

VOLUME PENOTOLAN MEMPENGARUHI *FINGERPRINT* EKSTRAK METANOL HERBA SAMBILOTO (*ANDROGRAPHIS PANICULATA* (BURM. F.) NEES) DENGAN KLT-SPEKTROFOTODENSITOMETRI

Putu Yudha Ugrasena¹, Dyah Ratna Ayu Puspita Sari², Ni Wayan Rika Kumara Dewi³

¹Program Studi Sarjana Farmasi Klinis Komunitas, Institut Teknologi dan Kesehatan Bintang Persada, Denpasar, Bali

²Program Studi Diploma Farmasi, Institut Teknologi dan Kesehatan Bintang Persada, Denpasar, Bali

³Program Studi Sarjana Farmasi Klinis Komunitas, Institut Teknologi dan Kesehatan Bintang Persada, Denpasar, Bali

e-mail: ugrasenayudha@gmail.com

Received : Februari, 2023

Accepted : Maret, 2023

Published : April, 2023

Abstract

*Spotting volume is an important factor affecting the resolution value of the chromatogram, the number of peaks and separation, peak profile and peak broadening, as well as the asymmetry of the peaks. This study aims to determine the effect of bottling volume on fingerprint chromatography of the methanol extract of *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees herb and to determine fingerprint chromatography at optimum volume. The chromatographic system used refers to the Indonesian Herbal Pharmacopoeia. Sambiloto herbal samples were spotted with a variety of 3 μ L bottling volumes; 5 μ L; 10 μ L; 15 μ L; 20 μ L and 25 μ L on a 60 GF254 silica gel plate were then eluted with a mixture of chloroform P and methanol P (9:1) v/v. The plates were scanned with a TLC Scanner 3 (CAMAG) at a wavelength of 210 nm. Spectra were made for each spot at a wavelength of 190-400 nm. Parameters that were calculated were resolution values, tailing factor from andrographolid peaks, and cosine functions (C) from volume variation chromatograms to determine the effect of spotting volume. The bottling volume selected from the optimization step was 5 μ L with andrographolid peak resolution with the previous and following peaks being 1.57 and 1.16, respectively. The tailing factor value was 1 and the number of peaks that appeared was 10. The average value of C in the 5 μ L bottling volume precision test was 99.36 with a CV of 1.17% (KV <2%)*

Keywords: *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees, fingerprint Chromatography, cosine function.

Abstrak

*Volume penotolan merupakan faktor penting yang mempengaruhi nilai resolusi dari kromatogram, jumlah puncak dan keterpisahan, profil puncak dan pelebaran puncak, serta puncak-puncak asimetri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh volume penotolan terhadap kromatografi fingerprint ekstrak metanol herba *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees dan mengetahui kromatografi fingerprint pada volume optimum Sistem kromatografi yang digunakan mengacu pada Farmakope Herbal Indonesia. Sampel herba sambiloto ditotolkan dengan variasi volume penotolan 3 μ L; 5 μ L; 10 μ L; 15 μ L; 20 μ L dan 25 μ L pada plat silika gel 60 GF₂₅₄ kemudian dielusi dengan campuran pelarut Kloroform P dan Metanol P (9:1) v/v. Plat dipindai dengan TLC Scanner 3 (CAMAG) pada panjang gelombang 210 nm. Tiap bercak dibuat spektrumnya pada panjang gelombang 190-400 nm. Parameter*

yang dihitung nilai resolusi, tailing factor dari puncak andrografolid dan fungsi kosinus (C) dari kromatogram variasi volume untuk mengetahui pengaruh volume penotolan. Volume penotolan yang dipilih dari tahap optimasi adalah 5 μ L dengan resolusi puncak andrografolid dengan puncak sebelumnya dan setelahnya berturut-turut adalah 1,57 dan 1,16. Nilai tailing factor sebesar 1 serta jumlah puncak yang muncul sebanyak 10. Nilai rata-rata C pada uji presisi volume penotolan 5 μ L 99,36 dengan KV 1,17 % (KV < 2%).

Kata Kunci: *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees), kromatografi fingerprint, fungsi kosinus

1. PENDAHULUAN

Sambiloto atau *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees merupakan salah satu tanaman suku Acanthaceae. Secara kimia sambiloto mengandung flavonoid, triterpen, tannin, diterpen, stigmasterol, alkane, keton, aldehid, mineral (kalsium, natrium, kalium) (Marangyana et al., 2022; Ugrasena et al., 2023). Komponen utamanya adalah andrografolid yang merupakan senyawa diterpen lakton (Marangyana & Ugrasena, 2017; Priyani, 2020). Andrografolid merupakan komponen mayor dan utama dari sambiloto yang telah dilaporkan memiliki beragam efek farmakologi seperti antipiretik, antiinflamasi, antihipertensi, antidiabetes, imunomodulator, hepatoprotektif, antikanker, antioksidan (Adiguna et al., 2021, 2023; Mussard et al., 2019; Tajidin et al., 2019; Ugrasena et al., 2023). Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa herba sambiloto memiliki manfaat yang sangat penting bagi kesehatan sehingga sangat berpotensi untuk digunakan sebagai obat herbal. Salah satu standarisasi yang di syaratkan oleh WHO untuk produk herbal yaitu kromatografi *fingerprint* (Huang et al., 2016; Li et al., 2020; Marangyana et al., 2022).

KLT-Spektrofotodensitometri merupakan pilihan yang paling tepat digunakan untuk mengetahui kromatogram *fingerprint* dari suatu produk herbal. KLT memiliki keuntungan dari segi biaya rendah, kemudahan pemeliharaan, dan selektivitas deteksi baik. Selain itu, KLT dapat menganalisis beberapa sampel secara paralel dalam sekali proses. KLT juga difasilitasi untuk melakukan pengulangan deteksi (*scanning*) dari kromatogram dengan parameter sama atau berbeda. KLT dipilih karena sistem pemisahan ini memungkinkan evaluasi secara simultan antara standar dan sampel, sehingga cocok dengan kondisi dan lingkungan kerja, dan mengurangi kesalahan sistematis (Attia et al., 2017; Pyka-Pajak et al., 2018).

Pemisahan pada KLT yang optimal akan diperoleh jika menotolkan sampel dengan volume penotolan yang tidak menyebabkan noda penotolan yang lebar sehingga tidak menurunkan nilai resolusi, dan volume penotolan yang tepat dapat mencegah terjadinya puncak asimetris akibat fase gerak yang tidak mampu membawa analit dengan volume besar sehingga terjadi *tailing* (Archana, B. & Anubha, 2011; Wall, 2005). Volume penotolan sampel harus dioptimasi dengan baik dan memberi keterulangan karena kualitas pemisahan tergantung pada ukuran, bentuk, dan homogenitas pada zona aplikasi atau zona penotolan. Ketangguhan metode kromatografi dilihat salah satunya dari koefisien variasi yang minimal dari nilai Rf, resolusi kromatogram, *tailing factor* (Mandour et al., 2023). Penelitian Boulgakov et al. (2020) menyebutkan bahwa Jumlah sampel yang ditotolkan dan penyebaran bercak dapat mempengaruhi resolusi. Maka dalam penelitian ini dilakukan optimasi volume penotolan terhadap kromatografi *fingerprint* ekstrak metanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees) dengan metode KLT-spektrofotodensitometri.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Digunakan alat-alat gelas pipet ukur (IWAKI Pyrex), labu ukur (IWAKI Pyrex), gelas *beaker* (IWAKI Pyrex) dan vial. Selain itu, juga digunakan *blender*, timbangan analitik (AND), *ballfiller*, pipet tetes, sendok tanduk, oven (Mommert), sonikator, alat sentrifugasi dan tabungnya (PLC *series*), penotol Linomat V, chamber, spektrofotometer UV dan densitometer CAMAG TLC Scanner 3 "Scanner3_130708" S/N 130708. Bahan kimia yang digunakan adalah pelarut dan bahan kimia analisis perkuualitas pro analisis metanol sebagai pelarut; metanol dan kloroform P sebagai fase gerak; isolat andrografolid sebagai standar andrografolid dengan kemurnian 89,07 % serta fase diam yang digunakan adalah plat KLT silika

gel 60 F₂₅₄ (Merck-Germany). Herba sambiloto dari daerah Bandung, Jawa Barat.

2.2 Metode Penelitian

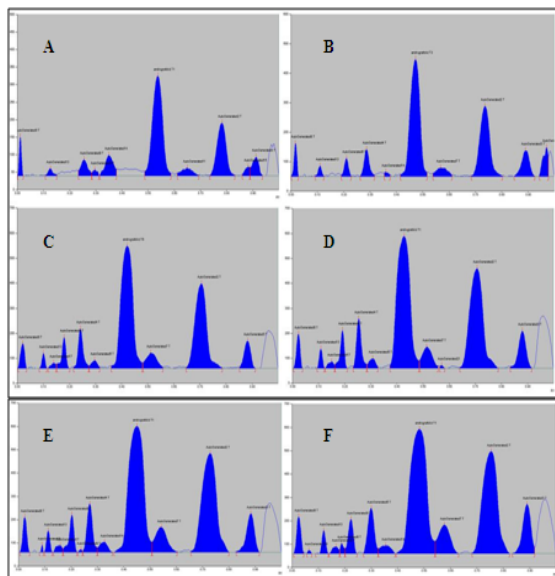
Serbuk herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees) sebanyak 200 mg dilarutkan dalam 2 mL metanol dengan bantuan sonikasi selama 5 menit pada suhu 60°C. Larutan disaring untuk menghilangkan ampasnya. Filtrat yang dihasilkan diukur volumenya kemudian ditampung dalam vial.

Plat KLT dicuci dengan metanol, diaktivasi pada suhu 110° C selama 30 menit. Ditotolkan masing-masing larutan uji sebanyak 3 µL; 5 µL; 10 µL; 15 µL; 20 µL dan 25 µL pada plat menggunakan Linomat V. Plat dielusi dalam chamber dengan fase gerak campuran kloroform:metanol dengan perbandingan 9:1v/v sebanyak 10 mL. Plat dipindai dengan spektrofotodensitometer TLC Scanner 3 pada panjang gelombang 210 nm dan rentang 190-400 nm.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Hasil

Kromatogram ekstrak metanol herba sambiloto dengan variasi volume penotolan 3 µL; 5 µL; 10 µL; 15 µL; 20 µL dan 25 µL dapat dilihat pada gambar 1.



Ket: A. 3 µL; B. 5 µL; C. 10 µL; D. 15 µL; E. 20 µL; F. 25 µL

Gambar 1. Kromatogram *fingerprint* ekstrak metanol herba sambiloto dengan variasi volume penotolan

Resolusi dan *tailing factor* puncak andrografolid ditentukan untuk menentukan

Pada kromatogram gambar 1. terlihat jumlah puncak yang berbeda pada setiap variasi volume penotolan 3 µL; 5 µL; 10 µL; 15 µL; 20 µL dan 25 µL. Nilai fungsi kosinus dari setiap volume dihitung untuk mengetahui kesamaan kromatogram. Fungsi kosinus dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Fungsi kosinus (C) variasi volume

C	3µL	5µL	10 µL	15 µL	20 µL	25 µL	KV (%)
3 µL	100	95,9 1	93,9 2	92,5 4	92,0 7	92,0 1	2,6 6
5µL		100	97,0 5	96,2 0	95,8 5	95,9 3	
10µL			100	99,8 6	97,4 0	97,1 8	
15µL				100	97,2 8	97,0 9	
20µL					100	99,8 7	
25µL						100	

Tabel 1. Menunjukkan hubungan kesamaan kromatogram berdasarkan nilai C dari kromatogram volume 3 µL; 5 µL; 10 µL; 15 µL; 20 µL dan 25 µL. Perbedaan nilai fungsi kosinus menandakan adanya perbedaan dari nilai AUC dan puncak yang muncul dari tiap volume penotolan. Adanya pengaruh dari volume penotolan diperkuat dengan koefisien variasi nilai C sebesar 2,66 % (KV < 2%) (Harmita, 2004).

Tabel 2. Resolusi dan *tailing factor* puncak andrografolid

Volume (µL)	z	y	Rx-z	Rx-y	Tailing Factor
3	0,35	0,65	2,37	1,22	0,875
5	0,34	0,56	1,57	1,16	1
10	0,28	0,50	1,62	0,94	1
15	0,29	0,50	1,62	0,76	0,9
20	0,33	0,54	1,14	0,75	1
25	0,35	0,58	1,12	0,83	1

Ket :

z : puncak sebelum andrografolid

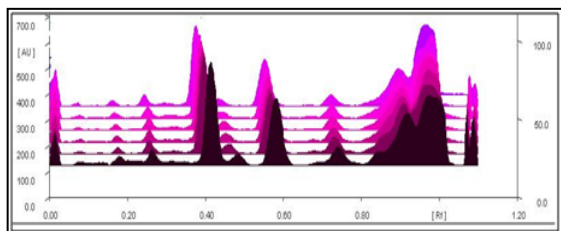
y : puncak setelah andrografolid

Rx-z : resolusi andrografolid dengan puncak sebelumnya

Rx-y : resolusi andrografolid dengan puncak setelahnya

volume optimum yang digunakan untuk memperoleh kromatografi *fingerprint*

sambiloto. Volume 5 μL dipilih dengan Rx-z 1,57 dan Rx-y 1,16 (resolusi ≥ 1) serta nilai *tailing factor* 1 (*tf* 0,9-1,4) (Boulgakov et al., 2020; Mandour et al., 2023)



Gambar 2. Presisi volume penotolan optimum 5 μL

Uji presisi dilakukan dengan pengulangan 6 kali penotolan volume optimum 5 μL . Diperoleh presisi nilai C antar kromatogram sebesar 1,17 % dengan rata-rata nilai C adalah 99,36.

3.2 Pembahasan

Pada kromatogram dengan variasi volume penotolan 3 μL , 5 μL , 10 μL , 15 μL , 20 μL dan 25 μL terlihat jumlah puncak yang berbeda pada setiap variasi volume penotolan. Perbedaan jumlah puncak dan intensitas puncak dikarenakan berbedanya konsentrasi senyawa metabolit sekunder akibat dari variasi volume penotolan. Volume aplikasi sampel, teknik aplikasi, ukuran spot yang dilakukan sebelum pengembangan kromatografi adalah beberapa faktor penting yang mempengaruhi kromatogram (Boulgakov et al., 2020; Sjursnes et al., 2015). Gambar 1 memperlihatkan perbedaan jumlah puncak yang mempengaruhi profil kromatografi *fingerprint* akibat dari variasi volume aplikasi sampel. Nilai fungsi kosinus 100 menandakan adanya kesamaan profil kromatogram. Nilai C_{95} (Nilai kosinus ≥ 95) dihitung dengan menggunakan tingkat kesalahan sebesar 5%. Nilai C_{95} merupakan batas minimal nilai korelasi kosinus, dimana nilai C_{95} yang mendekati 100 menyatakan bahwa profil kromatogram identik. Perbedaan nilai fungsi kosinus menandakan adanya perbedaan dari nilai AUC dan puncak yang muncul dari tiap volume penotolan. Nilai koefisien variasi (KV) sebesar 2,66 % (KV < 2%) (Li et al., 2020; Mandour et al., 2023; Sjursnes et al., 2015). Dari hasil tersebut maka terdapat variasi dari kromatogram yang dihasilkan dengan volume penotolan berbeda. Variasi volume penotolan menyebabkan adanya perbedaan konsentrasi metabolit sekunder sehingga berpengaruh terhadap kemunculan puncak pada kromatogram. volume penotolan

optimum ditentukan berdasarkan nilai resolusi dan *tailing factor* dari puncak mayor yaitu andrografolid dan yang memenuhi persyaratan tersebut adalah volume 5 μL dengan nilai Rx-z 1,57; Rx-y 1,16; dan *tailing factor* 1 sesuai tabel 2. Penilaian presisi volume penotolan 5 μL dilakukan untuk melihat keterulangan dari kromatogram yang didapat dengan menotolkan ekstrak metanol herba sambiloto. Nilai rata-rata fungsi kosinus pada volume penotolan 5 μL adalah 99,36 yang menandakan kesamaan pola kromatogram dengan koefisien variasi (KV) 1,17 % (KV < 2%) yang menandakan memiliki keterulangan dan kesamaan dari kromatogram *fingerprint* dengan volume optimum 5 μL .

4. KESIMPULAN

Volume penotolan memberikan pengaruh terhadap kromatografi *fingerprint* dari ekstrak metanol herba *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees hal ini ditunjukkan dari adanya variasi dari jumlah puncak yang muncul, resolusi, *tailing factor* dan perbedaan nilai fungsi kosinus yang dinyatakan dalam koefisien variasi fungsi kosinus. Volume penotolan terbaik pada volume 5 μL dengan hasil berupa jumlah puncak yang terbentuk 10 puncak, nilai resolusi biomarker yaitu andrografolid terhadap puncak setelahnya adalah 1,16 dan resolusi andrografolid dengan puncak sebelumnya adalah 1,57 serta nilai *tailing factor* andrografolid adalah 1. Dilengkapi dengan fungsi kosinus mendekati 100 yaitu C 99,38 dengan koefisien variasi kesamaan kromatogram 1,17 % (KV < 2%).

DAFTAR PUSTAKA

- Adiguna, S. P., Panggabean, J. A., Atikana, A., Untari, F., Izzati, F., Bayu, A., Rosyidah, A., Rahmawati, S. I., & Putra, M. Y. (2021). Antiviral activities of andrographolide and its derivatives: Mechanism of action and delivery system. *Pharmaceuticals*, *14*(11), 1–20.
<https://doi.org/10.3390/ph14111102>
- Adiguna, S. P., Panggabean, J. A., Swasono, R. T., Rahmawati, S. I., Izzati, F., Bayu, A., Putra, M. Y., Formisano, C., & Giuseppina, C. (2023). Evaluations of Andrographolide-Rich Fractions of *Andrographis paniculata* with Enhanced Potential Antioxidant, Anticancer, Antihypertensive, and Anti-Inflammatory Activities. *Plants*, *12*(6).

- <https://doi.org/10.3390/plants12061220>
 Archana, B., A., & Anubha, K. (2011). an Overview on Thin Layer Chromatography | International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, March, 256–267.
- Attia, K. A.-S. M., Abdel-Aziz, O., Magdy, N., & Mohamed, G. F. (2017). TLC-densitometric and first derivative spectrophotometric methods for determination of cefoxitin-sodium in presence of its alkali-induced degradation product. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 55(2), 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2017.09.004>
- Boulgakov, A. A., Sarah Moor, Jo, H. H., Metola, P., Joyce, L. A., Marcotte, E. M., Welch, C. J., & Anslyn, E. V. (2020). Next-Generation TLC: A Quantitative Platform for Parallel Spotting and Imaging. *J Org Chem*, 85(15), 9447–9453. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c00349>. Next-Generation
- Huang, Y., Wu, Z., Su, R., Ruan, G., Du, F., & Li, G. (2016). Current application of chemometrics in traditional Chinese herbal medicine research. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1026, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.050>
- Li, Y., Shen, Y., Yao, C., & Guo, D. (2020). Quality assessment of herbal medicines based on chemical fingerprints combined with chemometrics approach: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 185, 113215. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113215>
- Mandour, A. A., Nabil, N., Zaazaa, H. E., Ibrahim, M. M., & Ibrahim, M. A. (2023). Two Stability Indicating Chromatographic Methods: TLC Densitometric versus HPLC Method for the Simultaneous Determination of Brinzolamide and Timolol Maleate in Ophthalmic Formulation in the Presence of Probable Carcinogenic Oxidative Degradation Product of Timolol Maleate. *Separations*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/separations10010037>
- Marangyana, I. G. B. I., & Ugrasena, P. Y. (2017). POTENSI INTERAKSI FARMAKOKINETIKA *Andrographis paniculata* (Ness) DENGAN OBAT ANTI INFLAMASI NON STEROID. *Acta Holist. Pharm.*, 2(2), 21–27.
- Marangyana, I. G. B. I., Ugrasena, P. Y., & Monika, N. L. G. M. (2022). Analisis Multi Linear Regression (MLR) pada Fingerprint Kromatografi Andrografolid untuk Memprediksi Efek Anti Kanker. *Jurnal Mandala Pharmacoon Indonesia*, 8(1), 67–80. <https://doi.org/10.35311/jmpi.v8i1.169>
- Mussard, E., Cesaro, A., Lespessailles, E., Legrain, B., Berteina-Raboin, S., & Toumi, H. (2019). Andrographolide, a natural antioxidant: An update. *Antioxidants*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/antiox8120571>
- Priyani. (2020). REVIEW : MANFAAT TANAMAN SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Ness) TERHADAP SISTEM IMUN TUBUH. *Jurnal Ilmu Kedokteran Dan Kesehatan*, 7(3), 484–490.
- Pyka-Pająk, A., Dołowy, M., Parys, W., Bober, K., & Janikowska, G. (2018). A simple and cost-effective TLC-densitometric method for the quantitative determination of acetylsalicylic acid and ascorbic acid in combined effervescent tablets. *Molecules*, 23(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules23123115>
- Sjursnes, B. J., Kvittingen, L., & Schmid, R. (2015). Normal and reversed-phase thin layer chromatography of green leaf extracts. *Journal of Chemical Education*, 92(1), 193–196. <https://doi.org/10.1021/ed400519v>
- Tajidin, N. E., Shaari, K., Maulidiani, M., Salleh, N. S., Ketaren, B. R., & Mohamad, M. (2019). Metabolite profiling of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. young and mature leaves at different harvest ages using 1H NMR-based metabolomics approach. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52905-z>
- Ugrasena, P. Y., Nugraha, I. S., & Dewi, N. W. R. K. (2023). Andrografolid : Potensi Sebagai Antiaterosklerosis Pada Sitokin Il-1β. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*, 12(1), 159–170.