009. Pk.05.46 WIB. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-22&Template=cellBiology>.
- American Type Culture Collection (ATCC^b). (n.d). T47D. Nop 11, 2009. Pk.05.46 WIB <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-133&Template=cellBiology>.
- Amini, A. (2009). *Mikroenkapsulasi Obat Peptida-Protein Menggunakan Metode Semprot Kering dengan Inulin sebagai Penstabil*. Skripsi Sarjana Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Andrographolide. (2009). Chemical Dictionary Online. Juni 28, 2010. Pk.09.00 WIB. http://www.chemicaldictionary.org/dic/A/Andrographolide_1270.html
- Bakan, J.A. (1986). Microencapsulation dalam Lachman, L., *et al.* *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. (3rd.ed). Philadelphia: Lea & Febiger. 861-889.

- Badan Pengawasan Obat dan Makanan. (2004). *Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia* (Vol.1). Jakarta: Badan Pengawasan Obat dan Makanan.5-7.
- Chase, M.W. dan Reveal, J.L. (2009). A Phylogenetic Classification of The Land Plants to Company APG III. *Botanical Journal of The Linnean Society*, 116, 122-127.
- Cheung, H.Y., *et al.* (2005). Andrographolide Isolated from *Andrographis paniculata* Induces Cell Cycle Arrest and Mitochondrial-Mediated Apoptosis in Human Leukemic HL-60 Cells. *Planta Med*, 71, 12, 1106-11.
- Colegate, S.M. dan Molyneux, R.J. (2008). *Bioactive Natural Products Detection, Isolation, and Structural Determination*. (2nd.ed). Crc Press Taylor & Francis Group. 18-20.
- Daodee, S., *et al.* (2006). The Consideration of Quality Control Criteria for *Andrographis paniculata* Product. *KKU Res J*. 11, 4.
- Deasy, P.B. (1984). *Microencapsulation and Related Drug Process*. New York: Marcel Dekker Inc. 21-37.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Materia Medika Indonesia Jilid III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 20-27.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia 1,1065, 1066
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000^a). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 13-39.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000^b). *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (I) Jilid 1*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 29-30.
- Doyle, A. dan Griffiths, J.B. (2000). *Cell and Tissue Culture for Medicinal Research*. London: Jhon Wiley & Sons, LTD. 406-409.
- Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. (2009). *Buku Petunjuk Praktikum Farmasi Fisik*. Depok: Universitas Indonesia.

- Fong, H. H. S., *et al.* (1980). *Phytochemical Screening*. Departement of Pharmacognocny and Pharmacology College of Pharmacy. Chicago: University of Minoly at the Medical Center.
- Florence, A.T dan Attwood D. (2006). *Physicochemical Principle of Pharmacy*. (4th.ed). London: Pharmaceutical Press.. 139-176.
- Fransworth, R. N. (1966). Review Article Biological and Pharmaceutical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science*, 55, 3, 225-276.
- Garrec, D. L. *et al.* (2004). Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(d,l-lactide) As a New Polymeric Solubilizer for Hydrophobic Anticancer Drugs: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Journal of Controlled Release*, 99, 83-101.
- Ghosh, S.K. (2006). *Functional Coatings by Polymer Microencapsulation*. Jerman: Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 12-25.
- Hartati, M.S. (2003). Sitotoksik Rimpang Temu Mangga (*Curcuma mangga* Val. & V.Zijp.) dan Kunir Putih (*Curcuma Zedoaria* I.) terhadap Beberapa Sel Kanker Manusia (*in vitro*) dengan metode SRB. *Berkala Ilmu Kedokteran*, 35, 4, 197-201.
- Harbone, J.B. (1987). *Metode Fitokimia. Penuntun Modern Menganalisis Tumbuhan*. (Terbitan kedua). (Padmawinata, K. dan Soediro, I. penerjemah). Bandung: Institut Teknologi Bandung. 47-61.
- Hinrichs, W. L. J., *et al.* (2006). The Choice of a Suitable Oligosaccharide to Prevent Aggregation of PEGylated Nanoparticles during Freeze Thawing and Freeze Drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 311, 237-244.
- Horiba, Ltd. (2007). Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950. Instruction Manual. Japan: Horiba,Ltd.
- Jada, S.R., *et al.* (2007). Semi Synthesis and In Vitro Anticancer Activities of Andrographolide Analogues. *Phytochemistry*, 68, 6, 904-12.
- Jarukamjorn, K. dan Nobuo, N. (2008). Pharmacological Aspects of *Andrographis Paniculata* on Health and Its Major Diterpenoid Constituen Andrographolide. *Journal of Health Science*, 54, 4, 370-381.
- Kissel, T., *et al.* (2006). Microencapsulation Techniques for Parenteral Depot Systems and Their Application in the Pharmaceutical Industry dalam Benita, S. *Microencapsulation Methods and Industrial Applications*. (2nd.ed). New York: Taylor & Francis Group. 113-166.

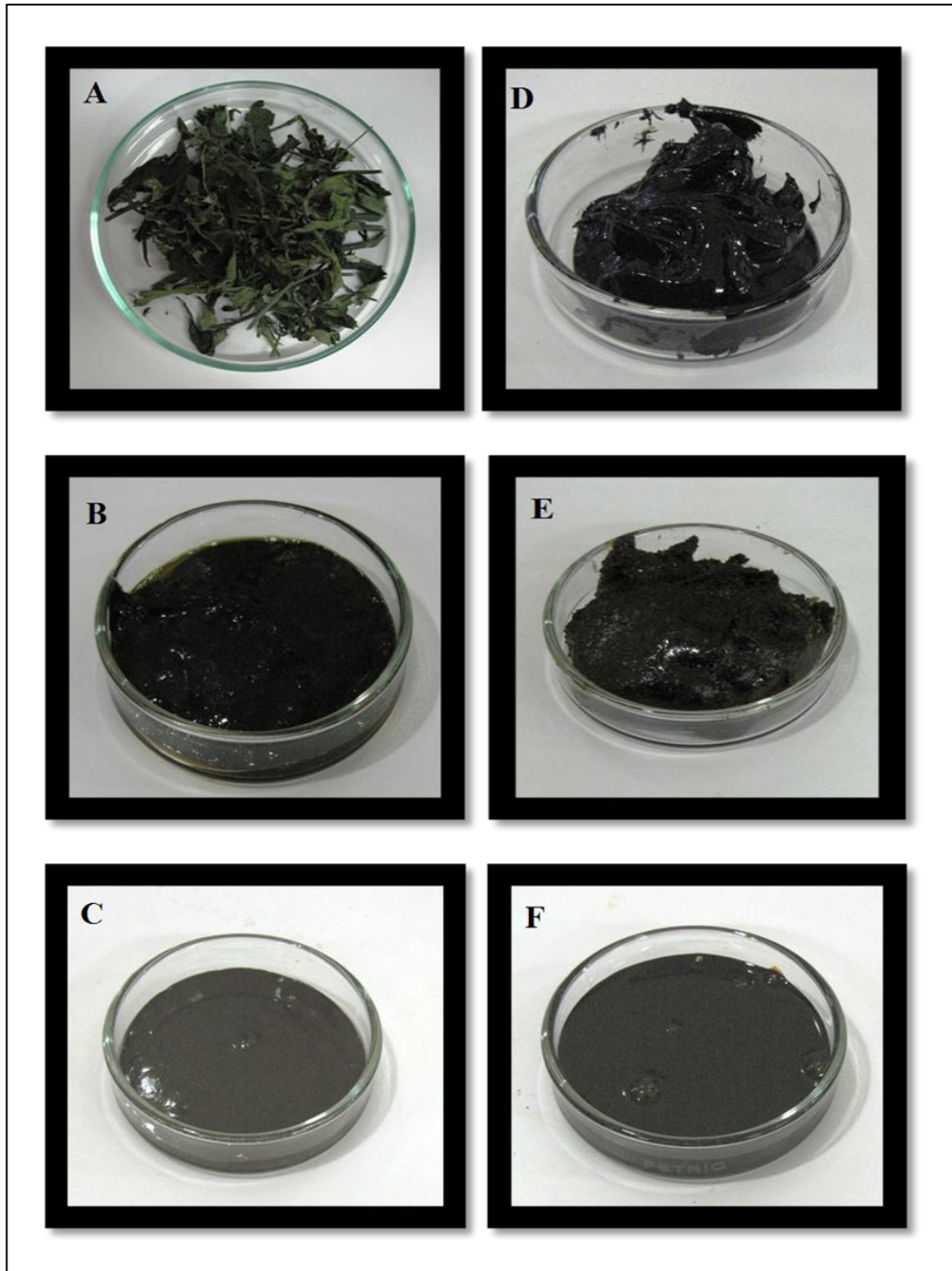
- Kumar, K.A., *et al.* (2004). Anticancer and Immunostimulatory Compounds from *Andrographis paniculata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 291–295.
- Kumaran, K.S., *et al.* (2003). An HPLC Method for The Estimation of Andrographolid In Rabbit Serum. *Indian Journal of Pharmacology*, 35, 109-112.
- Leuner, C. dan Jennifer, D. (2000). Review Article. Improving Drug Solubility for Oral Delivery Using Solid Dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 47-60.
- Levita, L., *et al.* (2010). Andrografolide: A review of its Anti-inflammatory Activity Via Inhibition of NF-kappaB Activation from Computation Chemistry Aspects. *International Journal of Pharmacology*, 6, 5, 569-576
- Lomlin, L., *et al.* (2003). Heat Accelerated Degradation of Solid-State Andrographolide, *Chem. Pharm. Bull*, 51, 1, 24-26.
- Liu Y., *et al.* (1997). Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69, 2, 581-594.
- Loo, D.T., dan Rillema, J.R. (1998). Measurmen of Cell Death dalam Mather, J.P. dan Barnes, D. (ed)). *Animal Cell Culture Methods*. (Volume.57). London: Academic press. 251-253, 261-262.
- Martin, A., Swarbick, J., dan Camarata, A. (1993). *Farmasi Fisik, Dasar-dasar Kimia Fisik dalam Ilmu Farmasetika* (ed. ke-3. Jilid I) (Djajadisastra, J., penerjemah) Jakarta: Universitas Indonesia Press. 481, 558-564.
- McLaughlin J.M. (1991). Crown Gall Tumours on Potao Disc and Brine Shrimp Lethality Two simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractionation dalam Hostettman K (ed) *Methods in Plant Biochemistry*. Volume 6. London: Academic press. 1-10.
- Meyer, B. N., *et al.* (1982). Brine shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34.
- Mishra, K.S., *et al.* (2007). *Andrographis paniculata* (Kalmegh): A. Review. *Pharmacognosy Reviews*, 1, 2, 283-298.
- Neau, S.H. (2008). Solubility Theories dalam *Water-Insoluble Drug Formulation*. (Liu, R. ed). (2nd.ed). Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group. 5

- Obara, S. dan Kokuba, H. (2008). Application of HPMC and HPMCAS to Aqueous Film Coating of Pharmaceutical Dosages Form dalam McGinity, J.W dan Felton, L.A (ed). *Aqueous Polymeric Coating for Pharmaceutical Dosages Forms* (76). USA: Informa Healthcare USA, Inc. 281-285
- Ping, L.W. (2009). *Preparation and Characterization of Spray Dried Inclusion Complex between Andrographolide and Cyclodextrin*. City University of Hongkong.
- Prapanza, I. dan Marianto, L.A. (2003). *Khasiat dan Manfaat Sambiloto*. Argomedia Pusaka. Jakarta. 1-10
- Qiang, Z.Z. (2007). *Reaction and Computation Studies of Andrographolide Analogues with Glutathion and Biological Nucleophilic*. City University of Hongkong.
- Quality Controle Dept Natural Remedies Pvt.Ltd. (n.d). *Master Document Andrographis paniculata*. Bangalore: Quality Controle Dept Natural Remedies Pvt.Ltd.
<http://www.allianceingredients.com/pdfdocs/ANDROGRAPHIS.PDF>.
- Radjaram, A., Hafid, A.F, dan Santosa, M.H. (2000). *Dispersi Solid Andrografolid untuk Rancangan Dasar Formula Ekstrak Kering Terstandar dari Herba Andrographis paniculata*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Pusat Penelitian Obat Tradisional Universitas Airlangga. Surabaya.
- Rathananand, M., et al. (2007). Preparation of Mucoadhesive Microspheres for Nasal Delivery by Spray Drying. *Indian J Pharm Sci.* 69, 651-657
- Rowe, R.C., Shesky, P.L, dan Owen, S.C. (ed). (2006). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. (5th.ed). London: The Pharmaceutical Press and The American Pharmacists Association. 611-616.
- Ruan, L.P., et al. (2005). Improving the Solubility of Ampelopsin by Solid Dispersions and Inclusion Complex. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38, 457–464
- Ritschel, W.A. dan Kearns, G.L. (1999). *Handbook of Basic Pharmacokinetics-Including Clinical Application*. American Pharmaceutical association. 47-52
- Setyawan, D., et al. (2000). *Penerapan Teknologi Spray Drying dalam Pembuatan Ekstrak Kering Herba Sambiloto (Androgrphis paniculata) Terstandar*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Pusat Penelitian Obat Tradisional Universitas Airlangga. Surabaya.

- Senatore, D. (2008). *Microencapsulation for Controlled Release of Liquid Crosslinker: Towards Low Temperature Curing Powder Coatings*. Thesis. Geboren te Cava de' Tirreni, Italië.
- Shargel, L., et al. (2004). *Applied Biopharmaceutic and Pharmacokinetic*. (5ty.ed). McGraww Hill's Access Pharmacy. 414-415.
- Shu, B., et al. (2006). Study on Microencapsulation of Lycopene by Spray Dryer. *Journal of Food Engineering*, 76, 664-669.
- Shinde, S.S., et al. (2010). Research Article. An Approach for Solubility Enhancement: Solid Dispersion. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1, 299-308
- Soeratri, W. (1993). *Farmasetika 2 Biofarmasi*. Surabaya: Airlangga University Press.154-176.
- Siepmann, J dan Peppas, N.A. (2001). Modeling of Drug Release from Delivery Systems Based on Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*. 48 . 139–157
- Sukardiman., et al. (2005). Induksi Apoptosis Andrographolide dari Sambiloto (*Andrographis paniculata*, Ness) Terhadap Kultur Sel Kanker. *Media Kedokteran Hewan*, 21, 3.
- Sumaryono, W. dan Wibowo, A. R. (2010). Uji Aktifitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun *Aglaia elliptica* Blume terhadap Galur Sel Kanker Servik (Hela). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 88, 1, 19-23
- Surini S., Anggriani V., dan Anwar E. (2009). Study of Mucoadhesive Michrospheres Based on praelatinized Cassava Starch Succinate a New Carrier for Drug Delivery. *J. Med, Sci*, 6, 249-256.
- Suffness M dan Pezzuto. (1991). Assay Related to Camcer Drug Discovery dalam Hosttetman K (ed) *Methods in Plant Biochemistry* Volume 6. London: Academic press. 71-124
- Swarbrick, J. (2007). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. (3rd. ed). (Volume.1). USA: Informa Healthcare USA, Inc. 2328-2338.
- Syarifah, S.M.M., et al. (2007). *Proteomic Assesment of Bioactive Constituent from Selected Malaysian Plant Species with Anti-Breast cancer and Anti-Ovarian Cancer Potentials*. Selangor Darul Ehsan: Forest Reseach Institute Malaysian (FRIM).
- Tewa-tagne, P., Brianc S., dan Fessi H., (2007). Preparation of Redispersible Dry Nanocapsules by Means of Spray-drying: Development and

- Characterization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 124–135.
- Thies, C. (1996). A Survey of Microencapsulation Processes dalam Benita, S. (ed). *Microencapsulation Methods and Industrial Applications*. New York: Marcel Dekker, Inc. 1-19.
- Tjitrosoepomo, G. (1991). *Taksonomi Tumbuhan (Spermathopyta)*. Yogyakarta: Gadjah Mada Univeristy Press. 371-472.
- Torrado S., *et al.* (1996). Preparation Dissolution and Characteritation of Albendazole Solid Dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 140, 247-250.
- Volker, B. (2005). *Polyvinylpyrrolidone Excipients for pharmaceuticals. Povidone, Crospovidone and Copovidone*. Berlin Heidelberg German: Springer-Verlag. 5-124.
- Voight, R. (1994). *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. (ed. ke-5). (Noerono, S., penerjemah). Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. 169-171.
- Wanawongthai, C., *et al.* (2009). Pharmaceutical Nanotechnology. Nanoparticle Formation from Probuocol/PVP/Sodium Alkyl Sulfate Co-ground Mixture. *International Journal of Pharmaceutic*, xxx, xxx–xxx
- Wijayakusuma, H. (2008). *Atasi Kanker dengan Tanaman Obat*. Puspa Swara Anggota Ikapi. Jakarta. 55-56.
- World Health Organization (WHO). (2002). *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants* (Volume 2). Geneva. 12-24.
- World Health Organization (WHO^a). (2008). *World Health Statistics 2008*. Geneva. 21-23.
- World Health Organization (WHO^b). (2008). *Global Burden of Disease 2004 Update*. Geneva. 8-10, 29-30.

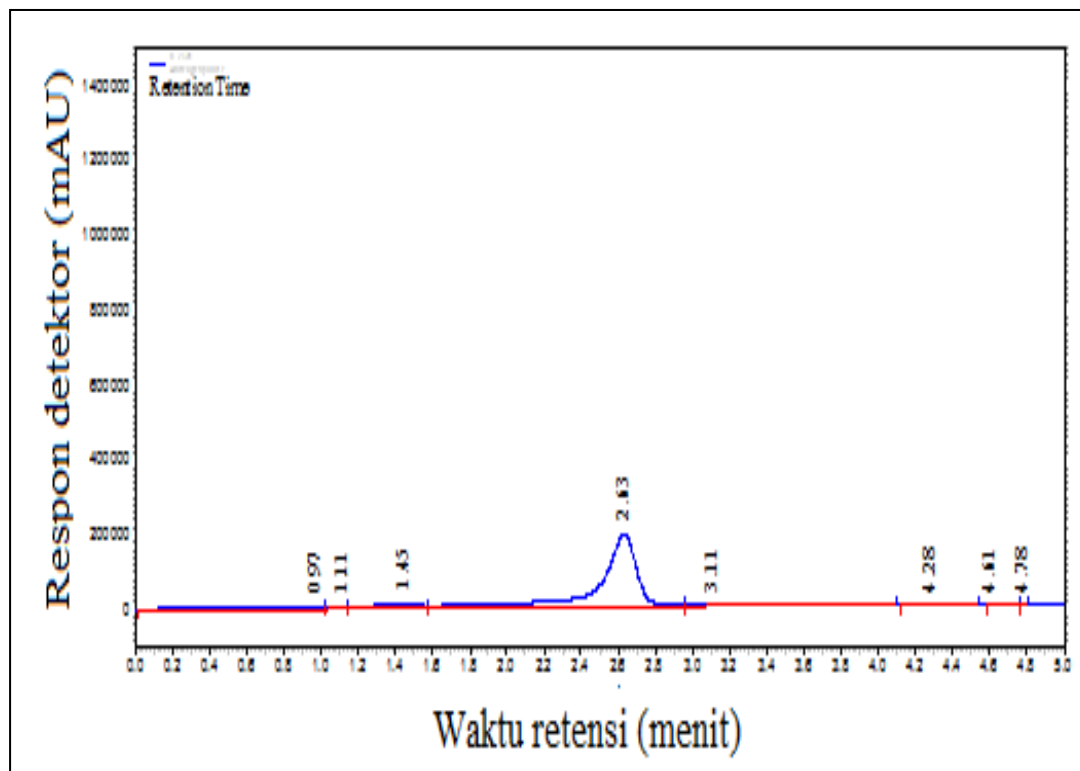
Lampiran 1.
Simplisia, ekstrak dan fraksi herba sambiloto



Gambar (A) simplisia herba sambiloto, (B) ekstrak etanol, (C) fraksi etanol, (D) fraksi *n*-heksan, (E) fraksi etil asetat, dan (F) fraksi air

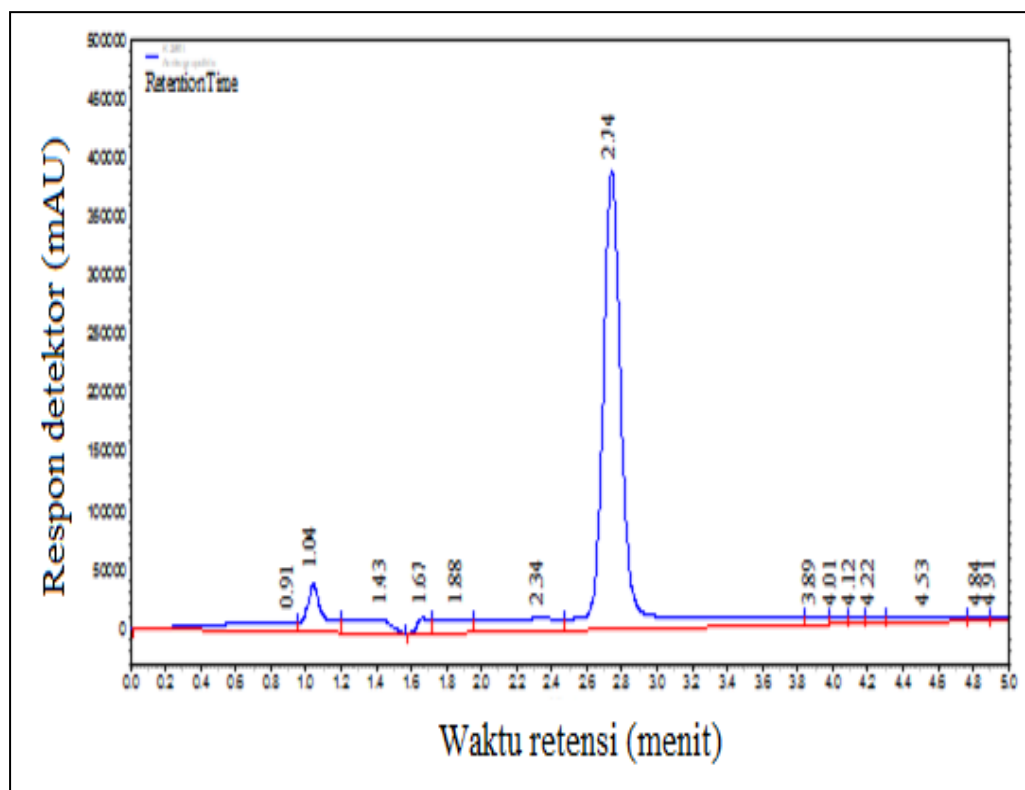
Lampiran 2.

Kromatogram andrografolid konsentrasi 50 ppm dalam medium metanol



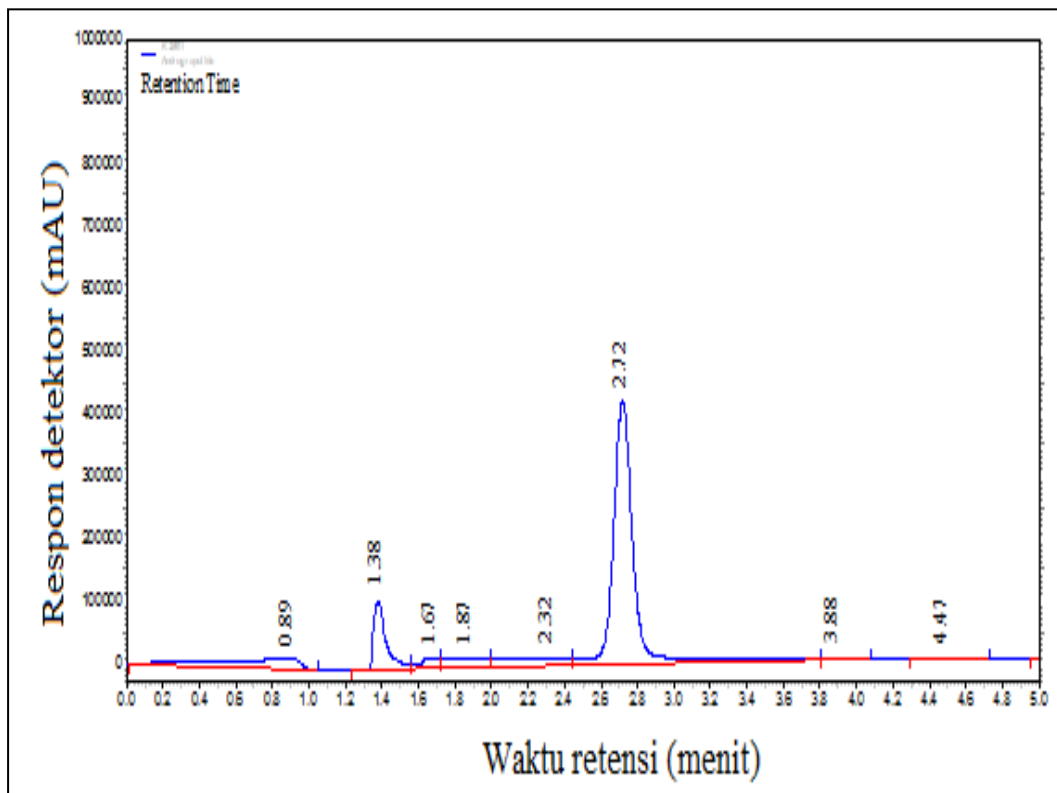
Lampiran 3

Kromatogram andrografolid konsentrasi 50 ppm dalam medium aquadest



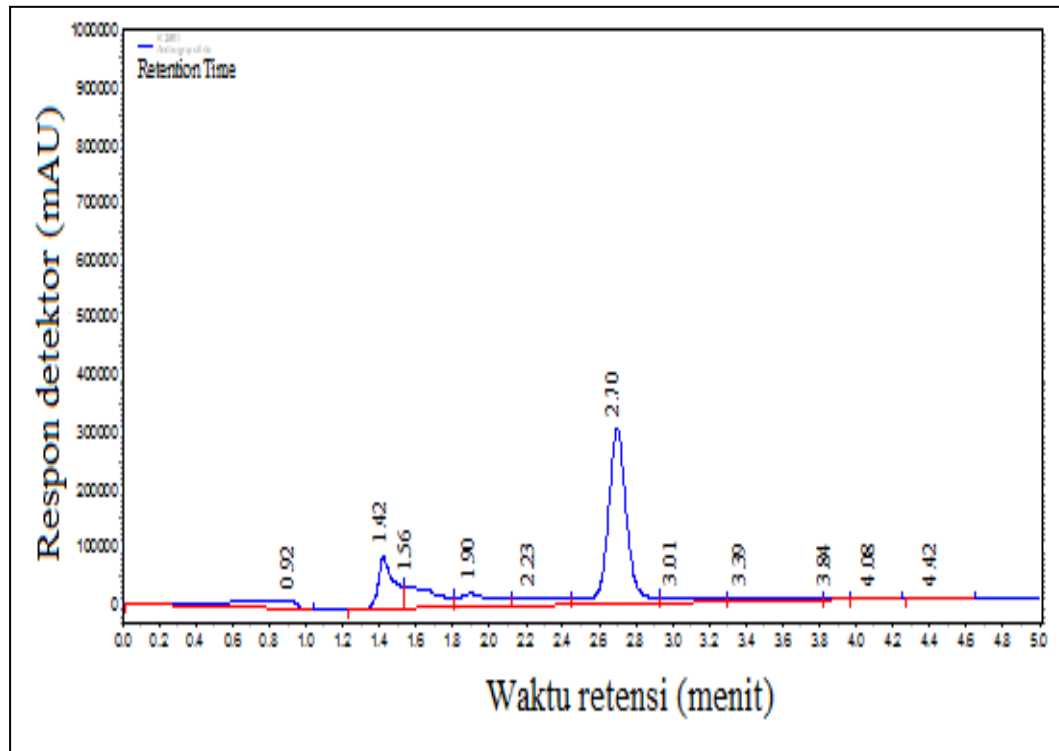
Lampiran 4

Kromatogram andrografolid konsentrasi 50 ppm dalam medium fosfat pH 6,8



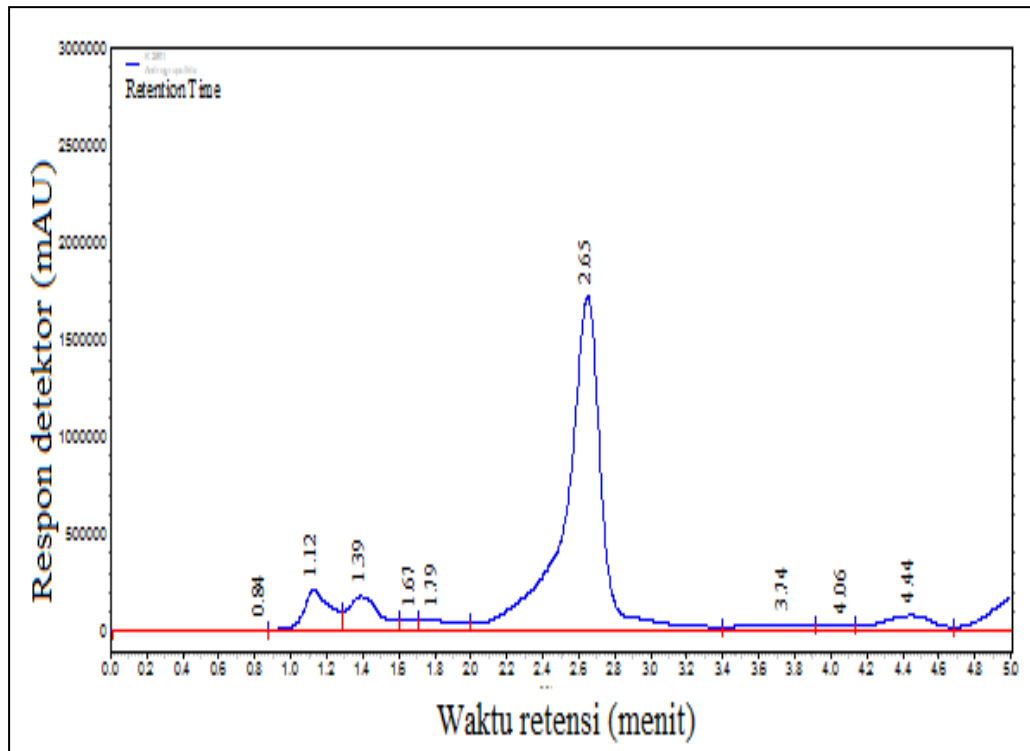
Lampiran 5

Kromatogram andrografolid konsentrasi 50 ppm dalam medium klorida pH 1,2



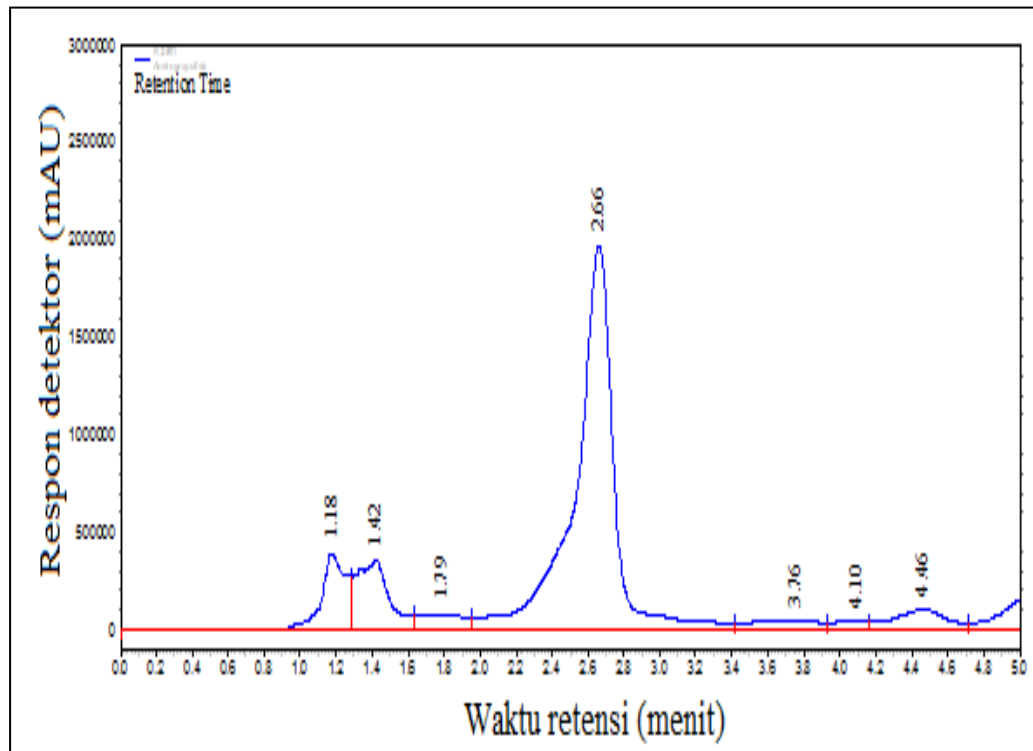
Lampiran 6

Kromatogram andrografolid dalam ekstrak etanol herba sambiloto

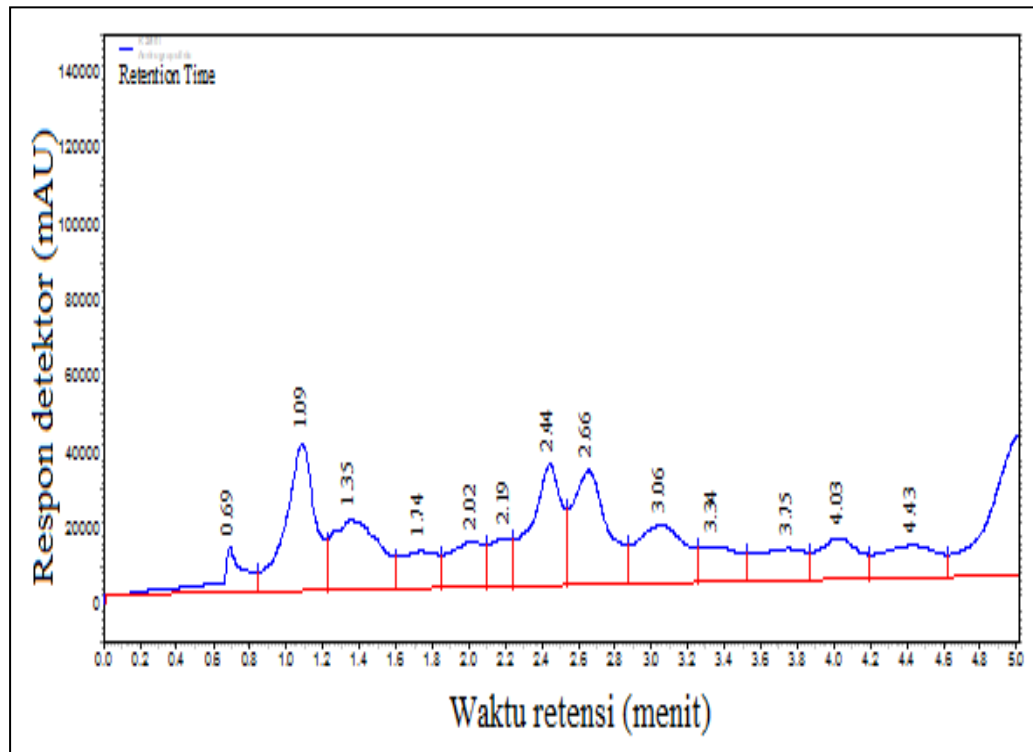


Lampiran 7

Kromatogram andrografolid dalam fraksi etanol herba sambiloto

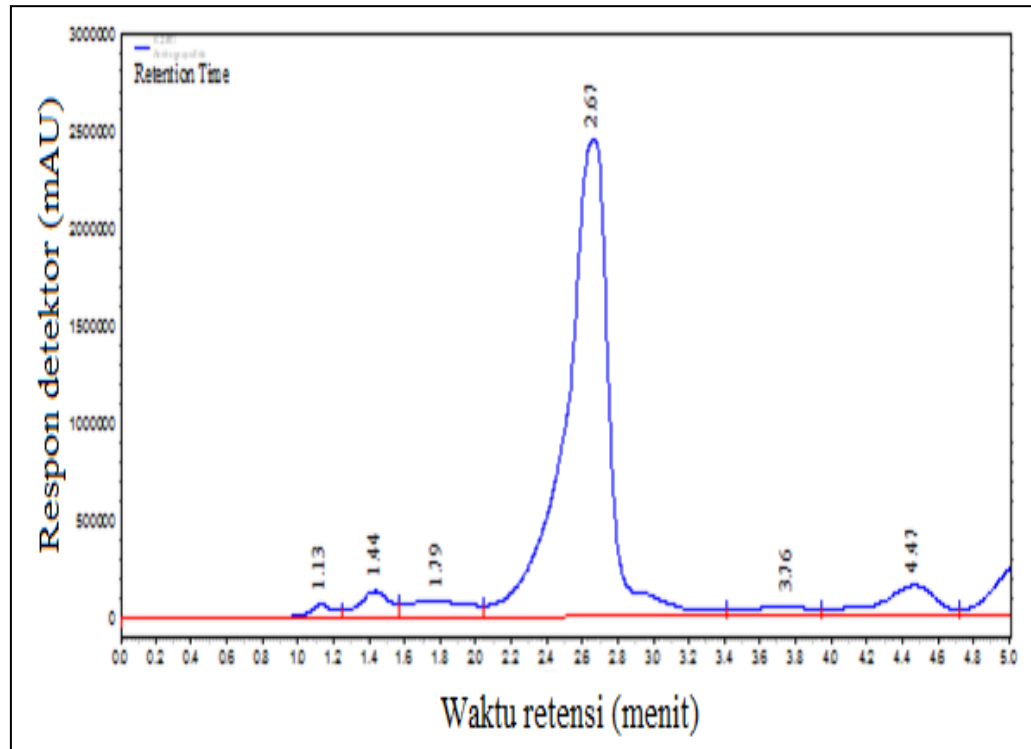


Lampiran 8

Kromatogram andrografolid dalam fraksi *n*-heksan herba sambiloto

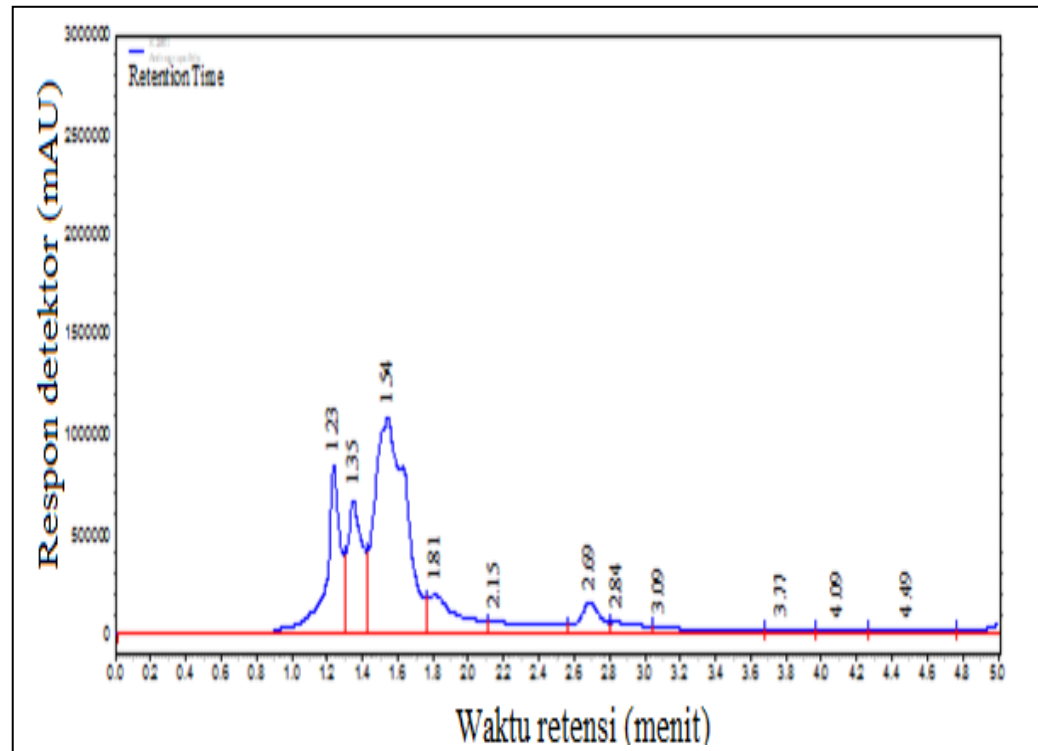
Lampiran 9

Kromatogram andrografolid dalam fraksi etil asetat herba sambiloto

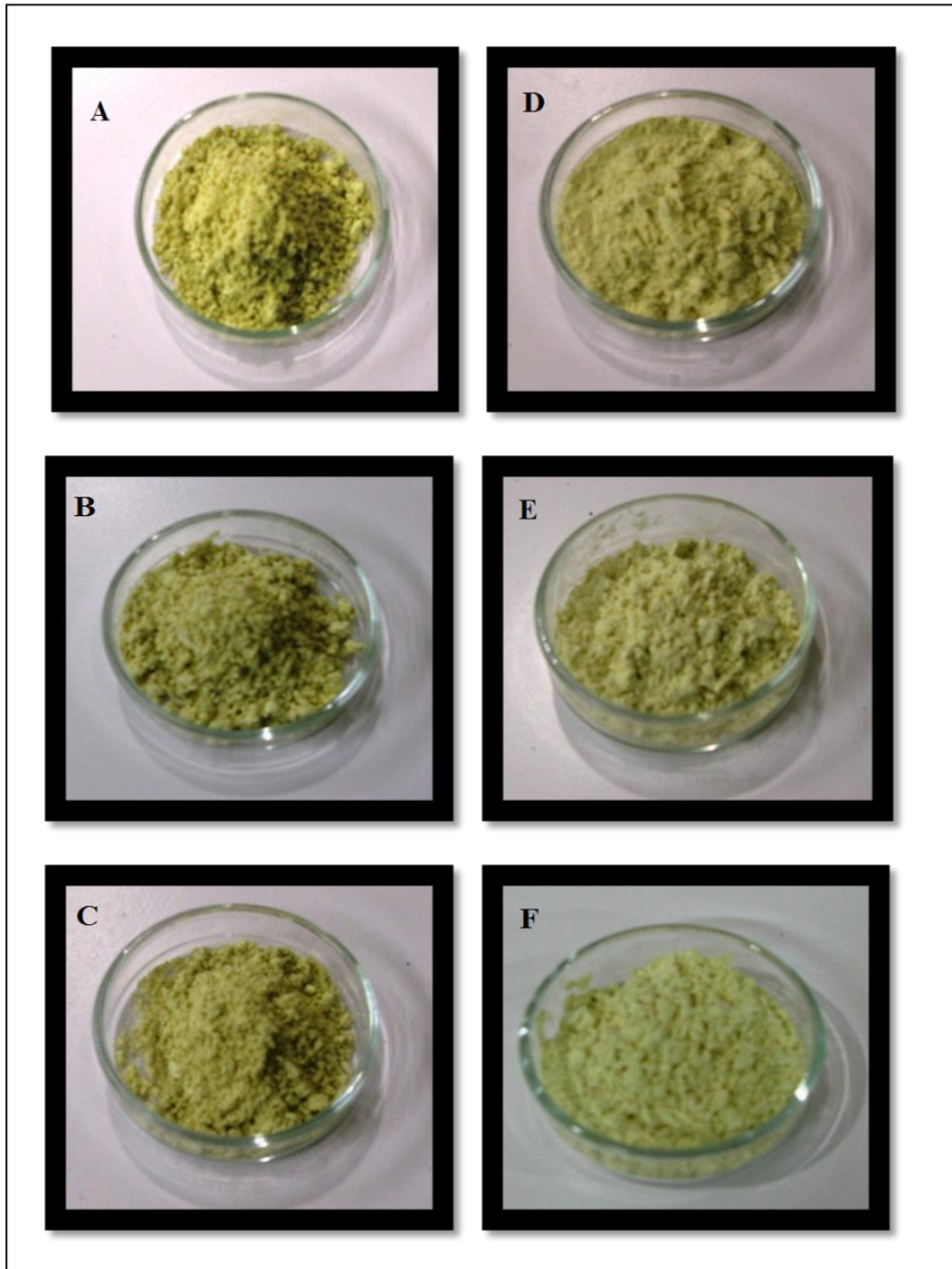


Lampiran 10

Kromatogram andrografolid dalam fraksi air herba sambiloto



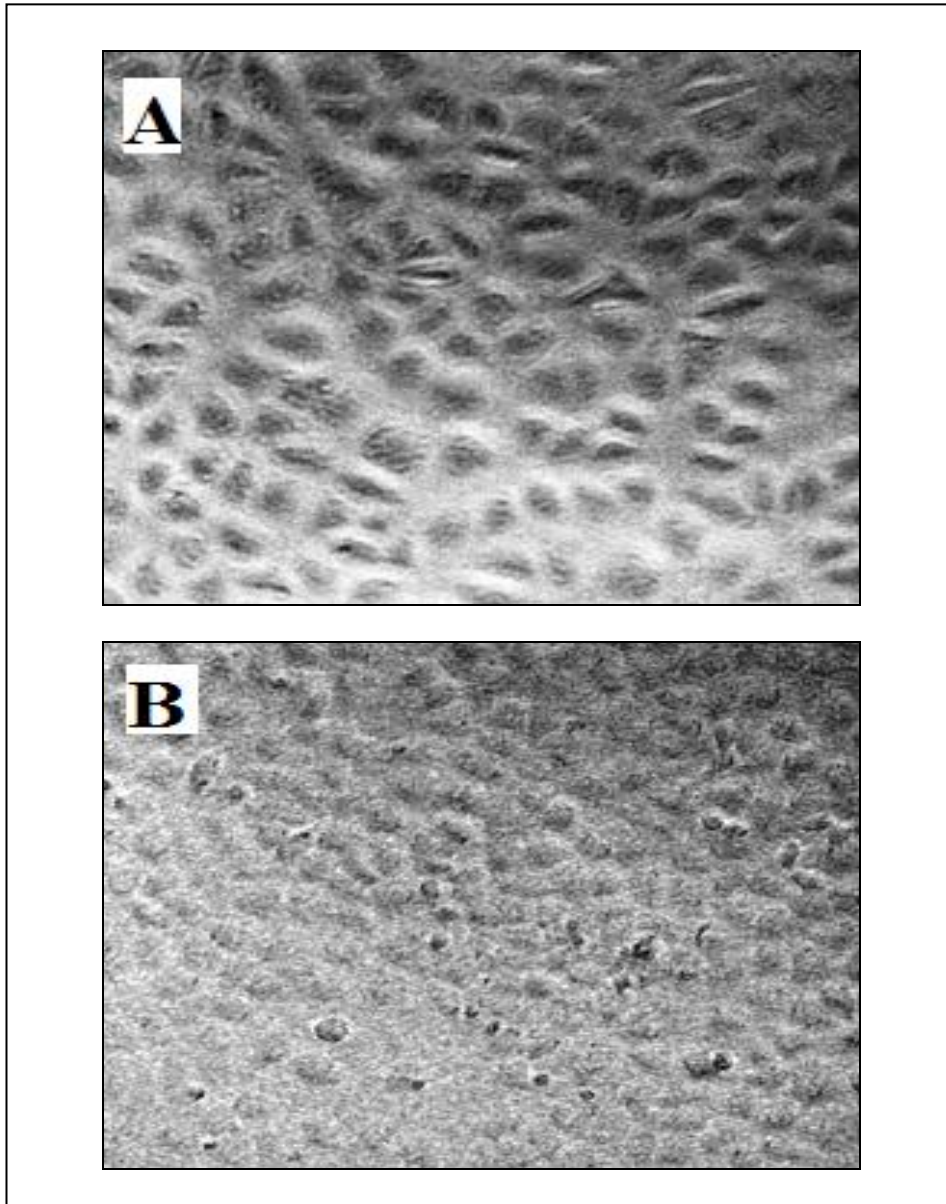
Lampiran 11.
Mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto



Gambar (A) Formula A, (B) formula B, (C) formula C, (D) formula D, (E) formula E, dan (F) formula F

Lampiran 12

Mikrofotograf dari sel kanker payudara galur MCF7 dan T47D



Gambar (A) sel MCF7 dan (B) sel T47D

Lampiran 13.

Data luas puncak andrografolid dalam medium metanol, aquadest, fosfat pH 6,8 dan klorida pH 1,2

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak			Rata-rata
	1	2	3	
Medium metanol				
25	1.003.405	1.192.982	1.141.166	1.112.518
50	2.591.515	2.671.598	2.730.128	2.664.414
100	4.380.428	4.494.647	4.410.683	4.428.586
200	8.718.967	8.819.352	8.465.107	8.667.809
300	12.689.042	13.024.966	13.096.338	12.936.782
400	16.885.031	16.755.945	16.905.238	16.848.738
Medium aquadest				
10	739.892	1.220.983	789.414	916.763
20	1.353.493	1.335.557	1.465.620	1.384.890
30	2.101.604	2.309.465	1.933.760	2.114.943
40	2.462.388	2.464.586	2.656.950	2.527.975
50	3.247.209	3.008.309	2.933.260	3.062.926
100	5.846.083	5.368.760	5.434.585	5.549.809
Medium fosfat pH 6,8				
10	812.585	872.032	799.826	828.148
20	1.271.211	1.162.818	1.282.323	1.238.784
30	1.628.022	1.440.239	1.645.621	1.571.294
40	1.997.602	1.964.011	1.870.219	1.943.944
50	2.213.200	2.260.756	2.267.445	2.247.134
Medium klorida pH 1,2				
10	934.687	864.507	864.507	887.900
20	1.504.146	1.534.108	1.484.762	1.507.672
30	2.190.237	2.209.095	2.140.280	2.179.871
40	3.206.969	3.064.078	2.576.722	2.949.256
50	3.257.626	3.446.210	3.395.480	3.366.439

Lampiran 14.

Hasil penentuan kadar andrografolid dalam ekstrak dan fraksi herba sambiloto

Sampel	Jumlah penimbangan (mg)	Jumlah pelarut (mL)	Luas puncak	Kadar andrografolid (%)	Rata-rata±SD
Ekstrak etanol	13,11	5	23.751.984	21,48	21,52 ± 0,22
	12,11	5	21.814.618	21,33	
	13,00	5	23.868.601	21,77	
Fraksi etanol	16,16	5	28.476.195	20,94	20,76 ± 0,19
	18,86	5	32.592.834	20,56	
	16,20	5	28.331.390	20,78	
Fraksi <i>n</i> -heksan	20,00	5	446.876	0,07	0,07 ± 0,01
	20,10	5	425.571	0,06	
	20,10	5	420.435	0,06	
Fraksi etil asetat	15,35	5	41.381.641	32,15	32,13 ± 0,20
	15,30	5	40.961.473	31,92	
	15,35	5	41.592.445	32,31	
Fraksi air	17,52	5	1.257.044	0,64	0,63 ± 0,02
	13,17	5	982.772	0,60	
	17,52	5	1.244.476	0,63	

Lampiran 15.

Hasil uji BSLT terhadap ekstrak dan fraksi herba sambiloto

Sampel	K (ppm)	Log K	% KM	PE	LC ₅₀ (ppm)
Kontrol	-	-	0	-	-
Ekstrak etanol	100	2,00	33,33	4,56	274,53
	200	2,30	43,33	4,82	
	300	2,48	50,00	5,00	
	400	2,60	53,33	5,08	
	500	2,70	53,33	5,08	
	600	2,78	70,00	5,52	
	700	2,85	60,00	5,25	
	800	2,90	80,00	5,84	
	900	2,95	80,00	5,84	
	1000	3,00	86,67	6,13	
Fraksi etanol	100	2,00	40,00	4,75	196,08
	200	2,30	50,00	5,00	
	300	2,48	46,67	4,92	
	400	2,60	76,67	5,74	
	500	2,70	76,67	5,74	
	600	2,78	86,67	6,13	
	700	2,85	80,00	5,84	
	800	2,90	93,33	6,48	
	900	2,95	100,00	8,09	
	1000	3,00	96,67	6,88	
Ekstrak <i>n</i> -heksan	100	2,00	50,00	5,00	99,57
	200	2,30	76,67	5,74	
	300	2,48	86,67	6,13	
	400	2,60	93,33	6,48	
	500	2,70	96,67	6,88	
	600	2,78	93,33	6,48	
	700	2,85	93,33	6,48	
	800	2,90	96,67	6,88	
	900	2,95	96,67	6,88	
	1000	3,00	100,00	8,09	

Lampiran 15 (lanjutan)

Sampel	K (ppm)	Log K	% KM	PE	LC ₅₀ (ppm)
Kontrol	-	-	0	-	-
Fraksi etil asetat	100	2,00	80,00	5,84	44,34
	200	2,30	96,67	6,88	
	300	2,48	100,00	8,09	
	400	2,60	100,00	8,09	
	500	2,70	100,00	8,09	
	600	2,78	100,00	8,09	
	700	2,85	100,00	8,09	
	800	2,90	100,00	8,09	
	900	2,95	100,00	8,09	
	1000	3,00	100,00	8,09	
Fraksi air	100	2,00	13,33	3,87	1.263,90
	200	2,30	3,33	3,12	
	300	2,48	26,67	4,39	
	400	2,60	30,00	4,48	
	500	2,70	33,33	4,56	
	600	2,78	36,67	4,67	
	700	2,85	43,33	4,82	
	800	2,90	50,00	5,00	
	900	2,95	40,00	4,75	
	1000	3,00	30,00	4,48	

Keterangan : K = konsentrasi
 KM = kematian
 PE = probit empirik
 LC = *lethal concentration*

Lampiran 16.

Hasil uji MTT sel kanker payudara galur MCF7 terhadap ekstrak dan fraksi herba
sambiloto

Sampel	K (ppm)	Log K	AR	% PP	PE	IC ₅₀ (ppm)
Kontrol			0,598			
Ekstrak etanol	10	1,00	0,637	-6,462	0,000	105,20
	20	1,30	0,590	1,337	2,670	
	40	1,60	0,509	14,875	3,960	
	80	1,90	0,318	46,852	4,920	
	160	2,20	0,178	70,306	5,520	
	200	2,30	0,160	73,315	5,610	
Fraksi etanol	10	1,00	0,643	-7,409	0,000	94,76
	20	1,30	0,548	8,412	3,590	
	40	1,60	0,485	18,942	4,120	
	80	1,90	0,252	57,883	5,200	
	160	2,20	0,173	71,142	5,550	
	200	2,30	0,152	74,652	5,670	
Fraksi <i>n</i> -heksan	10	1,00	0,626	-4,680	0,000	158,94
	20	1,30	0,597	0,279	0,000	
	40	1,60	0,598	0,000	0,000	
	80	1,90	0,538	10,028	3,720	
	160	2,20	0,173	71,031	5,550	
	200	2,30	0,124	79,331	5,810	
Fraksi etil asetat	10	1,00	0,638	-6,685	0,000	82,82
	20	1,30	0,568	5,125	3,360	
	40	1,60	0,311	48,022	4,950	
	80	1,90	0,182	69,526	5,500	
	160	2,20	0,137	77,103	5,740	
	200	2,30	0,134	77,549	5,740	
Kontrol	0	-	0,752	0,000	0,000	-
Fraksi air	50	1,70	0,799	-6,206	0,000	934,16
	100	2,00	0,793	-5,496	0,000	
	200	2,30	0,735	2,216	2,950	
	400	2,60	0,731	2,837	3,120	
	500	2,70	0,635	15,514	3,960	

Lampiran 16 (lanjutan)

Sampel	K (ppm)	Log K	AR	% PP	PE	IC ₅₀ (ppm)
Kontrol	-	-	0,650	-	-	-
Andrografolid standar	3	0,48	0,672	-3,436	0,000	14,32
	6	0,78	0,556	14,513	3,920	
	9	0,95	0,464	28,615	4,450	
	12	1,08	0,381	41,385	4,770	
	18	1,26	0,298	54,205	5,100	
	21	1,32	0,204	68,615	5,500	
Cisplatin®	3	0,48	0,427	34,359	4,590	6,66
	6	0,78	0,333	48,718	4,970	
	9	0,95	0,270	58,410	5,200	
	12	1,08	0,214	67,077	5,440	
	18	1,26	0,244	62,410	5,310	
	21	1,32	0,240	63,077	5,330	

Keterangan : K = konsentrasi
 AR = absorbansi
 PP = penghambatan proliferasi
 PE = probit eempirik
 IC = *inhibitory concentration*

Lampiran 17.

Hasil uji MTT sel kanker payudara galur T47D terhadap ekstrak dan fraksi herba
sambiloto

Sampel	K (ppm)	Log K	AR	% PP	PE	IC ₅₀ (ppm)
Kontrol	-	-	0,630	-	-	-
Ekstrak etanol	10	1,00	0,471	25,29	4,33	79,11
	20	1,30	0,335	46,83	4,92	
	40	1,60	0,405	35,66	4,64	
	80	1,90	0,364	42,17	4,80	
	160	2,20	0,303	51,85	5,05	
	200	2,30	0,181	71,27	5,55	
Fraksi etanol	10	1,00	0,458	27,30	4,39	121,76
	20	1,30	0,528	16,24	4,01	
	40	1,60	0,374	40,63	4,77	
	80	1,90	0,318	49,58	5,00	
	160	2,20	0,227	63,97	5,36	
	200	2,30	0,350	44,50	4,85	
Fraksi <i>n</i> -heksan	10	1,00	0,541	14,13	3,92	153,63
	20	1,30	0,579	8,15	3,59	
	40	1,60	0,516	18,15	4,08	
	80	1,90	0,478	24,18	4,29	
	160	2,20	0,392	37,78	4,69	
	200	2,30	0,126	80,05	5,84	
Fraksi etil asetat	10	1,00	0,455	27,72	4,42	45,27
	20	1,30	0,425	32,54	4,53	
	40	1,60	0,367	41,69	4,80	
	80	1,90	0,253	59,89	5,25	
	160	2,20	0,143	77,25	5,74	
	200	2,30	0,155	75,45	5,67	
Kontrol	-	-	0,620	-	-	-
Fraksi air	50	1,70	0,757	-21,977	0,00	1.064,56
	100	2,00	0,684	-10,263	0,00	
	200	2,30	0,642	-3,493	0,00	
	400	2,60	0,558	9,995	3,72	
	500	2,70	0,498	19,774	4,16	

Lampiran 17 (lanjutan)

Sampel	K (ppm)	Log K	AR	% PP	PE	IC ₅₀ (ppm)
Kontrol	-	-	0,620	-	-	-
Andrografolid standar	3	0,48	0,679	-9,404	0,00	17,66
	6	0,78	0,568	8,436	3,59	
	9	0,95	0,545	12,198	3,82	
	12	1,08	0,518	16,550	4,01	
	15	1,18	0,459	26,008	4,36	
	18	1,26	0,394	36,432	4,64	
Cisplatin®	3	0,48	0,664	-7,039	0,00	12,82
	6	0,78	0,555	10,478	3,72	
	9	0,95	0,388	37,399	4,67	
	12	1,08	0,300	51,693	5,05	
	15	1,18	0,248	59,968	5,25	
	18	1,26	0,261	57,872	5,20	

Keterangan : K = konsentrasi
AR = absorbansi
PP = penghambatan proliferasi
PE = probit eempirik
IC = *inhibitory concentration*

Lampiran 18.

Hasil identifikasi kandungan kimia fraksi etil asetat herba sambiloto

Kandungan kimia	Pereaksi	Hasil
Alkaloid	a. Larutan A Dragendorf	a. Terbentuk warna jingga (+)
	b. Larutan B Meyer Dragendorf	b. Terbentuk endapan merah bata (+) Terbentuk endapan putih (+)
Saponin	Aquadest	Tidak terbentuk busa (-)
Tannin	a. Aquadest, besi (III) klorida	Tidak terbentuk warna biru tua (-)
	b. Aquadest, natrium klorida, gelatin	Tidak terbentuk endapan (-)
	c. Aquadest, natrium klorida-gelatin	Tidak terbentuk endapan (-)
	d. Aquadest, asam klorida	Tidak terbentuk warna kuning kecoklatan atau merah kecoklatan (-)
Fenol	Aquadest, besi (III) klorida	Tidak terbentuk warna ungu (-)
Flavonoid	Serbuk Mg, asam klorida, dan amil alkohol	Terbentuk warna merah mudah (+)
Steroid triterpenoid	Liberman-Buchard	Terbentuk warna hijau (+)
	Liberman-Buchard	Terbentuk warna ungu (+)

Lampiran 19.

Hasil uji viskositas formula mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto

Formula	Spindel	Kecepatan (RPM)	Dial reading (dr)	Faktor koreksi (f)	Viskositas ($\eta = dr \times f$)
A	1	10	0,5	20	10
		20	1	10	10
		50	3,75	4	15
		100	10	2	20
		50	4,25	4	17
		20	1	10	10
		10	0,5	20	10
B	1	10	0,5	20	10
		20	1,25	10	12,5
		50	4,5	4	18
		100	11,5	2	23
		50	4,5	4	18
		20	1,25	10	12,5
		10	0,5	20	10
C	1	10	0,5	20	10
		20	1,5	10	15
		50	5,5	4	22
		100	14,75	2	29,5
		50	5,25	4	21
		20	1,5	10	15
		10	0,5	20	10

Lampiran 19 (lanjutan)

Formula	Spindel	Kecepatan (RPM)	Dial reading (dr)	Faktor koreksi (f)	Viskositas ($\eta = dr \times f$)
D	1	10	1	20	20
		20	2	10	20
		50	6,75	4	27
		100	18,25	2	36,5
		50	6,75	4	27
		20	1,75	10	17,5
		10	1	20	20
E	1	10	1,5	20	30
		20	3	10	30
		50	10,25	4	41
		100	28,25	2	56,5
		50	10,25	4	41
		20	3	10	30
		10	1,5	20	30
F	1	10	2,5	20	50
		20	5	10	50
		50	14,5	4	58
		100	38	2	76
		50	14,5	4	58
		20	5	10	50
		10	2,5	20	50

Lampiran 20.

Hasil uji perolehan kembali proses pembuatan mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto

Formula	Wo (g)	Wt (g)	Wp (%)
A	60	11,70	19,50
B	85	20,40	24,00
C	110	34,80	31,64
D	60	18,51	30,85
E	85	24,73	29,09
F	110	34,30	31,18

Lampiran 21.

Hasil distribusi ukuran partikel mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto

Formula	Rentang ditribusi berdasarkan diameter volume partikel							
	Rata-rata (μm)	Median (μm)	< 1 μm	1-10 μm	10-25 μm	25-50 μm	50-75 μm	75-100 μm
A	13,13	13,01	0	0,44	145,11	0	0	0
B	19,24	16,63	0	12,76	69,17	22,51	2,87	0,20
C	12,61	10,98	0	63,40	30,32	0	0	0
D	1,51	1,5	0	100,00	0	0	0	0
E	1,44	1,25	0	100,00	0	0	0	0
F	1,46	1,3	0	100,00	0	0	0	0

Lampiran 22

Hasil penetapan kadar air mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto

Formula	Kadar air (%)	Rata-rata \pm SD
A	13,34	13,44 \pm 0,10
	13,43	
	13,54	
B	12,33	12,08 \pm 0,32
	12,19	
	11,72	
C	12,72	12,95 \pm 0,61
	13,64	
	12,49	
D	6,02	6,01 \pm 0,08
	5,93	
	6,08	
E	5,84	5,96 \pm 0,36
	5,68	
	6,36	
F	5,26	5,15 \pm 0,62
	5,71	
	4,48	

Lampiran 23.

Hasil uji efisiensi penyerapan andrografolid dalam mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto

Formula	Jumlah mikrosfer yang ditimbang (mg)	Jumlah andrografolid yang terjerap dalam mikrosfer (mg)	Jumlah andrografolid teoritis (mg)	Efisiensi penyerapan (%)	Rata-rata \pm SD
A	21,21	1,07	1,14	94,08	94,83 \pm 0,93
	21,85	1,12	1,17	95,86	
	20,38	1,03	1,09	94,53	
B	20,43	0,75	0,77	96,86	97,38 \pm 2,25
	18,13	0,65	0,69	95,43	
	19,02	0,72	0,72	99,84	
C	19,80	0,58	0,58	100,09	99,82 \pm 0,32
	22,50	0,65	0,66	99,46	
	24,55	0,72	0,72	99,91	
D	16,01	0,96	0,86	112,47	112,36 \pm 2,17
	20,71	1,27	1,11	114,47	
	20,08	1,18	1,08	110,13	
E	21,07	0,90	0,80	113,41	111,92 \pm 2,21
	20,77	0,89	0,79	112,98	
	20,23	0,84	0,76	109,38	
F	20,00	0,56	0,58	95,97	96,55 \pm 1,93
	19,01	0,55	0,56	98,70	
	20,00	0,55	0,58	94,98	

Lampiran 24.

Hasil uji kelarutan andrografolid dalam medium aquadest pada suhu 37°C selama 12 jam

Sampel	Jumlah pelarut (mL)	Pengen-ceran	Luas puncak	Kadar andrografolid (ppm)	Rata-rata \pm SD
Formula A	10	5x	11.975.707	1.120,86	1.166,91 \pm 41,99
	10	5x	12.821.156	1.203,09	
	10	5x	12.550.600	1.176,78	
Formula B	10	5x	16.378.649	1.549,07	1.518,27 \pm 65,55
	10	5x	16.519.161	1.562,74	
	10	5x	15.287.806	1.442,98	
Formula C	10	5x	17.689.004	1.676,51	1.821,95 \pm 127,29
	10	5x	20.121.409	1.913,08	
	10	5x	19.742.895	1.876,27	
Formula D	10	5x	11.434.907	1.068,27	1.129,17 \pm 52,75
	10	5x	12.365.890	1.158,81	
	10	5x	12.382.613	1.160,44	
Formula E	10	5x	11.147.186	1.040,29	1.084,90 \pm 38,97
	10	5x	11.783.198	1.102,14	
	10	5x	11.887.296	1.112,27	
Formula F	10	5x	12.813.820	1.202,37	1.222,15 \pm 22,48
	10	5x	13.268.577	1.246,60	
	10	5x	12.969.205	1.217,49	
Fraksi etil asetat	10	1x	3.076.528	51,07	46,32 \pm 4,38
	10	1x	2.632.740	42,44	
	10	1x	2.786.366	45,43	
Andrografolid standar	10	1x	3.735.348	63,89	63,86 \pm 0,01
	10	1x	3.804.144	65,23	
	10	1x	3.661.987	62,46	

Lampiran 25.

Hasil uji kelarutan andrografolid dalam medium fosfat pH 6,8 pada suhu 37°C selama 12 jam

Sampel	Jumlah pelarut (mL)	Pengenceran	Luas puncak	Kadar andrografolid (ppm)	Rata-rata \pm SD
Formula A	10	5x	12.960.506	1.216,64	1.247,29 \pm 27,21
	10	5x	13.494.942	1.268,62	
	10	5x	13.371.548	1.256,62	
Formula B	10	5x	16.310.739	1.542,47	1.545,44 \pm 3,12
	10	5x	16.374.631	1.548,68	
	10	5x	16.338.602	1.545,18	
Formula C	10	5x	18.255.486	1.731,61	1.742,67 \pm 19,65
	10	5x	18.249.695	1.731,04	
	10	5x	18.602.485	1.765,35	
Formula D	10	5x	11.103.145	1.036,00	996,72 \pm 64,56
	10	5x	9.933.077	922,21	
	10	5x	11.061.349	1.031,94	
Formula E	10	5x	11.106.198	1.036,30	1.005,37 \pm 30,09
	10	5x	10.488.215	976,20	
	10	5x	10.770.065	1.003,61	
Formula F	10	5x	11.488.176	1.073,45	1.176,12 \pm 89,25
	10	5x	12.992.466	1.219,75	
	10	5x	13.150.875	1.235,16	
Fraksi etil asetat	10	1x	2.934.492	48,31	50,03 \pm 3,17
	10	1x	3.210.872	53,69	
	10	1x	2.922.914	48,09	
Andrografolid standar	10	1x	3.190.489	53,29	50,45 \pm 2,50
	10	1x	2.950.430	48,62	
	10	1x	2.991.981	49,43	

Lampiran 26.

Hasil uji kelarutan andrografolid dalam medium klorida pH 1,2 pada suhu 37°C selama 12 Jam

Sampel	Jumlah pelarut (mL)	Pengenceran	Luas puncak	Kadar andrografolid (ppm)	Rata-rata \pm SD
Formula A	10	5x	12.453.982	1167,38	1140,50 \pm 13,44
	10	5x	12.399.664	1162,10	
	10	5x	11.679.260	1092,03	
Formula B	10	5x	13.573.388	1276,25	1333,14 \pm 28,45
	10	5x	14.404.954	1357,12	
	10	5x	14.496.897	1366,06	
Formula C	10	5x	16.291.969	1540,64	1518,98 \pm 10,83
	10	5x	15.432.635	1457,07	
	10	5x	16.482.936	1559,22	
Formula D	10	5x	10.690.770	995,90	975,64 \pm 10,13
	10	5x	10.093.291	937,79	
	10	5x	10.663.468	993,24	
Formula E	10	5x	10.743.328	1001,01	1007,44 \pm 3,22
	10	5x	10.654.960	992,41	
	10	5x	11.030.242	1028,91	
Formula F	10	5x	11.875.117	1111,08	1064,66 \pm 23,21
	10	5x	11.092.764	1034,99	
	10	5x	11.225.538	1047,91	
Fraksi etil asetat	10	1x	2.349.657	36,94	39,72 \pm 1,39
	10	1x	2.594.492	41,70	
	10	1x	2.533.808	40,52	
Andrografolid standar	10	1x	2.877.756	47,21	56,53 \pm 4,66
	10	1x	3.727.287	63,73	
	10	1x	3.465.863	58,65	

Lampiran 30.

Laju disolusi andrografolid dalam medium aquadest pada suhu 37°C

Sampel	Menit ke-	Konsentrasi (ppm)	Laju disolusi (ppm/menit)	Rata-rata \pm SD
Formula A	5	74,51	14,90	14,87 \pm 0,15
	5	75,01	15,00	
	5	73,52	14,70	
Formula B	5	71,23	14,25	12,90 \pm 1,16
	5	61,16	12,23	
	5	61,16	12,23	
Formula C	5	67,89	13,58	13,31 \pm 1,13
	5	71,40	14,28	
	5	60,35	12,07	
Formula D	5	51,76	10,35	11,30 \pm 2,61
	5	71,24	14,25	
	5	46,50	9,30	
Formula E	5	65,15	13,03	11,06 \pm 2,06
	5	44,59	8,92	
	5	56,20	11,24	
Formula F	5	48,56	9,71	6,89 \pm 2,50
	5	30,03	6,01	
	5	24,72	4,94	
Fraksi etil asetat	5	10,62	2,12	2,69 \pm 0,53
	5	15,83	3,17	
	5	13,91	2,78	
Andrografolid standar	5	6,38	1,28	3,16 \pm 2,37
	5	11,93	2,39	
	5	29,13	5,83	

Lampiran 31.

Laju disolusi andrografolid dalam medium fosfat pH 6,8 pada suhu 37 °C

Sampel	Menit ke-	Konsentrasi (ppm)	Laju disolusi (ppm/menit)	Rata-rata ± SD
Formula A	5	30,50	6,10	7,22 ± 1,44
	5	33,56	6,71	
	5	44,22	8,84	
Formula B	5	36,47	7,29	8,10 ± 0,77
	5	40,90	8,18	
	5	44,18	8,84	
Formula C	5	26,80	5,36	6,07 ± 1,70
	5	40,05	8,01	
	5	24,22	4,84	
Formula D	5	24,79	4,96	4,17 ± 0,70
	5	18,09	3,62	
	5	19,73	3,95	
Formula E	5	18,14	3,63	3,88 ± 1,03
	5	25,02	5,00	
	5	14,98	3,00	
Formula F	5	20,84	4,17	3,64 ± 0,68
	5	14,35	2,87	
	5	19,37	3,87	
Fraksi etil asetat	5	1,80	0,36	0,45 ± 0,09
	5	2,17	0,43	
	5	2,71	0,54	
Andrografolid standar	5	6,32	1,26	1,39 ± 0,42
	5	9,30	1,86	
	5	5,23	1,05	

Lampiran 32.

Laju disolusi andrografolid dalam medium klorida pH 1,2 pada suhu 37°C

Sampel	Menit ke-	Konsentrasi (ppm)	Laju disolusi (ppm/menit)	Rata-rata \pm SD
Formula A	5	52,70	10,54	11,12 \pm 2,58
	5	44,54	8,89	
	5	69,71	13,94	
Formula B	5	54,80	10,96	12,01 \pm 2,73
	5	75,56	15,11	
	5	49,79	9,96	
Formula C	5	31,97	6,39	9,44 \pm 2,98
	5	47,91	9,58	
	5	61,78	12,36	
Formula D	5	26,73	5,35	6,42 \pm 3,05
	5	20,20	4,04	
	5	49,30	9,86	
Formula E	5	57,06	11,41	7,88 \pm 3,06
	5	31,38	6,28	
	5	29,75	5,95	
Formula F	5	25,66	5,13	5,28 \pm 0,28
	5	27,99	5,60	
	5	25,51	5,10	
Fraksi etil asetat	30	1,20	0,04	0,13 \pm 0,16
	30	1,20	0,04	
	30	9,61	0,32	
Andrografolid standar	5	1,63	0,33	1,07 \pm 0,75
	5	9,10	1,82	
	5	5,32	1,06	

Lampiran 27.

Hasil uji disolusi andrografolid dalam medium aquadest pada suhu 37°C selama 2 jam

Waktu (menit)	Jumlah andrografolid terdisolusi (%b/b)							Fraksi etil asetat	Andrografolid standar
	Formula A	Formula B	Formula C	Formula D	Formula E	Formula F			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	144,22 ± 2,59	125,64 ± 10,81	126,20 ± 10,53	108,85 ± 25,28	109,28 ± 19,86	63,40 ± 23,45	25,53 ± 5,39	31,63 ± 23,72	
10	145,08 ± 6,22	131,16 ± 11,17	136,14 ± 2,67	138,71 ± 15,29	139,75 ± 9,51	101,72 ± 28,89	30,84 ± 1,83	37,16 ± 19,75	
15	146,27 ± 12,00	131,15 ± 12,53	130,61 ± 12,37	146,12 ± 10,76	149,76 ± 1,29	118,43 ± 17,92	33,99 ± 2,14	36,98 ± 20,34	
30	153,20 ± 3,62	133,53 ± 13,16	137,83 ± 11,15	152,32 ± 6,07	153,71 ± 5,76	140,90 ± 9,62	37,53 ± 7,46	45,78 ± 17,34	
60	142,83 ± 4,91	130,93 ± 6,69	133,44 ± 6,39	152,60 ± 2,64	148,96 ± 3,72	145,85 ± 7,00	46,08 ± 5,27	51,98 ± 16,50	
120	150,07 ± 4,52	133,91 ± 9,91	143,92 ± 17,84	152,38 ± 4,97	152,34 ± 3,19	148,21 ± 5,59	51,65 ± 6,75	62,39 ± 12,17	

Lampiran 28.

Hasil uji disolusi andrografolid dalam medium fosfat pH 6,8 pada suhu 37°C selama 2 jam

Waktu (menit)	Jumlah andrografolid terdisolusi (% b/b)							Andrografolid standar
	Formula A	Formula B	Formula C	Formula D	Formula E	Formula F	Fraksi etil asetat	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	70,96 ± 13,71	78,68 ± 7,29	60,35 ± 17,08	41,34 ± 6,47	37,37 ± 9,73	36,08 ± 7,00	4,34 ± 0,83	13,59 ± 4,40
10	82,53 ± 11,36	86,83 ± 10,57	71,93 ± 13,84	62,02 ± 4,23	59,83 ± 3,10	61,71 ± 17,35	6,48 ± 1,90	16,00 ± 5,22
15	85,38 ± 10,64	87,46 ± 11,00	78,05 ± 7,79	72,05 ± 2,82	70,46 ± 11,38	71,72 ± 13,08	8,90 ± 0,94	20,64 ± 6,82
30	87,22 ± 10,82	88,96 ± 11,03	80,76 ± 11,16	82,69 ± 5,19	82,80 ± 2,56	90,01 ± 6,37	10,20 ± 0,72	23,78 ± 8,12
60	89,66 ± 12,04	89,26 ± 10,18	79,71 ± 12,93	87,71 ± 9,42	91,73 ± 8,76	95,85 ± 7,68	12,17 ± 1,64	29,04 ± 8,50
120	92,39 ± 10,47	91,25 ± 7,15	88,18 ± 14,06	91,32 ± 11,34	95,23 ± 9,48	97,37 ± 7,86	19,99 ± 7,63	44,60 ± 12,08

Lampiran 29.

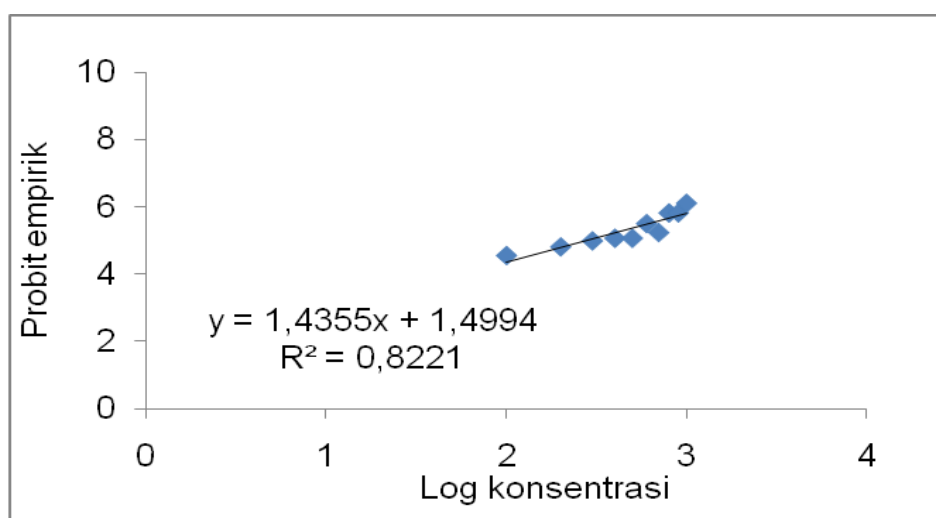
Hasil uji disolusi andrografolid dalam medium klorida pH 1,2 pada suhu 37°C selama 2 jam

Waktu (menit)	Jumlah andrografolid terdisolusi (%b/b)						Fraksi etil asetat	Andrografolid standar
	Formula A	Formula B	Formula C	Formula D	Formula E	Formula F		
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	109,55 ± 26,42	120,24 ± 28,48	92,52 ± 28,22	62,58 ± 29,57	76,90 ± 29,63	49,01 ± 3,25	2,13 ± 3,69	10,33 ± 7,10
10	135,99 ± 12,99	130,76 ± 17,59	119,51 ± 8,80	111,34 ± 17,14	108,85 ± 24,77	77,74 ± 0,11	2,14 ± 3,70	12,74 ± 5,32
15	136,99 ± 20,36	134,97 ± 21,79	123,70 ± 6,95	127,79 ± 16,40	130,03 ± 6,69	100,36 ± 1,59	4,48 ± 5,32	19,36 ± 8,64
30	135,04 ± 14,96	135,18 ± 21,47	124,56 ± 9,14	142,54 ± 7,03	139,57 ± 3,30	118,60 ± 4,02	7,58 ± 9,02	30,34 ± 8,62
60	137,29 ± 13,27	126,43 ± 12,92	124,26 ± 8,08	142,28 ± 7,70	137,41 ± 5,37	127,55 ± 5,20	10,06 ± 12,00	40,17 ± 4,13
120	133,94 ± 10,32	133,68 ± 21,69	126,30 ± 7,51	145,22 ± 7,51	139,30 ± 4,20	130,04 ± 3,10	17,62 ± 11,75	75,79 ± 15,56

Lampiran 33.
Perhitungan nilai LC₅₀ atau IC₅₀

Contoh perhitungan nilai LC₅₀ pada ekstrak etanol

Konsentrasi (ppm)	Log konsentrasi	Jumlah Artemia (ekor)	% kematian	Probit empirik
100	2,00	30	33,33	4,56
200	2,30	30	43,33	4,82
300	2,48	30	50,00	5,00
400	2,60	30	53,33	5,08
500	2,70	30	53,33	5,08
600	2,78	30	70,00	5,52
700	2,85	30	60,00	5,25
800	2,90	30	80,00	5,84
900	2,95	30	80,00	5,84
1000	3,00	30	86,67	6,13



Hubungan antara log konsentrasi dengan probit empirik

$$Y = a + bx$$

$$Y = 1,4355x + 1,4994$$

$$LC_{50} \ Y = 5,00 \rightarrow 2,44$$

$$\text{Antilog} (LC_{50}) = 274,53 \text{ (ppm)}$$

Lampiran 34.

Tabel transformasi persentase (kematian/hambatan proliferasi)
probit empirik

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Lampiran 35.

Perhitungan uji disolusi andrografolid dari mikrosfer fraksi etil asetat herba
sambiloto

Jumlah andrografolid terdisolusi dari mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto
(mg) :

$$\text{a. menit ke-5} = \frac{(Y_5 - a) \times \text{fp} \times M}{b \times 1000}$$

$$\text{b. menit ke-10} = \frac{(Y_{10} - a) \times \text{fp} \times M}{b \times 1000} + \frac{(Y_5 - a) \times \text{fp} \times S}{b \times 1000}$$

$$\text{c. menit ke-15} = \frac{(Y_{15} - a) \times \text{fp} \times M}{b \times 1000} + \frac{(Y_{10} - a) \times \text{fp} \times S}{b \times 1000} + \frac{(Y_5 - a) \times \text{fp} \times S}{b \times 1000}$$

$$\text{d. menit ke-120} = \frac{(Y_{120} - a) \times \text{fp} \times M}{b \times 1000} + \dots + \frac{(Y_5 - a) \times \text{fp} \times S}{b \times 1000}$$

Keterangan : Y = luas area andrografolid

Y_z = luas area andrografolid pada jam ke-

fP = faktor pengenceran

M = volume medium yang digunakan

S = volume pengambilan sampel

a = koefisien intersep

b = slope

Lampiran 36.

Hasil analisa statistik uji efisiensi penyerapan andrografolid dalam mikrosfer fraksi etil asetat herba sambiloto

- a. Hasil uji distribusi normal efisiensi penyerapan andrografolid
- Tujuan : Mengetahui normalitas data efisiensi penyerapan andrografolid
- Hipotesa : H_0 = data efisiensi terdistribusi normal
 H_a = data efisiensi tidak terdistribusi normal
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data efisiensi penyerapan andrografolid $>0,05$
- Kesimpulan : Data hasil uji efisiensi penyerapan andrografolid terdistribusi normal

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Efisiensi
N		18
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	102.1417
	Std. Deviation	7.58306
Most Extreme Differences	Absolute	.273
	Positive	.273
	Negative	-.163
Kolmogorov-Smirnov Z		1.160
Asymp. Sig. (2-tailed)		.136

Lampiran 36. (lanjutan)

b. Hasil uji homogenitas efisiensi penjerapan andrografolid

- Tujuan : Mengetahui homogenitas data efisiensi penjerapan
- Hipotesa : Ho = data efisiensi penjerapan terdistribusi homogen
Ha = data efisiensi penjerapan tidak terdistribusi homogen
- α : 0,05
- Kriteria : Ho ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data efisiensi penjerapan andrografolid $>0,05$
- Kesimpulan : Data hasil uji efisiensi penjerapan andrografolid terdistribusi homogen

Test of Homogeneity of Variances

Efisiensi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.663	5	12	.218

Lampiran 36. (lanjutan)

c. Hasil uji ANOVA efisiensi penyerapan andrografolid

- Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan efisiensi penyerapan andrografolid
- Hipotesa : H_0 = data efisiensi penyerapan berbeda
 H_a = data efisiensi penyerapan tidak berbeda
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data efisiensi penyerapan andrografolid $<0,05$
- Kesimpulan : Terdapat perbedaan efisiensi penyerapan andrografolid antar formula.

ANOVA

Efisiensi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	938.842	5	187.768	58.216	.000
Within Groups	38.704	12	3.225		
Total	977.546	17			

Lampiran 36. (lanjutan)

d. Hasil uji Duncan efisiensi penyerapan andrografolid

- Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan data efisiensi penyerapan berdasarkan perbedaan formula
- Hipotesa : H_0 = data efisiensi penyerapan andrografolid berbeda
 H_a = data efisiensi andrografolid tidak berbeda
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data efisiensi penyerapan andrografolid pada formula A, B, C, D, E, dan F $>0,05$
- Kesimpulan : 1. Formula C berbeda signifikan dengan formula A dan B
 2. Formula F berbeda signifikan dengan formula D dan E

Duncan^a

Formula	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
A	3	94.8233		
F	3	96.5500	96.5500	
B	3	97.3767	97.3767	
C	3		99.8200	
E	3			111.9233
D	3			112.3567
Sig.		.123	.055	.773

Lampiran 37.

Hasil analisa statistik uji kelarutan andrografolid berdasarkan perbedaan formula

a. Hasil uji distribusi normal kelarutan andrografolid

- Tujuan : Mengetahui normalitas data kelarutan andrografolid berdasarkan perbedaan formula
- Hipotesa : H_0 = data kelarutan andrografolid terdistribusi normal
 H_a = data kelarutan andrografolid tidak terdistribusi normal
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data kelarutan andrografolid pada formula A, B, C, D, E, F, fraksi etil asetat dan andrografolid standar $>0,05$
- Kesimpulan : Data kelarutan andrografolid pada formula A, B, C, D, E, F, fraksi etil asetat dan andrografolid standar terdistribusi normal

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	Formula A	Formula B	Formula C	Formula D	Formula E	Formula F	Fraksi etilasetat	Andrografolid standar
N	9	9	9	9	9	9	9	9
Normal Parameters ^{ab}								
Mean	1184.90	1465.61	1694.53	1033.84	1032.57	1154.31	56.9456	45.3544
Std. Deviation	22	67	22	44	11	11		
Most Extreme Differences								
Absolute	.125	.317	.150	.157	.213	.267	.218	.149
Positive	.111	.185	.145	.157	.213	.159	.181	.149
Negative	-.125	-.317	-.150	-.152	-.152	-.267	-.218	-.138
Kolmogorov-Smirnov Z	.376	.951	.450	.470	.639	.800	.655	.448
Asymp. Sig. (2-tailed)	.999	.327	.988	.980	.809	.544	.784	.988

Lampiran 37 (lanjutan)

b. Hasil uji homogenitas kelarutan andrografolid

- Tujuan : Mengetahui homogenitas data kelarutan andrografolid berdasarkan perbedaan formula
- Hipotesa : Ho = data kelarutan andrografolid terdistribusi homogen
Ha = data kelarutan andrografolid tidak terdistribusi homogen
- α : 0,05
- Kriteria : Ho ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data kelarutan andrografolid pada formula A, D, E, F, fraksi etil asetat dan andrografolid standar $>0,05$
Nilai signifikansi data kelarutan andrografolid pada formula B dan C $<0,05$
- Kesimpulan : 1. Data kelarutan andrografolid pada formula A, D, E, F, fraksi etil asetat dan andrografolid standar terdistribusi homogen
2. Data kelarutan andrografolid pada formula B dan C tidak terdistribusi homogen

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Formula A	.560	2	6	.598
Formula B	6.908	2	6	.028
Formula C	6.166	2	6	.035
Formula D	1.530	2	6	.290
Formula E	1.050	2	6	.407
Formula F	5.142	2	6	.050
Fraksi etil asetat	4.701	2	6	.059
Andrografolid standar	.629	2	6	.565

Lampiran 37 (lanjutan)

c. Hasil uji ANOVA kelarutan andrografolid

Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan kelarutan andrografolid berdasarkan perbedaan formula

Hipotesa : H_0 = data kelarutan andrografolid berbeda

H_a = data kelarutan andrografolid tidak berbeda

α : 0,05

Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$

Hipotesa : Nilai signifikansi data kelarutan andrografolid pada formula A, D, E, F, fraksi etil asetat dan andrografolid standar $>0,05$.
Nilai signifikansi data kelarutan andrografolid pada formula B dan C $<0,05$

Kesimpulan : 1. Formula A, D, E, F dan andrografolid standar berbeda signifikan pada ketiga medium
2. Fraksi etil asetat tidak berbeda signifikan pada ketiga medium

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Formula A	Between Groups	18562.896	2	9281.448	6.516	.031
	Within Groups	8546.887	6	1424.481		
	Total	27109.784	8			
Formula D	Between Groups	41560.315	2	20780.157	7.767	.022
	Within Groups	16053.109	6	2675.518		
	Total	57613.424	8			
Formula E	Between Groups	12328.855	2	6164.427	6.634	.030
	Within Groups	5575.245	6	929.207		
	Total	17904.099	8			
Formula F	Between Groups	39346.549	2	19673.275	5.827	.039
	Within Groups	20256.882	6	3376.147		
	Total	59603.431	8			
Fraksi etil asetat	Between Groups	270.653	2	135.327	5.091	.051
	Within Groups	159.489	6	26.582		
	Total	430.143	8			
Andrografolid standar	Between Groups	163.582	2	81.791	6.930	.028
	Within Groups	70.815	6	11.803		
	Total	234.397	8			

Lampiran 37 (lanjutan)

d. Hasil uji Kruskal Wallis kelarutan andrografolid

- Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan kelarutan andrografolid berdasarkan perbedaan formula
- Hipotesa : H_0 = data kelarutan andrografolid berbeda
 H_a = data kelarutan andrografolid tidak berbeda
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi medium aquadest, fosfat, dan klorida $>0,05$
- Kesimpulan : Formula B dan formula C tidak berbeda signifikan

Test Statistics^{a,b}

	Formula B	Formula C
Chi-Square	5.600	5.600
df	2	2
Asymp. Sig.	.061	.061

Lampiran 38

Hasil analisa statistik uji kelarutan andrografolid berdasarkan perbedaan medium

a. Hasil uji distribusi normal kelarutan andrografolid

- Tujuan : Mengetahui normalitas data kelarutan andrografolid berdasarkan perbedaan medium
- Hipotesa : Ho = data kelarutan andrografolid terdistribusi normal
Ha = data kelarutan andrografolid tidak terdistribusi normal
- α : 0,05
- Kriteria : Ho ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data kelarutan andrografolid pada medium aquadest, fosfat, dan klorida $< 0,05$
- Kesimpulan : Data kelarutan andrografolid pada medium aquadest, fosfat, dan klorida tidak terdistribusi normal

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	Aquadest	Fosfat	Klorida
N	48	48	48
Normal Parameters ^{a,b} Mean	83.9244	63.0165	76.7115
Std. Deviation	27.65565	30.44118	36.83070
Most Extreme Absolute Differences	.449	.199	.382
Positive	.281	.131	.264
Negative	-.449	-.199	-.382
Kolmogorov-Smirnov Z	3.108	1.378	2.648
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.045	.000

Lampiran 38 (lanjutan)

b. Hasil uji homogenitas kelarutan andrografolid

- Tujuan : Mengetahui homogenitas data kelarutan andrografolid berdasarkan perbedaan medium
- Hipotesa : H_0 = data kelarutan andrografolid terdistribusi homogen
 H_a = data kelarutan andrografolid tidak terdistribusi homogen
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data kelarutan andrografolid pada medium aquadest, fosfat, dan klorida $< 0,05$
- Kesimpulan : Data kelarutan andrografolid pada medium aquadest, fosfat, dan klorida tidak terdistribusi homogen

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Aquadest	9.224	7	40	.000
Fosfat	3.663	7	40	.004
Klorida	4.581	7	40	.001

Lampiran 38 (lanjutan)

c. Hasil uji Kruskal Wallis kelarutan andrografolid

Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan kelarutan andrografolid berdasarkan perbedaan medium

Hipotesa : H_0 = data kelarutan andrografolid berbeda

H_a = data kelarutan andrografolid tidak berbeda

α : 0,05

Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$

Hipotesa : Nilai signifikansi medium aquadest, fosfat, dan klorida $< 0,05$

Kesimpulan : Medium aquadest, fosfat, dan klorida berbeda signifikan

Test Statistics^{a,b}

	Aquadest	Fosfat	Klorida
Chi-Square	43.696	28.380	37.388
df	7	7	7
Asymp. Sig.	.000	.000	.000

Lampiran 38. (lanjutan)

d. Hasil uji Duncan kelarutan andrografolid

Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan kelarutan andrografolid berdasarkan perbedaan medium

Hipotesa : H_0 = data kelarutan andrografolid berbeda

H_a = data kelarutan andrografolid tidak berbeda

α : 0,05

Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$

Hipotesa : Nilai signifikansi medium aquadest, fosfat, dan klorida $>0,05$

Kesimpulan : 1. Medium aquadest
 Formula B dan C berbeda signifikan dengan formula A.
 Formula D dan E berbeda signifikan dengan formula F

2. Medium fosfat
 Formula A berbeda signifikan dengan formula B dan berbeda dengan formula C. Formula D dan E berbeda signifikan dengan formula F.

3. Medium klorida
 Formula A berbeda signifikan dengan formula B dan berbeda dengan formula C. Formula D dan E berbeda signifikan dengan formula F.

Aquadest

Duncan^a

Formula	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Andrografolid standar	3	46.3133				
Fraksi etil asetat	3	63.8600				
Formula E	3		1084.9000			
Formula D	3		1129.1733	1129.1733		
Formula A	3		1166.9100	1166.9100		
Formula F	3			1222.1533		
Formula B	3				1518.2633	
Formula C	3					1821.9533
Sig.		.717	.120	.081	1.000	1.000

Lampiran 38. (lanjutan)

Fosfat
Duncan^a

Formula	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Andrografolid standar	3	50.0300				
Fraksi etil asetat	3	50.4467				
Formula D	3		996.7167			
Formula E	3		1005.3700			
Formula F	3			1176.1200		
Formula A	3			1247.2933		
Formula B	3				1545.4433	
Formula C	3					1742.6667
Sig.		.990	.805	.055	1.000	1.000

Klorida
Duncan^a

Formula	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Andrografolid standar	3	39.7200					
Fraksi etil asetat	3	56.5300					
Formula D	3		975.6433				
Formula E	3		1007.4433	1007.4433			
Formula F	3			1064.6600			
Formula A	3				1140.5033		
Formula B	3					1333.1433	
Formula C	3						1518.9767
Sig.		.575	.295	.069	1.000	1.000	1.000

Lampiran 39

Hasil analisa statistik laju disolusi andrografolid berdasarkan perbedaan formula

a. Hasil uji distribusi normal laju disolusi andrografolid

Tujuan : Mengetahui normalitas data laju disolusi andrografolid berdasarkan perbedaan formula

Hipotesa : H_0 = data laju disolusi andrografolid terdistribusi normal
 H_a = data laju disolusi andrografolid tidak terdistribusi normal

α : 0,05

Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$

Hipotesa : Nilai signifikansi data laju disolusi formula A, B, C, D, E, F, fraksi etil asetat dan andrografolid standar $> 0,05$

Kesimpulan : Data laju disolusi formula A, B, C, D, E, F, fraksi etil asetat dan andrografolid standar terdistribusi normal

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	Formula A	Formula B	Formula C	Formula D	Formula E	Formula F	Fraksi etil asetat	Andrografolid standar
N	9	9	9	9	9	9	9	9
Normal Parameters ^{a,b}								
Mean	11.0689	11.0056	9.6078	7.2978	7.6067	5.2667	1.0889	1.8756
Std. Deviation	3.62706	2.69132	3.62161	3.75548	3.65955	1.91890	1.24058	1.59588
Most Extreme Differences								
Absolute	.230	.123	.196	.254	.197	.238	.338	.282
Positive	.170	.123	.146	.254	.197	.238	.338	.282
Negative	-.230	-.120	-.196	-.164	-.173	-.122	-.199	-.191
Kolmogorov-Smirnov Z	.690	.368	.588	.761	.591	.714	1.013	.845
Asymp. Sig. (2-tailed)	.727	.999	.879	.609	.876	.687	.257	.473

Lampiran 39 (lanjutan)

b. Hasil uji homogenitas laju disolusi andrografolid

- Tujuan : Mengetahui homogenitas data laju disolusi andrografolid berdasarkan perbedaan formula
- Hipotesa : H_0 = data laju disolusi andrografolid terdistribusi normal
 H_a = data laju disolusi andrografolid tidak terdistribusi normal
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data laju disolusi formula A, B, C, D, E, fraksi etil asetat dan andrografolid $>0,05$
 Nilai signifikansi data laju disolusi formula F $<0,05$
- Kesimpulan : Data laju disolusi formula A, B, C, D, E, fraksi etil asetat dan andrografolid terdistribusi homogen
 Data laju disolusi formula F tidak terdistribusi homogen

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Formula A	4.246	2	6	.071
Formula B	4.191	2	6	.073
Formula C	1.001	2	6	.421
Formula D	3.208	2	6	.113
Formula E	2.379	2	6	.174
Formula F	6.904	2	6	.028
Fraksi etil asetat	3.610	2	6	.093
Andrografolid standar	5.141	2	6	.050

Lampiran 39 (lanjutan)

c. Hasil uji ANOVA laju disolusi andrografolid

- Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan laju disolusi andrografolid berdasarkan perbedaan formula
- Hipotesa : H_0 = data laju disolusi andrografolid berbeda
 H_a = data laju disolusi andrografolid tidak berbeda
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data laju disolusi formula A, B, C, D, E, dan fraksi etil asetat $<0,05$.
 Nilai signifikansi andrografolid standar $>0,05$
- Kesimpulan : Data laju disolusi formula A, B, C, D, E, dan fraksi etil asetat berbeda signifikan tetapi andrografolid standar tidak berbeda signifikan pada ketiga medium.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Formula A	Between Groups	87.797	2	43.899	15.096	.005
	Within Groups	17.447	6	2.908		
	Total	105.244	8			
Formula B	Between Groups	39.100	2	19.550	6.224	.034
	Within Groups	18.845	6	3.141		
	Total	57.945	8			
Formula C	Between Groups	78.748	2	39.374	9.024	.016
	Within Groups	26.180	6	4.363		
	Total	104.929	8			
Formula D	Between Groups	79.606	2	39.803	7.188	.026
	Within Groups	33.223	6	5.537		
	Total	112.829	8			
Formula E	Between Groups	77.808	2	38.904	7.959	.021
	Within Groups	29.330	6	4.888		
	Total	107.138	8			
Fraksi etil asetat	Between Groups	11.680	2	5.840	55.432	.000
	Within Groups	.632	6	.105		
	Total	12.312	8			
Andrografolid standar	Between Groups	7.655	2	3.827	1.805	.243
	Within Groups	12.720	6	2.120		
	Total	20.375	8			

Lampiran 39 (lanjutan)

d. Hasil uji Kruskal Wallis laju disolusi andrografolid

- Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan laju disolusi andrografolid berdasarkan perbedaan formula
- Hipotesa : H_0 = data laju disolusi andrografolid berbeda
 H_a = data laju disolusi andrografolid tidak berbeda
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data laju disolusi formula $F > 0,05$
- Kesimpulan : Data laju disolusi formula F tidak berbeda signifikan pada ketiga medium.

Test Statistics^{a,b}

	Formula F
Chi-Square	5.600
df	2
Asymp. Sig.	.061

Lampiran 40

Hasil analisa statistik laju disolusi andrografolid berdasarkan perbedaan medium

a. Hasil uji distribusi normal laju disolusi andrografolid

- Tujuan : Mengetahui normalitas data laju disolusi andrografolid berdasarkan perbedaan medium
- Hipotesa : H_0 = data laju disolusi andrografolid terdistribusi normal
 H_a = data laju disolusi andrografolid tidak terdistribusi normal
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data laju disolusi medium aquadest, fosfat dan klorida $> 0,05$
- Kesimpulan : Data laju disolusi medium aquadest, fosfat, dan klorida terdistribusi normal

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Aquadest	Fosfat	Klorida
N		24	24	24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9.5233	4.3642	6.6692
	Std. Deviation	4.72484	2.68359	4.59453
Most Extreme Differences	Absolute	.163	.085	.112
	Positive	.123	.085	.108
	Negative	-.163	-.080	-.112
Kolmogorov-Smirnov Z		.800	.415	.548
Asymp. Sig. (2-tailed)		.543	.995	.925

Lampiran 40 (lanjutan)

b. Hasil uji homogenitas laju disolusi andrografolid

- Tujuan : Mengetahui homogenitas data laju disolusi andrografolid berdasarkan perbedaan medium
- Hipotesa : H_0 = data laju disolusi andrografolid terdistribusi normal
 H_a = data laju disolusi andrografolid tidak terdistribusi normal
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data laju disolusi medium aquadest, fosfat, dan klorida $< 0,05$
- Kesimpulan : Data laju disolusi medium aquadest, fosfat, dan klorida tidak terdistribusi homogen

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Aquadest	2.672	7	16	.049
Fosfat	3.066	7	16	.030
Klorida	2.918	7	16	.036

Lampiran 40 (lanjutan)

c. Hasil uji Kruskal Wallis laju disolusi andrografolid

- Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan laju disolusi andrografolid berdasarkan perbedaan medium
- Hipotesa : H_0 = data laju disolusi andrografolid berbeda
 H_a = data laju disolusi andrografolid tidak berbeda
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data laju disolusi pada medium aquadest, fosfat, dan klorida $<0,05$
- Kesimpulan : Data laju disolusi pada medium aquadest, fosfat, dan klorida berbeda signifikan

Test Statistics^{a,b}

	Aquadest	Fosfat	Klorida
Chi-Square	19.887	20.532	19.102
df	7	7	7
Asymp. Sig.	.006	.005	.008

Lampiran 40. (lanjutan)

d. Hasil uji Duncan laju disolusi andrografolid

- Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan laju disolusi andrografolid berdasarkan perbedaan medium
- Hipotesa : H_0 = data laju disolusi andrografolid berbeda
 H_a = data laju disolusi andrografolid tidak berbeda
- α : 0,05
- Kriteria : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$
- Hipotesa : Nilai signifikansi data laju disolusi pada medium aquadest, fosfat, dan klorida $>0,05$
- Kesimpulan : 1. Medium aquadest.
 Formula A, B, dan C tidak berbeda signifikan.
 Formula D dan E berbeda signifikan dengan formula F.
2. Medium fosfat.
 Formula A tidak berbeda signifikan dengan formula B dan C.
 Formula D, E, dan F tidak berbeda signifikan.
3. Medium klorida.
 Formula A, B, dan C tidak berbeda signifikan.
 Formula D, E, dan F tidak berbeda signifikan.

Aquadest
 Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Fraksi etil asetat	3	2.6900			
Andrografolid standar	3	3.1667			
Formula F	3		6.8867		
Formula E	3			11.0633	
Formula D	3			11.3000	
Formula B	3			12.9033	12.9033
Formula C	3			13.3100	13.3100
Formula A	3				14.8667
Sig.		.750	1.000	.178	.223

Lampiran 40. (lanjutan)

Fosfat
Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Fraksi etil asetat	3	.4433			
Andrografolid standar	3	1.3900			
Formula F	3		3.6367		
Formula E	3		3.8767		
Formula D	3		4.1767		
Formula C	3			6.0700	
Formula A	3			7.2167	7.2167
Formula B	3				8.1033
Sig.		.256	.534	.173	.286

Klorida
Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Fraksi etil asetat	3	.1333		
Andrografolid standar	3	1.0700		
Formula F	3		5.2767	
Formula D	3		6.4167	
Formula E	3		7.8800	7.8800
Formula C	3		9.4433	9.4433
Formula A	3			11.1233
Formula B	3			12.0100
Sig.		.625	.057	.059

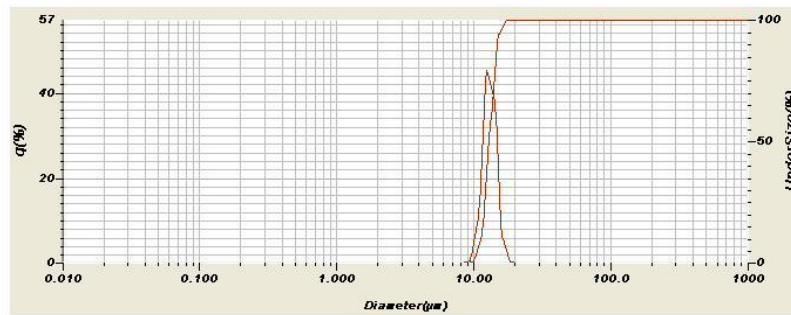
Lampiran 41.

Hasil analisa distribusi ukuran partikel formula A

2010.04.12 08:38:48

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

Sample Name	: Formula A	Median Size	: 13.01798(µm)
ID#	: 201003291539364	Mean Size	: 13.13206(µm)
Data Name	: 201003291539364	Std.Dev.	: 1.3886(µm)
Transmittance(R)	: 79.4(%)	Geo Mean Size	: 13.0592(µm)
Transmittance(B)	: 76.2(%)	Geo Std.Dev.	: 1.1112(µm)
Circulation Speed	: OFF	Mode Size	: 12.9043(µm)
Agitation Speed	: OFF	Span	: OFF
Ultra Sonic	: OFF	Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 [%]- 11.4568(µm)
Form of Distribution	: Auto		: (9)90.00 [%]- 14.9704(µm)
Distribution Base	: Volume		
Refractive Index (R)	: Mikrosfer Formula A[Mikrosfer Formula A(1.600 - 0.000),Parafin oil(1.476)]		
Refractive Index (B)	: Mikrosfer Formula A[Mikrosfer Formula A(1.600 - 0.000),Parafin oil(1.476)]		
Material	: mikrosfer 5.1		
Source	: PTFM_Idah Rosidah		
Lot Number	: 1		
Test or Assay. Number	: Assay		



No.	Diameter (µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter (µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter (µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter (µm)	q(%)	UnderSize(%)
1	0.011	0.000	0.000	25	0.296	0.000	0.000	49	7.697	0.000	0.000	73	200.000	0.000	100.000
2	0.013	0.000	0.000	26	0.339	0.000	0.000	50	8.816	0.000	0.000	74	226.075	0.000	100.000
3	0.015	0.000	0.000	27	0.389	0.000	0.000	51	10.097	0.440	0.440	75	252.376	0.000	100.000
4	0.017	0.000	0.000	28	0.445	0.000	0.000	52	11.565	10.270	10.711	76	300.518	0.000	100.000
5	0.020	0.000	0.000	29	0.510	0.000	0.000	53	13.246	45.038	55.769	77	344.206	0.000	100.000
6	0.022	0.000	0.000	30	0.584	0.000	0.000	54	15.172	37.370	93.739	78	394.244	0.000	100.000
7	0.026	0.000	0.000	31	0.669	0.000	0.000	55	17.377	6.074	99.813	79	451.556	0.000	100.000
8	0.029	0.000	0.000	32	0.766	0.000	0.000	56	19.904	0.187	100.000	80	517.200	0.000	100.000
9	0.034	0.000	0.000	33	0.877	0.000	0.000	57	22.797	0.000	100.000	81	592.387	0.000	100.000
10	0.039	0.000	0.000	34	1.005	0.000	0.000	58	26.111	0.000	100.000	82	678.504	0.000	100.000
11	0.044	0.000	0.000	35	1.151	0.000	0.000	59	29.907	0.000	100.000	83	777.141	0.000	100.000
12	0.051	0.000	0.000	36	1.318	0.000	0.000	60	34.255	0.000	100.000	84	890.116	0.000	100.000
13	0.058	0.000	0.000	37	1.510	0.000	0.000	61	39.234	0.000	100.000	85	1000.000	0.000	100.000
14	0.067	0.000	0.000	38	1.729	0.000	0.000	62	44.938	0.000	100.000				
15	0.076	0.000	0.000	39	1.981	0.000	0.000	63	51.471	0.000	100.000				
16	0.087	0.000	0.000	40	2.269	0.000	0.000	64	58.953	0.000	100.000				
17	0.100	0.000	0.000	41	2.599	0.000	0.000	65	67.523	0.000	100.000				
18	0.115	0.000	0.000	42	2.976	0.000	0.000	66	77.339	0.000	100.000				
19	0.131	0.000	0.000	43	3.409	0.000	0.000	67	88.583	0.000	100.000				
20	0.150	0.000	0.000	44	3.905	0.000	0.000	68	101.460	0.000	100.000				
21	0.172	0.000	0.000	45	4.472	0.000	0.000	69	116.210	0.000	100.000				
22	0.197	0.000	0.000	46	5.122	0.000	0.000	70	133.103	0.000	100.000				
23	0.226	0.000	0.000	47	5.867	0.000	0.000	71	152.453	0.000	100.000				
24	0.259	0.000	0.000	48	6.720	0.000	0.000	72	174.616	0.000	100.000				

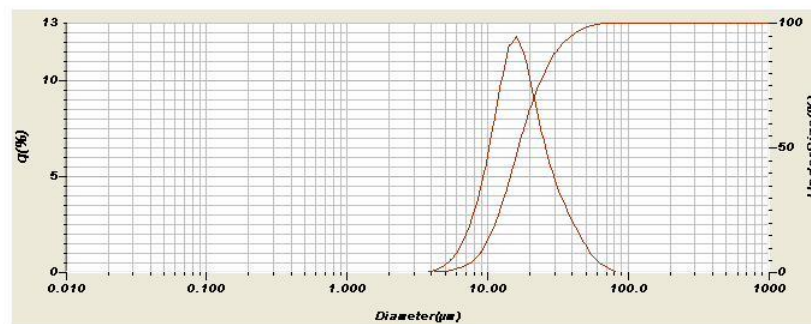
Lampiran 42.

Hasil analisa distribusi ukuran partikel formula B

2010.05.15 11:28:00

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

Sample Name	: Formula B	Median Size	: 16.63215(µm)
ID#	: 201003291613366	Mean Size	: 19.23714(µm)
Data Name	: 201003291613366	Std.Dev.	: 10.1833(µm)
Transmittance(R)	: 84.0(%)	Geo.Mean Size	: 17.0853(µm)
Transmittance(B)	: 72.0(%)	Geo.Std.Dev.	: 1.6155(µm)
Circulation Speed	: OFF	Mode Size	: 16.1863(µm)
Agitation Speed	: OFF	Span	: OFF
Ultra Sonic	: Auto	Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 (%) - 9.4074(µm)
Form of Distribution	: Auto		: (9)90.00 (%) - 32.7770(µm)
Distribution Base	: Volume		
Refractive Index (R)	: Mikroster Formula B[Mikroster Formula B(1.600 - 0.000),Parafin oil(1.476)]		
Refractive Index (B)	: Mikroster Formula B[Mikroster Formula B(1.600 - 0.000),Parafin oil(1.476)]		
Material	: mikroster 7.5.1		
Source	: PTFM_Idah Rosidah		
Lot Number	: 1		
Test or Assay. Number	: Assay		



No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)
1	0.011	0.000	0.000	25	0.296	0.000	0.000	49	7.697	2.070	4.222	73	200.000	0.000	100.000
2	0.013	0.000	0.000	26	0.339	0.000	0.000	50	8.816	3.389	7.673	74	229.075	0.000	100.000
3	0.015	0.000	0.000	27	0.389	0.000	0.000	51	10.097	5.071	12.643	75	262.376	0.000	100.000
4	0.017	0.000	0.000	28	0.445	0.000	0.000	52	11.565	7.395	20.038	76	300.518	0.000	100.000
5	0.020	0.000	0.000	29	0.510	0.000	0.000	53	13.246	9.964	29.902	77	344.206	0.000	100.000
6	0.022	0.000	0.000	30	0.584	0.000	0.000	54	15.172	11.777	41.679	78	394.244	0.000	100.000
7	0.026	0.000	0.000	31	0.669	0.000	0.000	55	17.377	12.280	53.969	79	451.586	0.000	100.000
8	0.029	0.000	0.000	32	0.766	0.000	0.000	56	19.904	11.208	65.177	80	517.200	0.000	100.000
9	0.034	0.000	0.000	33	0.877	0.000	0.000	57	22.797	9.233	74.410	81	592.387	0.000	100.000
10	0.039	0.000	0.000	34	1.005	0.000	0.000	58	26.111	7.207	81.617	82	678.504	0.000	100.000
11	0.044	0.000	0.000	35	1.151	0.000	0.000	59	29.907	5.526	87.143	83	777.141	0.000	100.000
12	0.051	0.000	0.000	36	1.318	0.000	0.000	60	34.255	4.231	91.375	84	890.116	0.000	100.000
13	0.058	0.000	0.000	37	1.510	0.000	0.000	61	39.234	3.219	94.594	85	1000.000	0.000	100.000
14	0.067	0.000	0.000	38	1.729	0.000	0.000	62	44.938	2.330	96.924				
15	0.076	0.000	0.000	39	1.981	0.000	0.000	63	51.471	1.534	98.458				
16	0.087	0.000	0.000	40	2.269	0.000	0.000	64	58.953	0.891	99.348				
17	0.100	0.000	0.000	41	2.599	0.000	0.000	65	67.523	0.448	99.796				
18	0.115	0.000	0.000	42	2.976	0.000	0.000	66	77.339	0.204	100.000				
19	0.131	0.000	0.000	43	3.409	0.000	0.000	67	88.583	0.000	100.000				
20	0.150	0.000	0.000	44	3.905	0.000	0.000	68	101.460	0.000	100.000				
21	0.172	0.000	0.000	45	4.472	0.108	0.108	69	116.210	0.000	100.000				
22	0.197	0.000	0.000	46	5.122	0.273	0.381	70	133.103	0.000	100.000				
23	0.226	0.000	0.000	47	5.867	0.600	0.981	71	152.453	0.000	100.000				
24	0.259	0.000	0.000	48	6.720	1.171	2.152	72	174.616	0.000	100.000				

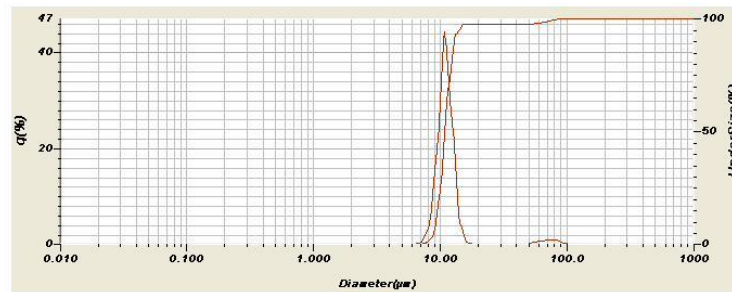
Lampiran 43.

Hasil analisa distribusi ukuran partikel formula C

2010.05.15 11:28:33

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

Sample Name	: Formula C	Median Size	: 10.97107(µm)
ID#	: 201003310915362	Mean Size	: 12.60860(µm)
Data Name	: 201003310915362	Std.Dev.	: 10.0949(µm)
Transmittance(R)	: 89.7(%)	Geo.Mean Size	: 11.4703(µm)
Transmittance(B)	: 95.0(%)	Geo.Std.Dev.	: 1.3827(µm)
Circulation Speed	: OFF	Mode Size	: 10.9153(µm)
Agitation Speed	: OFF	Span	: OFF
Ultra Sonic	: OFF	Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 (%) - 9.2011(µm)
Form of Distribution	: Auto		: (9)90.00 (%) - 13.0584(µm)
Distribution Base	: Volume		
Refractive Index (R)	: Mikroskop Formula c[Mikroskop formula C(1.600 - 0.000i),Parafin oil(1.457)]		
Refractive Index (B)	: Mikroskop Formula c[Mikroskop formula C(1.600 - 0.000i),Parafin oil(1.457)]		
Material	: Mikroskop Formula C (10.1)		
Source	: PTFM_idah		
Lot Number	: 1		
Test or Assay Number	: Assay		



No.	Blaine (kg/m³)	q(%)	Under Size(%)	No.	Blaine (kg/m³)	q(%)	Under Size(%)	No.	Blaine (kg/m³)	q(%)	Under Size(%)	No.	Blaine (kg/m³)	q(%)	Under Size(%)
1	0.011	0.000	0.000	25	0.256	0.000	0.000	49	7.697	0.270	0.270	73	200.000	0.000	100.000
2	0.013	0.000	0.000	26	0.309	0.000	0.000	50	8.816	3.730	4.000	74	229.075	0.000	100.000
3	0.016	0.000	0.000	27	0.389	0.000	0.000	51	10.097	19.023	23.024	75	262.975	0.000	100.000
4	0.017	0.000	0.000	28	0.445	0.000	0.000	52	11.966	44.106	67.131	76	300.518	0.000	100.000
5	0.020	0.000	0.000	29	0.510	0.000	0.000	53	13.246	28.998	92.689	77	344.200	0.000	100.000
6	0.022	0.000	0.000	30	0.584	0.000	0.000	54	15.172	44.440	97.129	78	394.244	0.000	100.000
7	0.026	0.000	0.000	31	0.669	0.000	0.000	55	17.377	0.321	97.450	79	451.556	0.000	100.000
8	0.029	0.000	0.000	32	0.766	0.000	0.000	56	19.904	0.000	97.450	80	517.200	0.000	100.000
9	0.034	0.000	0.000	33	0.877	0.000	0.000	57	22.797	0.000	97.450	81	592.387	0.000	100.000
10	0.039	0.000	0.000	34	1.005	0.000	0.000	58	26.111	0.000	97.450	82	678.504	0.000	100.000
11	0.044	0.000	0.000	35	1.151	0.000	0.000	59	29.907	0.000	97.450	83	777.141	0.000	100.000
12	0.051	0.000	0.000	36	1.318	0.000	0.000	60	34.255	0.000	97.450	84	890.116	0.000	100.000
13	0.058	0.000	0.000	37	1.510	0.000	0.000	61	39.234	0.000	97.450	85	1000.000	0.000	100.000
14	0.067	0.000	0.000	38	1.729	0.000	0.000	62	44.938	0.000	97.450				
15	0.076	0.000	0.000	39	1.981	0.000	0.000	63	51.471	0.000	97.450				
16	0.087	0.000	0.000	40	2.269	0.000	0.000	64	58.993	0.227	97.677				
17	0.100	0.000	0.000	41	2.599	0.000	0.000	65	67.523	0.514	98.190				
18	0.115	0.000	0.000	42	2.976	0.000	0.000	66	77.339	0.902	99.092				
19	0.131	0.000	0.000	43	3.409	0.000	0.000	67	88.883	1.709	99.802				
20	0.150	0.000	0.000	44	3.905	0.000	0.000	68	101.460	0.198	100.000				
21	0.172	0.000	0.000	45	4.472	0.000	0.000	69	116.210	0.000	100.000				
22	0.197	0.000	0.000	46	5.122	0.000	0.000	70	133.103	0.000	100.000				
23	0.225	0.000	0.000	47	5.867	0.000	0.000	71	152.453	0.000	100.000				
24	0.259	0.000	0.000	48	6.720	0.000	0.000	72	174.616	0.000	100.000				

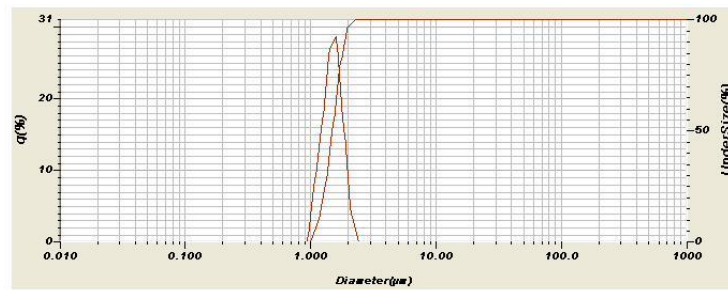
Lampiran 44.

Hasil analisa distribusi ukuran partikel formula D

2010.05.15 13:58:42

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

Sample Name	: Formula D	Median Size	: 1.49783(µm)
ID#	: 201005151342628	Mean Size	: 1.50948(µm)
Data Name	: 201005151342628	Std.Dev.	: 0.25986(µm)
Transmittance(R)	: 93.1(%)	Geo.Mean Size	: 1.4874(µm)
Transmittance(B)	: 73.0(%)	Geo.Std.Dev.	: 1.1080(µm)
Circulation Speed	: OFF	Mode Size	: 1.5752(µm)
Agitation Speed	: OFF	Span	: OFF
Ultra Sonic	: OFF	Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 (%) : 1.1675(µm)
Form of Distribution	: Auto		: (9)90.00 (%) : 1.8791(µm)
Distribution Base	: Number		
Refractive Index (R)	: Formula D[Mikroster 5:1(1.336 - 0.000)Ethanol(1.360)]		
Refractive Index (B)	: Formula D[Mikroster 5:1(1.336 - 0.000)Ethanol(1.360)]		
Material	: Mikroster 5:1		
Source	: PTFM-Idah Rosidah		
Lot Number	: 1		
Test or Assay. Number	: Assay		



No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)
1	0.011	0.000	0.000	25	0.296	0.000	0.000	49	7.897	0.000	100.000	73	200.000	0.000	100.000
2	0.013	0.000	0.000	26	0.339	0.000	0.000	50	8.816	0.000	100.000	74	229.075	0.000	100.000
3	0.015	0.000	0.000	27	0.389	0.000	0.000	51	10.097	0.000	100.000	75	262.375	0.000	100.000
4	0.017	0.000	0.000	28	0.445	0.000	0.000	52	11.665	0.000	100.000	76	300.618	0.000	100.000
5	0.020	0.000	0.000	29	0.510	0.000	0.000	53	13.246	0.000	100.000	77	344.205	0.000	100.000
6	0.022	0.000	0.000	30	0.584	0.000	0.000	54	15.172	0.000	100.000	78	394.244	0.000	100.000
7	0.025	0.000	0.000	31	0.669	0.000	0.000	55	17.377	0.000	100.000	79	451.895	0.000	100.000
8	0.029	0.000	0.000	32	0.766	0.000	0.000	56	19.904	0.000	100.000	80	517.200	0.000	100.000
9	0.034	0.000	0.000	33	0.877	0.000	0.000	57	22.797	0.000	100.000	81	592.387	0.000	100.000
10	0.039	0.000	0.000	34	1.005	0.000	0.000	58	26.111	0.000	100.000	82	678.904	0.000	100.000
11	0.044	0.000	0.000	35	1.151	8.262	8.262	59	29.907	0.000	100.000	83	777.144	0.000	100.000
12	0.051	0.000	0.000	36	1.318	16.530	24.791	60	34.255	0.000	100.000	84	890.116	0.000	100.000
13	0.058	0.000	0.000	37	1.510	24.789	51.580	61	39.234	0.000	100.000	85	1000.000	0.000	100.000
14	0.067	0.000	0.000	38	1.729	28.608	80.188	62	44.938	0.000	100.000				
15	0.076	0.000	0.000	39	1.981	16.042	96.231	63	51.471	0.000	100.000				
16	0.087	0.000	0.000	40	2.269	3.769	100.000	64	58.953	0.000	100.000				
17	0.100	0.000	0.000	41	2.599	0.000	100.000	65	67.823	0.000	100.000				
18	0.115	0.000	0.000	42	2.976	0.000	100.000	66	77.339	0.000	100.000				
19	0.131	0.000	0.000	43	3.409	0.000	100.000	67	88.983	0.000	100.000				
20	0.150	0.000	0.000	44	3.908	0.000	100.000	68	101.460	0.000	100.000				
21	0.172	0.000	0.000	45	4.472	0.000	100.000	69	116.210	0.000	100.000				
22	0.197	0.000	0.000	46	5.122	0.000	100.000	70	133.103	0.000	100.000				
23	0.225	0.000	0.000	47	5.867	0.000	100.000	71	152.453	0.000	100.000				
24	0.259	0.000	0.000	48	6.720	0.000	100.000	72	174.616	0.000	100.000				

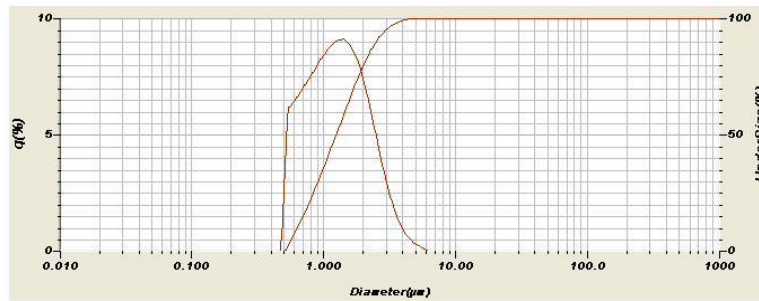
Lampiran 45.

Hasil analisa distribusi ukuran partikel formula E

2010.05.15 13:54:34

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

Sample Name	: Formula E	Median Size	: 1.25500(µm)
ID#	: 201005151305613	Mean Size	: 1.44196(µm)
Data Name	: 201005151305613	Std.Dev.	: 0.7800(µm)
Transmittance(R)	: 88.0(%)	Geo.Mean Size	: 1.2646(µm)
Transmittance(B)	: 85.0(%)	Geo.Std.Dev.	: 1.6621(µm)
Circulation Speed	: OFF	Mode Size	: 1.4089(µm)
Agitation Speed	: OFF	Span	: OFF
Ultra Sonic	: OFF	Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 (%) - 0.6327(µm)
Form of Distribution	: Auto		: (9)90.00 (%) - 2.5024(µm)
Distribution Base	: Number		
Refractive Index (R)	: Formula E[Mikroster 7,5.1(1.336 - 0.000),Ethanol(1.360)]		
Refractive Index (B)	: Formula E[Mikroster 7,5.1(1.336 - 0.000),Ethanol(1.360)]		
Material	: Mikroster E.1		
Source	: PTFM-Idah Rosidah		
Lot Number	: 1		
Test or Assay. Number	: Assay		



No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)
1	0.011	0.000	0.000	35	0.296	0.000	0.000	69	67.523	0.000	100.000	73	200.000	0.000	100.000
2	0.013	0.000	0.000	36	0.339	0.000	0.000	70	77.339	0.000	100.000	74	229.075	0.000	100.000
3	0.015	0.000	0.000	37	0.389	0.000	0.000	71	88.583	0.000	100.000	75	262.376	0.000	100.000
4	0.017	0.000	0.000	38	0.445	0.000	0.000	72	101.460	0.000	100.000	76	300.618	0.000	100.000
5	0.020	0.000	0.000	39	0.510	0.000	0.000	73	116.210	0.000	100.000	77	344.200	0.000	100.000
6	0.022	0.000	0.000	40	0.584	6.108	6.108	74	132.446	0.000	100.000	78	394.244	0.000	100.000
7	0.025	0.000	0.000	41	0.669	6.576	12.683	75	150.172	0.000	100.000	79	451.896	0.000	100.000
8	0.029	0.000	0.000	42	0.766	7.088	19.772	76	17.377	0.000	100.000	80	517.200	0.000	100.000
9	0.034	0.000	0.000	43	0.877	7.630	27.402	77	19.904	0.000	100.000	81	592.387	0.000	100.000
10	0.039	0.000	0.000	44	1.005	8.174	35.576	78	22.767	0.000	100.000	82	678.504	0.000	100.000
11	0.044	0.000	0.000	45	1.151	8.667	44.243	79	25.111	0.000	100.000	83	777.141	0.000	100.000
12	0.051	0.000	0.000	46	1.318	9.020	53.269	80	29.907	0.000	100.000	84	890.116	0.000	100.000
13	0.059	0.000	0.000	47	1.510	9.120	62.399	81	34.288	0.000	100.000	85	1000.000	0.000	100.000
14	0.067	0.000	0.000	48	1.729	8.845	71.244	82	39.234	0.000	100.000				
15	0.076	0.000	0.000	49	1.981	8.080	79.323	83	44.938	0.000	100.000				
16	0.087	0.000	0.000	50	2.269	6.846	86.170	84	51.471	0.000	100.000				
17	0.100	0.000	0.000	51	2.699	5.303	91.473	85	58.983	0.000	100.000				
18	0.115	0.000	0.000	52	2.976	3.714	95.187	86	67.523	0.000	100.000				
19	0.131	0.000	0.000	53	3.409	2.339	97.526	87	77.339	0.000	100.000				
20	0.150	0.000	0.000	54	3.905	1.325	98.851	88	88.583	0.000	100.000				
21	0.172	0.000	0.000	55	4.472	0.681	99.533	89	101.460	0.000	100.000				
22	0.197	0.000	0.000	56	5.122	0.323	99.856	90	116.210	0.000	100.000				
23	0.226	0.000	0.000	57	5.867	0.144	100.000	91	132.446	0.000	100.000				
24	0.259	0.000	0.000	58	6.730	0.000	100.000	92	150.172	0.000	100.000				

1 / 1

Lampiran 46.

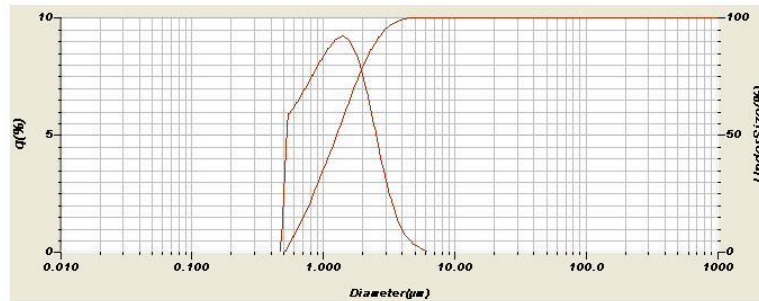
Hasil analisa distribusi ukuran partikel formula F

2010.05.15 13:56:19

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

Sample Name : Formula F
 ID# : 201005151323622
 Data Name : 201005151323622
 Transmittance(R) : 87.6(%)
 Transmittance(B) : 89.0(%)
 Circulation Speed : OFF
 Agitation Speed : OFF
 Ultra Sonic : OFF
 Form of Distribution : Auto
 Distribution Base : Number
 Refractive Index (R) : Formula F[Mikroser 10:1(1.336 - 0.000),Ethanol(1.360)]
 Refractive Index (B) : Formula F[Mikroser 10:1(1.336 - 0.000),Ethanol(1.360)]
 Material : Mikroser 10:1
 Source : PTFM-Idah Rosidah
 Lot Number : 1
 Test or Assay. Number : Assay

Median Size : 1.27323(µm)
 Mean Size : 1.45757(µm)
 Std.Dev. : 0.7837(µm)
 Geo.Mean Size : 1.2792(µm)
 Geo.Std.Dev. : 1.6611(µm)
 Mode Size : 1.4099(µm)
 Span : OFF
 Diameter on Cumulative % : (2)10.00 (%) - 0.6386(µm)
 (9)90.00 (%) - 2.5221(µm)



No.	Diameter(µm)	q(%)	Under Size(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	Under Size(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	Under Size(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	Under Size(%)
1	0.011	0.000	0.000	25	0.296	0.000	0.000	49	7.697	0.000	100.000	73	200.000	0.000	100.000
2	0.013	0.000	0.000	26	0.339	0.000	0.000	50	8.616	0.000	100.000	74	229.075	0.000	100.000
3	0.015	0.000	0.000	27	0.389	0.000	0.000	51	10.087	0.000	100.000	75	262.376	0.000	100.000
4	0.017	0.000	0.000	28	0.446	0.000	0.000	52	11.865	0.000	100.000	76	300.618	0.000	100.000
5	0.020	0.000	0.000	29	0.510	0.000	0.000	53	13.246	0.000	100.000	77	344.206	0.000	100.000
6	0.022	0.000	0.000	30	0.584	0.820	0.820	54	15.172	0.000	100.000	78	394.244	0.000	100.000
7	0.026	0.000	0.000	31	0.669	6.329	12.149	55	17.377	0.000	100.000	79	451.556	0.000	100.000
8	0.029	0.000	0.000	32	0.766	6.891	19.040	56	19.904	0.000	100.000	80	517.200	0.000	100.000
9	0.034	0.000	0.000	33	0.877	7.489	26.529	57	22.797	0.000	100.000	81	592.387	0.000	100.000
10	0.039	0.000	0.000	34	1.005	8.090	34.619	58	26.111	0.000	100.000	82	678.504	0.000	100.000
11	0.044	0.000	0.000	35	1.151	8.642	43.261	59	29.907	0.000	100.000	83	777.141	0.000	100.000
12	0.051	0.000	0.000	36	1.318	9.067	52.318	60	34.285	0.000	100.000	84	890.116	0.000	100.000
13	0.058	0.000	0.000	37	1.510	9.212	61.530	61	39.234	0.000	100.000	85	1000.000	0.000	100.000
14	0.067	0.000	0.000	38	1.729	8.971	70.501	62	44.938	0.000	100.000				
15	0.076	0.000	0.000	39	1.981	8.236	78.736	63	51.471	0.000	100.000				
16	0.087	0.000	0.000	40	2.269	7.010	85.746	64	58.963	0.000	100.000				
17	0.100	0.000	0.000	41	2.599	5.454	91.200	65	67.523	0.000	100.000				
18	0.115	0.000	0.000	42	2.976	3.834	95.034	66	77.339	0.000	100.000				
19	0.131	0.000	0.000	43	3.409	2.449	97.483	67	88.583	0.000	100.000				
20	0.150	0.000	0.000	44	3.905	1.370	98.823	68	101.460	0.000	100.000				
21	0.172	0.000	0.000	45	4.472	0.702	99.524	69	116.210	0.000	100.000				
22	0.197	0.000	0.000	46	5.122	0.330	99.854	70	133.103	0.000	100.000				
23	0.226	0.000	0.000	47	5.867	0.146	100.000	71	152.483	0.000	100.000				
24	0.259	0.000	0.000	48	6.720	0.000	100.000	72	174.616	0.000	100.000				

Lampiran 47

Hasil determinasi tumbuhan herba sambiloto



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
 (Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
 (Research Center for Biology)

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
 Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 13 Juli 2009

Nomor : 70/IPH.1.02/If.8/VII/2009
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Idah Rosidah
 NIM : 0806422082
 Mhs. Univ. Indonesia
 Fak. MIPA
 Depok


Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Tanaman Sambiloto	<i>Andrographis paniculata</i> Nees	Acanthaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,


 Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
 NIP. 195111041975011001

Lampiran 48.
Sertifikat analisis andrografolid

Certificate Of Analysis

Page 1 of 1



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

Product Name Andrographolide,
98%
Product Number 365645
Product Brand Aldrich
CAS Number 5508-58-7
Molecular Formula $C_{20}H_{30}O_5$
Molecular Weight 350.45

TEST

APPEARANCE
INFRARED SPECTRUM
OPTICAL ROTATION
THIN-LAYER
CHROMATOGRAPHY
SOLUBILITY
QUALITY CONTROL
ACCEPTANCE DATE

LOT 05101MC RESULTS

OFF WHITE POWDER
CONFORMS TO STRUCTURE.
-126 DEGREES (1.5% HOAC)
CONSISTENT WITH 98% PURITY

10MG/ML, CHCL3; CLEAR, COLORLESS SOLUTION
OCTOBER 2004

Barbara Rajzer, Supervisor
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin USA

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/CertOfAnalysisPage/365645?LotNo=05101...> 9/16/2008

Lampiran 49
Sertifikat analisis PVP K30

 **BASF**
The Chemical Company

Certificate of Analysis

BASF SE

Please note that the certificates of analysis are also conveniently available online and around the clock at www.worldaccount.basf.com

Fax No 0062215262493

P.T. BASF INDONESIA

Plaza Great River, 10th & 11th Floor

12950 Jakarta Selatan

Indonesia

2008-10-24

GKA/M320

Fr.Nina Dominique Kaeppl

+49 621 60-51484

Certificate No 2303

Page 1 of 4

Certificate of Analysis according to DIN 55350-18-4.2.2

Kollidon* 30
Origin Germany
0,5KG PE-Bottle
Purchase Order/Customer Product#
4511065561
50000780

Material 50000780
Order 3004892508 000080
Delivery 3086799058 000070
Lot 78489347G0
Lot/Qty 2.500 KG
Total 2.500 KG
Transport 0000000000108041258

Test Parameter	Requirements	UoM	Results
Identification	must conform		conforms
Appearance of solution	clear, not more intensely colored than reference solution BY6/B6/R7		conforms
pH-value	Min.: 3.0 Max.: 5.0		3.6
K-value	Min.: 27.0 Max.: 32.4		30.2
Aldehydes	Max.: 500	mg/kg	72
Peroxides	Max.: 400	mg/kg	27
Hydrazine	Max.: 1	mg/kg	<1
2-pyrrolidone (impurity B)	Min.: 1.00 Max.: 3.00	g/100g	1.38
Vinylpyrrolidone (impurity A)	Max.: 10	mg/kg	<2


PT. MEGASETIA AGUNG KIMIA
J A K A R T A

The aforementioned data shall constitute the agreed contractual quality of the product at the time of passing of risk. The data are controlled at regular intervals as part of our assurance program. Neither these data nor the properties of product specimens shall imply any legally binding guarantee of certain properties or of fitness for a specific purpose. No liability of ours can be derived therefrom.

Lampiran 50.
Sertifikat analisis HPMC

Shin-Etsu

2008/05/29 (1/1)

Certificate of Analysis

Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.
Naoetsu Plant Quality Assurance Department
28-1, Nishifukushima, Kubiki-ku,
Joetsu-shi, Niigata, Japan

Product Name PHARMACOAT
(Hyromellose, USP)
Grade 603
Substitution Type 2910
Viscosity Type 3 mPa·s
Lot Number 8028206
Quantity 1kg
Manufacture Date 2008/02/04
Recommended Re-Evaluation Date * 2011/02/03
Analysis Date 2008/02/27
Issue No. D5120080502946002-1-01

Remark

This product complies with the specifications described in the current USP.
This product is manufactured in accordance with GMP.

* Shin-Etsu Chemical recommends that the customer's quality control unit may re-evaluate the quality of this material on its own responsibility prior to use after the Recommended Re-Evaluation date.
Storage Conditions: Store containers sealed and in a dry place. Keep away from heat or sunlight.

Test Item	Unit	Test Result	Specification
Appearance		White to Slightly Off-White Powder	
Identification A		Conforms	Conforms
Identification B		Conforms	Conforms
Identification C		Conforms	Conforms
Identification D		Conforms	Conforms
Identification E		Conforms	Conforms
pH		6.4	5.0 - 8.0
Viscosity	mPa·s	2.91	2.4 - 3.6
Loss on Drying	%	1.4	5.0 Max.
Residue on Ignition	%	0.50	1.5 Max.
Heavy Metals	ppm	Not more than 20	Not more than 20
Methoxy Content	%	29.0	28.0 - 30.0
Hydroxypropoxy Content	%	8.9	7.0 - 12.0
Residual Solvents (OVI)		Conforms	Conforms

K. Araume

KIYOSHI ARAUME
General Manager, Q. A. Dept.

Shin-Etsu No. : 18048801-03-01

Issue:
Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.
Cellulose Department
6-1, Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan
TEL 81-3-3246-5261 FAX 81-3-3246-5372

Judgment:
Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.
Naoetsu Plant Quality Assurance Department
28-1, Nishifukushima, Kubiki-ku,
Joetsu-shi, Niigata, Japan

Recycled Paper