

LAPORAN PENELITIAN  
PROGRAM INSENTIF RISET TERAPAN  
TAHUN KE 3

Pengembangan Campuran Sambiloto  
(*Andrographis paniculata* Nees) dan Kunyit (*Curcuma  
domestica*) sebagai Sediaan Fitofarmaka Antikanker  
Payudara.

Peneliti Utama : Prof. Dr.Sukardiman,Apt,MS  
NIP : 131 801 629

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada  
Masyarakat  
Universitas Airlangga  
Kampus C Mulyorejo Surabaya , Telp 5995246,  
Fax 5962066  
Nopember , 2009



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

LAPORAN PENELITIAN  
PROGRAM INSENTIF RISET TERAPAN  
TAHUN KE 3

KKB  
KK-2  
LP215/10  
Suk  
P

Pengembangan Campuran Sambiloto  
(*Andrographis paniculata* Nees) dan Kunyit (*Curcuma  
domestica*) sebagai Sediaan Fitofarmaka Antikanker  
Payudara.

Peneliti Utama : Prof. Dr.Sukardiman,Apt,MS  
NIP : 131 801 629

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada  
Masyarakat  
Universitas Airlangga  
Kampus C Mulyorejo Surabaya , Telp 5995246,  
Fax 5962066  
Nopember , 2009

LEMBAR PENGESAHAN


Judul Kegiatan / Riset :  
**Pengembangan Campuran Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan  
Kunyit (*Curcuma domestica*) sebagai Sediaan Fitofarmaka Antikanker  
Payudara.**

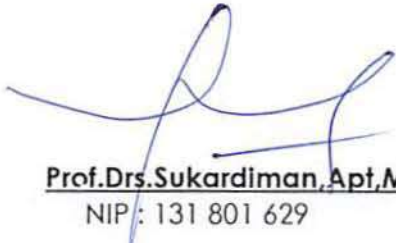
Program : Riset Terapan  
Bidang : Teknologi Kesehatan dan Obat-Obatan  
Peneliti Utama : **Prof. Dr.Sukardiman,Apt,MS**  
Jenis Kelamin : Laki-Laki  
Lama Kegiatan/Riset : 3 tahun  
Tahun mulai : 2007  
Total Biaya : 760.178.000,-  
Tahun III ( 2009) : Rp. 275.000.000

Surabaya, 5 November 2009

Mengetahui  
Dekan Fakultas Farmasi  
Universitas Airlangga


Peneliti Utama

  
**Prof. Dr. H. Achmad Syahrani, Apt, MS**  
NIP : 130 809 077

  
**Prof. Drs. Sukardiman, Apt, MS**  
NIP : 131 801 629

Mengetahui  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat  
Universitas Airlangga



  
**Prof. Dr. Bambang Sektiari L., DEA, drh**  
NIP : 131 837 004

## KATA PENGANTAR

Pertama-tama kami panjatkan puji dan puja syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa , yang telah memberikan taufik dan hidayahNya sehingga kami tim peneliti dapat menyelesaikan penelitian tahun pertama dengan judul :

**Pengembangan Campuran Samblloto  
(*Andrographis paniculata* Nees) dan Kunyit (*Curcuma domestica*) sebagai  
Sediaan Fitofarmaka Antikanker Payudara.**

Pada kesempatan ini kami sampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Kementrian Negara Riset dan Teknologi RI dan Lembaga Penelitian Indonesia yang telah memberikan dana penelitian .
2. Rektor Universitas Airlangga Surabaya.
3. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya.
4. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.
5. Semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

Kami menyadari bahwa hasil laporan penelitian ini tentunya masih belum sempurna , namun demikian kami berharap dapat bermanfaat bagi para pembaca. Hal ini sebagai upaya pendayagunaan biodiversitas alam hayati Indonesia khususnya untuk pencarian bahan bioaktif tanaman yang berkhasiat antikanker.

Surabaya, 7 November 2009

**Tim Peneliti**

Prof. Dr Sukardiman,Apt,MS  
Prof.Sismindari, Apt,SU,PhD  
Dr.Aty Widyawaruyanti,Apt,MS  
Sujarwo, Teknisi  
Lismo, Teknisi  
Mafud Afandi, Teknisi

**Pengembangan Campuran Sambiloto  
(*Andrographis paniculata* Nees) dan Kunyit (*Curcuma domestica*) sebagai  
Sediaan Fitofarmaka Antikanker Payudara**

**Sukardiman, Aty Widyawaruyanti , Sisindari  
Fakultas Farmasi  
Universitas Airlangga Surabaya**

**ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah membuat produk fitofarmaka campuran ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) sebagai obat antikanker payudara. Tujuan khusus penelitian tahun ke 3 adalah mengetahui mutu fisik, keseragaman kandungan dan disolusi sediaan kapsul campuran ekstrak sambiloto dan kunyit serta menentukan bioavailabilitas kapsul campuran ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dan rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) dalam serum kelinci.

Penentuan uji mutu fisik, keseragaman kandungan dan disolusi dari kapsul dilakukan lebih dahulu validasi metode pada HPLC, fase gerak untuk andrografolida adalah metanol : air 60:40 dan panjang gelombang 230nm, sedangkan untuk kurkumin digunakan asetonitril : asam asetat 1% 50:50 dengan panjang gelombang 425nm. Kapsul yang dibuat adalah campuran ekstrak sambiloto yang setara dengan 15mg andrografolida dan ekstrak kunyit yang setara dengan kurkumin 15 mg, kemudian diperiksa mutu fisik, keseragaman kandungan dan disolusinya. Penelitian bioavailabilitas kapsul dilakukan terhadap 3 ekor kelinci jantan, ras New Zealand yang berumur 4 bulan. Setiap ekor kelinci diberi kapsul yang mengandung ekstrak sambiloto setara dengan 6,3 mg andrografolida dan ekstrak kunyit yang setara dengan 6,3 mg kurkumin, langsung ke dalam lambung kelinci melalui *feeding tube* dan dicuci dengan aquades 5 ml. Sampel darah diambil melalui vena marginal telinga pada interval waktu ke 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 480 menit setelah pemberian obat dan dilakukan preparasi sampel kemudian disuntikkan ke HPLC.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa keseragaman bobot kapsul, rata-rata persen penyimpangan bobot isi kapsul adalah  $1,29\% \pm 0,88$ . Hasil rata-rata pengujian waktu hancur untuk kapsul campuran ekstrak sambiloto kunyit adalah  $483,33 \pm 16,26$  detik atau 8 menit lebih 3 detik. Keseragaman kandungan rata-rata andrografolida 96,79% dan KV 4,97% dan rerata kandungan kurkumin 103,27% dan KV yaitu 3,80%. Hasil disolusi menunjukkan bahwa pada menit ke 180, pelepasan andrografolida tergolong cukup kecil yaitu  $11,34 \text{ mg/L} \pm 0,61$  dengan persen andrografolida terlarut yaitu  $34,50\% \pm 1,86$  serta efisiensi disolusi andrografolida adalah  $17,53\% \pm 0,63$ . Sedangkan pada pelepasan kurkumin sampai menit ke 180 tidak ada puncak yang dapat dideteksi, sehingga kelarutan kurkumin tidak bisa ditentukan. Parameter bioavailabilitas yang diperoleh untuk andrografolida, yaitu  $t_{maks} = 60-90$  menit,  $C_{maks} = 3,060 - 4,410$  ppm,  $AUC_{0-480} = 541,0575 - 684,8413$   $\mu\text{g.ml/menit}$ . Parameter bioavailabilitas untuk kurkumin tidak dapat dihitung karena kurkumin tidak terdeteksi dalam darah.

**Key words :** *Andrographis paniculata* Nees, *Curcuma domestica* Val, disolusi, bioavailabilitas

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
ABSTRACT.....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	8
BAB III BAHAN DAN METODE PENELITIAN .....	43
BAB IV HASIL PENELITIAN.....	61
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	107
BAB VI DAFTAR PUSTAKA.....	108

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Masalah

Di samping penyakit jantung , kanker adalah penyebab kematian utama di Amerika Serikat yang menyebabkan lebih dari 500.000 kematian pertahun. Sedangkan insiden kanker di Indonesia diperkirakan 100 per 100.000 pertahun atau sekitar 200.000 penduduk pertahun. Pada survey kesehatan rumah tangga yang diselenggarakan Badan Litbangkes , Departemen Kesehatan ditemukan bahwa 1,4 % dari seluruh kematian disebabkan oleh kanker. Angka ini meningkat menjadi 3,4% pada tahun 1980 dan menjadi 4,3% pada tahun 1986 (Katzung, 1995 ; Dalimartha, 2002).

Kanker adalah adalah suatu penyakit di mana terjadi pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal , cepat dan tidak terkendali. Sel-sel kanker akan terus membelah diri terlepas dari pengendalian pertumbuhan . Bila pertumbuhan ini tidak cepat dihentikan dan diobati maka sel kanker akan tumbuh menyusup ke jaringan lain sekitarnya (invasif) dan menyebar (metastatis) ketempat yang lebih jauh melalui pembuluh darah atau pembuluh getah bening , selanjutnya akan tumbuh kanker baru ditempat lain dan akhirnya menyebabkan kematian penderita ( Katzung, 1995 ; Dalimartha, 2002).

Dewasa ini WHO menyatakan bahwa sepertiga dari seluruh kejadian kanker dapat dicegah , seperti tiga dapat dibebaskan rasa nyerinya dan sepertiga lainnya dapat disembuhkan dengan cara pembedahan , radiasi atau dengan pemberian obat kemoterapi. Dan pada waktu sekarang kira-kira 50% penderita kanker dapat disembuhkan dengan kontribusi kemoterapi atau sebesar 17 % dari total kejadian kanker ( Katzung, 1995).



Obat kemoterapi atau obat antikanker yang ideal seharusnya dapat selektif membunuh sel kanker saja tanpa mempengaruhi atau membahayakan jaringan normal, sehingga tidak menyebabkan efek samping terhadap pemakainya. Sampai sekarang belum dapat ditemukan obat antikanker yang memenuhi kriteria tersebut diatas, disamping itu dilaporkan adanya beberapa jenis kanker yang resisten terhadap obat-obat kemoterapi. Sehingga dewasa ini telah dilakukan usaha – usaha penelitian terhadap pencarian bahan obat antikanker yang lebih selektif yaitu melalui penapisan ataupun isolasi bahan obat dari tanaman, desain rasional senyawa obat baru ataupun penggunaan terapi gen ( Katzung, 1995).

Program nasional dalam usaha mencari penemuan obat baru dari sumber atau bahan alam sekarang ini adalah dengan menggunakan paradigma baru. Paradigma baru dalam riset penemuan obat tersebut adalah dengan menggabungkan dua kekuatan sumber daya raksasa yang ada yaitu sumber alam hayati Indonesia dengan hasil-hasil riset dunia mengenai genom manusia dan genom lainnya . Dan akhirnya akan diperoleh *lead compound* (senyawa penuntun) untuk dikembangkan menjadi obat baru (Sudoyo,1997 ; Setiawan, 1997 ; Fauth,1997, Marzuki, 1998).

Dalam teknologi *High Throughput Screening* (HTS) dimulai dari skrining terhadap ekstrak-ekstrak tanaman Indonesia sebagai *chemical library* dengan menggunakan berbagai metode penapisan. Dalam proses penemuan obat melalui HTS dilakukan penapisan tahap kedua dalam bentuk penapisan tingkat fraksi dari ekstrak, dan dilanjutkan dengan isolasi dan identifikasi dari senyawa bioaktif dan uji farmakologi ( Sudoyo,1997 ; Setiawan, 1997 ; Fauth,1997, Marzuki, 1998).

Upaya pencarian dan penemuan senyawa bioaktif dari tanaman obat Indonesia yang memiliki aktivitas antikanker secara *in vitro* terhadap kultur sel kanker payudara manusia yaitu senyawa kurkumin dari rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) telah dilakukan penellian terhadap efek

antikanker secara invitro kultur sel line MCF-7 atau *human breast cancer*, di mana hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa senyawa kurkumin menunjukkan efek antikanker terhadap kultur sel kanker payudara manusia dengan meknisme hambatannya dengan menghambat perkembangan kanker melalui modulasi aktivitas COX (cyclooxygenase ) ( Zang *et al*, 1999 ; Mehta, *et al*, 1997; Aggrawal *et al*,2004), dan juga senyawa kurkumin menunjukkan aktivitas antikanker secara *in vivo* pada model hewan yang ditransplantasikan kanker payudara (Aggrawal *et al*, 2004).

Senyawa andrografolida dari *sambiloto (Andrographis paniculata* Nees) juga menunjukkan aktivitas antikanker secara *in vitro* terhadap sel kanker leukemia, mieloma , HeLa dan kultur sel kanker payudara manusia ( *human breast cancer cell line* ) , se kolon HT-29 (Matsuda,1994 Ganguly *et al*, 2000 ; Sukardiman, 2003 ; Kumar,2004 Satyanarayana *et al*, 2005). Andrografolida juga memiliki aktivitas antikanker secara *in vivo* pada kanker fibrosarcoma mencit hasil induksi dengan benzopirena dimana dosis 20 mg/kg BB memiliki aktivitas persen hambatan 34 % , dosis 40 mg/kg BB aktivitas hambatan sebesar 45 % sedangkan pada dosis 80 mg/kgBB memiliki aktivitas hambatan sebesar 62% (Sukardiman, 2005) dan juga andrografolida juga menghambat pertumbuhan sel kanker payudara manusia yang ditransplantasikan pada mencit , secara bermakna (Ganguly *et al* , 2003).

Hasil penelitian Sukardiman (1999-2000) tersebut telah diketahui bahwa senyawa andrografolida (*Andrographis paniculata* Nees) dapat menghambat enzim DNA Topoisomerase sel kanker payudara manusia , dimana enzim DNA Topoisomerase mempunyai fungsi yang penting dalam proses intraseluler, yaitu berperan dalam proses replikasi, transkripsi , rekombinasi DNA dan proses proliferasi dari sel kanker. Dengan dihambatnya aktivitas enzim DNA Topoisomerase oleh senyawa inhibitor, maka proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Sehingga akan terbentuk *Protein Linked DNA Breaks (PLDB)*, akibatnya terjadi fragmentasi / kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh

terhadap proses didalam sel khususnya proses replikasi sel yang diakhiri dengan kematian sel kanker secara apoptosis. Demikian juga kurkumin mampu menginduksi kematian apoptosis dari sel kanker payudara, dengan melalui jalur penurunan level protein Bcl-2 dan kenaikan p53 serta Bax, hal ini ada kemungkinan berhubungan dengan penghambatan terhadap COX (Khar, et al, 1999). Keuntungan penggunaan senyawa antikanker yang memiliki mekanisme kematian secara apoptosis, maka dalam pemakaian klinik nanti diharapkan akan tidak menimbulkan efek samping yang besar dan selain memiliki aktivitas antikanker juga memiliki aktivitas kemopreventif.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan hasil bahwa rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) mengandung senyawa kurkumin dan sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) mengandung senyawa andrografolida yang cukup tinggi kadarnya  $\pm 2,5\%$ , maka sangatlah prospektif guna dijadikan sediaan fitofarmaka, khususnya obat kanker payudara yang berasal dari bahan tanaman obat Indonesia. Obat fitofarmaka adalah sediaan obat bahan alam yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinik dan uji klinik, di mana bahan baku dan produk jadinya telah terstandarisasi. Pada penelitian ini digunakan formula kombinasi dengan alasan untuk meningkatkan potensi antikankernya, karena kedua senyawa bioaktif dari kurkumin dan andrografolida memiliki aktivitas antikanker yang sama terhadap kanker payudara manusia baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Serta mekanisme antikankernya adalah dengan menginduksi apoptosis sehingga diharapkan adanya efek yang lebih poten, selektif, memiliki efek samping yang lebih kecil dan diharapkan juga penggunaan dosis pemakaiannya juga relatif lebih kecil.

Sebagai upaya meningkatkan status obat tradisional dari campuran kunyit dan sambiloto menjadi sediaan fitofarmaka maka sediaan tersebut harus dibuat dalam bentuk ekstrak atau fraksi yang tersandar, serta memenuhi beberapa persyaratan antara lain: (1) jaminan *quality* (kualitas), di mana bahan simplisia dan produk akhir harus memenuhi persyaratan

tentang kejagan dari kandungan aktif ( senyawa marker) , (2) jaminan *safety* (keamanan) , dimana produk akhir harus aman atau tidak toksik pada hewan coba yang dipersyaratkan dan (3) jaminan *efficacy* ( manfaat), di mana produk akhir campuran kunyit dan sambiloto harus menunjukkan aktivitas antikanker pada uji praklinik dengan hewan coba , dan menunjukkan aktivitas antikanker pada uji klinik dengan manusia.

Tahapan penelitian tahun pertama adalah melakukan standarisasi simplisia kunyit dan sambiloto, ekstraksi dan standarisasi campuran ekstrak atau fraksi dari campuran kunyit dan sambiloto , dengan senyawa marker kurkumin untuk kunyit dan andrografolida untuk sambiloto, selanjutnya dilakukan penentuan aktivitas antikanker secara *in vitro* dengan sel kanker payudara manusia TD-47. Pada tahun kedua dilakukan penelitian tentang formulasi sediaan fitofarmaka , studi tentang waktu disolusi, kestabilan produk , studi bioviabilitas pada kelinci , uji aktivitas antikanker secara *in vivo* dengan hewan coba fikus yang diinduksi dengan benzopirena dan dilanjutkan dengan uji toksisitas yang meliputi toksisitas akut, sub akut, teratogenik maupun mutagenik. Jika data aktivitas antikanker dan toksisitas dari produk akhir memenuhi persyaratan , maka pada tahapan penelitian tahun ketiga adalah uji klinik pada penderita kanker payudara.

## 1. 2. Rumusan Masalah Penelitian

Dari uraian tersebut diatas maka dapat dirumuskan masalahnya sebagai berikut :

1. Apakah sediaan fitofarmaka campuran ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) memiliki aktivitas antikanker secara *in vitro* dan *in vivo* ?
2. Apakah sediaan fitofarmaka campuran ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) memiliki efek toksik pada hewan coba yang meliputi toksisitas akut, sub akut, efek teratogenik dan mutagenik ?

3. Apakah sediaan fitofarmaka campuran ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) memiliki aktivitas antikanker terhadap pasien kanker payudara, pada uji klinik ?

### 1.3. Tujuan Umum Penelitian

Membuat produk fitofarmaka campuran ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) sebagai obat antikanker payudara .

#### 1.3.1. Tujuan Khusus Penelitian

1. Menentukan standarisasi simplisia rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees).
2. Melakukan ekstraksi dan standarisasi campuran ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees).
3. Menentukan uji aktivitas antikanker dan uji induksi apoptosis campuran ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap sel kanker payudara manusia T-47D secara in vitro
4. Penentuan uji toksisitas produk fitofarmaka dan campuran ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) yang meliputi toksisitas akut, toksisitas sub-akut, uji teratogenik.
5. Penentuan uji aktivitas antikanker produk fitofarmaka dari campuran ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) secara in vivo pada hewan coba yang diinduksi dengan benzopirena.
6. Menentukan studi formulasi dan pengujian bioavailabilitas produk fitofarmaka dari campuran ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees).

#### 1.4. Manfaat Penelitian

Memberikan landasan ilmiah tentang pengembangan produk bahan obat yang berasal dari tanaman khususnya yang berasal dari rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) dengan senyawa marker kurkumin dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dengan senyawa marker andrografolida, dan akhirnya diperoleh produk fitofarmaka antikanker payudara yang potensial, aman, efektif dan akhirnya dapat digunakan untuk pengobatan kanker payudara di dalam pelayanan kesehatan formal.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Tentang Tanaman *Curcuma domestica* Val.

##### 2.1.1 Identitas Tanaman

Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledoneae
Bangsa	: Zingiberales
Suku	: Zingiberaceae
Marga	: <i>Curcuma</i>
Jenis	: <i>Curcuma domestica</i> Val. (Depkes RI, 1977)
Sinonim	: <i>Curcuma domestica</i> Rumph. (Sugati dan Johnny, 1991)
	<i>Curcuma longasensu</i> Val. (Sugati dan Johnny, 1991)
	<i>Curcuma longa</i> Auct. (Gunawan, 1988)
	<i>Curcuma longa</i> Koen. (Sugati dan Johnny, 1991)
	<i>Curcuma longa</i> var <i>macrophylla</i> Miq (Gunawan, 1988)

##### 2.1.2 Nama Daerah

Indonesia : Kunyit

Sumatera : Kunyit (Aceh), kuning (Gayo), kuning (Batak Karo), hunik (Batak Toba), unik ( Batak Mandailing ), kunyit (Melayu ), kunyir, jinten (Lampung), kakunye (Enggano), kunyit (Aias), odil, ondil, kondin (Simalur), undre (Nias), kunyit (Tidung);

Jawa : kunyir koneng (Sunda), kunir, temu kuning (Jawa), konye, temu koneng (Madura);

Kalimantan : henda (Ngaju), kunyit (Olon Maanyan), cahang (Dayak penyabung), dio (Penihing), kunit, janar (Banjar);

Sulawesi : kuni, hamo (Sangir), uinida (Talaud), alawahu (Gorontalo), uni, kuni (Toraja), pagidon (Toli-Toli), kolalagu (Buol), kunyi (Makasar), kunyi (Salayar), unyi (Bugis), kuni, nuyik (Mandar), kuni (Tonsow), kolawak (Mongondow);

Nusa Tenggara : kunyik (Sasak), kuni (Bima), kaungi, wingir, winguru (Sumba Timur), dingira, hingiro, kunifa, konyi, kunyi, wingira (Sumba Barat), kewunyi (Sawu), kuneh, guni (Flores), kuma (Solor), kumoh (Alor), kunik, huni, unik (Roti), hunik (Timor);

Maluku : kurlai (Leti), lulu malai (Babar), ulin (Tanimbar), tum (Kai), unin (Goram), ina, kunin, uni (Searam Timur), unin, unine, unino, uninun (Ambon), unino (Haruku), kunine (Nusa Laut), kunino, uni henal (Saparana), kone, konik, uni, unin (Buru), kuni, kon (Sula), gurati, gulati, gogohiki (Halmahera), guraci (Ternate, Tidore);

Irian Jaya : rame (Kapaur), kandeifu (Nufor), nikuai (Windesi), mingguai (Wandamen), yaw (Arzo). (Depkes RI, 1977).

- \* Malaysia : Kunyit
- \* Filipina : Luyang Dilaw
- \* Singapura : Konyit
- \* Thailand : Khaminchan
- \* Inggris : Turmeric (Depkes RI, 1981).

### 2.1.3 Penyebaran dan Tempat Tumbuh

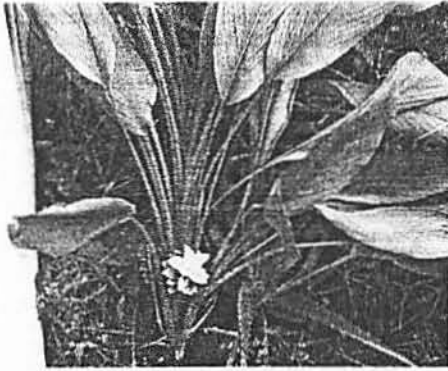
Tumbuh dan ditanam di Asia Selatan, Cina Selatan, Taiwan, Indonesia dan Filipina, dan diperkirakan berasal dari India. Tumbuh dengan baik di tanah yang baik tata pengairannya, curah hujan yang cukup banyak 2.000 mm sampai 4.000 mm tiap tahun dan di tempat yang sedikit kenaungan, tetapi untuk menghasilkan rimpang yang lebih besar dan baik menghendaki tempat yang terbuka. Tanah ringan seperti tanah lempung berpasir, baik untuk pertumbuhan rimpang (Depkes RI, 1977). Tanaman ini mudah tumbuh baik di dataran rendah maupun di dataran tinggi sampai 2.000 m dpl, pada lahan bertanah liat atau berpasir. Biasanya ditanam secara tumpang sari di



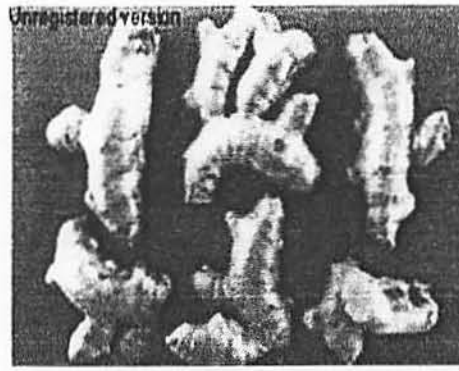
pekarangan atau di ladang bersama sayur-sayuran lain dan diusahakan secara bergilir dengan tebu (Gunawan, 1988).

#### 2.1.4 Morfologi *Curcuma domestica* Val.

Terna dengan batang berwarna semu hijau atau agak keunguan, rimpang terbentuk dengan sempurna, bercabang-cabang, berwarna jingga. Setiap tanaman berdaun 3 sampai 8 helai, panjang tangkai daun beserta pelepah daun sampai 70 cm, tanpa lidah-lidah, berambut halus jarang-jarang, helaian daun berbentuk lanset lebar, ujung daun lancip berekor, keseluruhannya berwarna hijau atau hanya bagian atas dekat tulang utama berwarna agak keunguan, panjang 28 cm sampai 85 cm, lebar 10 cm sampai 25 cm. Perbungaan terminal, gagang berambut, bersisik, panjang gagang 16 cm sampai 40 cm; tenda bunga, panjang 10 cm sampai 19 cm, lebar 5 cm sampai 10 cm; daun kelopak berambut, berbentuk lanset, panjang 4 cm sampai 8 cm, lebar 2 cm sampai 3,5 cm, daun kelopak yang paling bawah berwarna hijau, bentuk bundar telur, makin ke atas semakin menyempit dan serta memanjang, warna semu putih atau keunguan, kelopak berbentuk tabung, panjang 9 mm sampai 13 mm, bergigi 3 dan tipis selaput; tajuk bagian bawah berbentuk tabung, panjang lebih kurang 20 mm, berwarna krem, bagian dalam tabung berambut; tajuk bagian ujung berbelah-belah, warna putih atau merah jambu, panjang 10 mm sampai 15 mm, lebar 11 mm sampai 14 mm; bibir berbentuk bundar telur, panjang 16 mm sampai 20 mm, lebar 15 mm sampai 18 mm, warna jingga atau kuning keemasan dengan pinggir berwarna coklat dan ditengahnya berwarna kemerahan (Depkes RI, 1977).



1. Tanaman kunyit



2. Rimpang kunyit

Gambar 2.1 *Curcuma domestica* Val.

### 2.1.5 Pemerian

Bau khas aromatik, rasa agak pahit, agak pedas, lama-kelamaan menimbulkan rasa tebal (Depkes RI, 1977).

#### 2.1.5.1 Makroskopik

Kepingan : ringan, rapuh, warna kuning jingga, kuning jingga kemerahan sampai kuning jingga kecoklatan, bentuk hampir bundar sampai bulat panjang, kadang-kadang bercabang, lebar 0,5 cm sampai 3 cm, panjang 2 cm sampai 6 cm, tebal 1 mm sampai 5 mm, umumnya melengkung tidak beraturan, kadang-kadang terdapat pangkal upih daun dan pangkal akar. Batas korteks dan silinder pusat kadang-kadang jelas. Bekas patahan : agak rata, berdebu, warna kuning jingga sampai coklat kemerahan (Depkes RI, 1977).

#### 2.1.5.2 Mikroskopik

Epidermis : Satu lapis sel, pipih berbentuk poligonal, dinding sel menggebus. Rambut penutup : berbentuk kerucut, lurus atau agak bengkok, panjang 250  $\mu\text{m}$  sampai 890  $\mu\text{m}$ , dinding tebal. Hipodermis : terdiri dari beberapa lapis sel terentang tangensial, dinding sel menggebus. Periderm : terdiri dari 6 lapis sampai 9 lapis sel berbentuk segi panjang, dinding

menggabus. Korteks dan silinder pusat : parenkimatik, terdiri dari sel-sel besar, penuh berisi pati. Butir pati: tunggal berbentuk lonjong atau bulat telur dengan satu ujung sisi membulat, lamela kurang jelas, hilus yang kurang jelas terdapat pada tonjolan di ujung butir, panjang 10  $\mu\text{m}$  sampai 60  $\mu\text{m}$ , umumnya 20  $\mu\text{m}$  sampai 40  $\mu\text{m}$ , lebar 10  $\mu\text{m}$  sampai 28  $\mu\text{m}$ , umumnya 14  $\mu\text{m}$  sampai 20  $\mu\text{m}$ . Sel sekresi : banyak tersebar, bentuk bulat atau lonjong berisi minyak berwarna kuning jingga yang sebagian mendamar dan berwarna coklat kekuningan, pada penambahan besi (III) klorida LP warna menjadi lebih tua. Berkas pembuluh : kolateral, tersebar tidak beraturan pada korteks dan pada silinder pusat, berkas pembuluh pada endodermis tersusun dalam lingkaran, kadang-kadang berkas pembuluh dikelilingi sel parenkim yang tersusun menjari, pembuluh kayu umumnya terdiri dari pembuluh tangga dan pembuluh jala, lebar 20  $\mu\text{m}$  sampai 80  $\mu\text{m}$ , tidak berlipis. Endodermis : terdiri dari satu lapis sel terentang tangensial, dinding radial menebal, tidak terdapat pati.

Serbuk : warna kuning sampai kuning jingga. Fragmen pengenal adalah butir pati, gumpalan tidak beraturan zat berwarna kuning sampai kuning coklat, parenkim dengan sel sekresi, fragmen pembuluh tangga dan pembuluh jala, fragmen rambut penutup berwarna kuning, tidak terdapat serabut (Depkes RI, 1977).

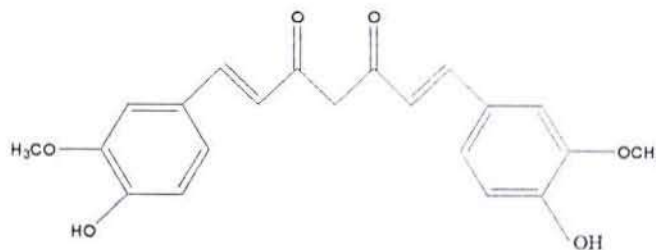
### 2.1.5.3 Tinjauan tentang Kandungan Kimia

*Curcuma domestica* Val. mengandung minyak atsiri yang terdiri atas turmeron, zingiberen, borneol, karvon, d-sabinen, alfa & gamma atlanton, d-alfa -felandren, sineol (Gunawan, 1988), sesquiterpen alcohol (Depkes RI, 1981), arturmeron, curlone, bisabolane (Bisset dan Wichtl, 2002). Kandungan lain adalah zat warna kuning tidak beracun yang berkhasiat sebagai obat yaitu kurkuminoid (IPTEKnet, 2007) yang terdiri atas kurkumin (Gunawan, 1988), desmetoksi kurkumin, bidesmetoksi kurkumin (Bisset dan Wichtl, 2002). juga zat pahit yang baunya mirip jahe kurkumon ( $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}$ ), turmerol

( $C_{14}H_{20}O$ ), para-tolil-metil-karbinol, pati (amilum), tannin, lemak, resin, damar (Gunawan, 1988).

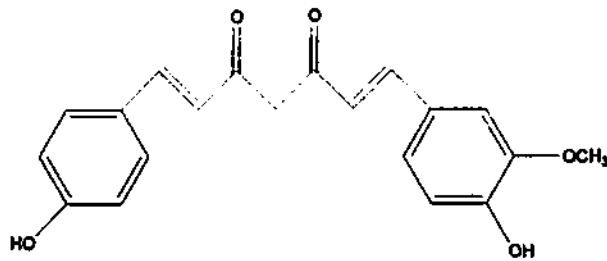
Kurkuminoid yang juga dikenal sebagai diarilheptanoid. Senyawa ini terdapat pada sebagian besar tanaman suku Zingiberaceae, terutama pada rimpang *Curcuma domestica* Val. Zat ini masih terbagi lagi menjadi : Kurkumin, desmetoksikurkumin, dan bisdesmetoksikurkumin (Nakanishi, *et al.*, 1983). Kurkuminoid merupakan kristal atau serbuk kuning oranye dengan rasa agak pahit, bau aromatis, tidak larut dalam air, larut dalam alkohol, asam asetat glasial dan alkali (Budavari *et.al.*, 2001).

Kurkumin atau diferuloylmethane atau turmeric yellow (1,7-bis(hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadiene-3,5-di-one) merupakan kandungan utama dari rimpang *Curcuma domestica* Val. berupa pigmen kuning nontoksik yang biasa digunakan sebagai bahan tambahan makanan, bumbu, dan bahan baku obat (Meiyanto, 1999). Kurkumin merupakan senyawa yang mempunyai gugus atom  $C_4$  yang diapit oleh gugus karbonil yang mempunyai sifat reduktor.



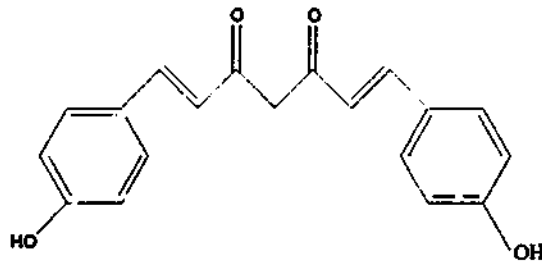
Gambar 2.2 Struktur kurkumin (Bisset dan Wichtl, 2002).

Desmetoksikurkumin merupakan senyawa aktif dalam rimpang *Curcuma domestica* Val. setelah kurkumin yang merupakan turunan kurkuminoid. Rumus strukturnya hampir sama dengan kurkumin hanya berbeda pada gugus fungsinya, yaitu



**Gambar 2.3. Struktur desmetoksikurkumin (Bisset dan Wichitl, 2002).**

Bidesmetoksikurkumin merupakan turunan kurkuminoid yang juga terdapat dalam rimpang kuyit dengan rumus struktur yang mirip dengan struktur kurkumin dan hanya berbeda pada gugus fungsinya saja.



**Gambar 2.4. Struktur bidesmetoksikurkumin (Bisset dan Wichitl, 2002).**

#### 2.1.5.4 Manfaat *Curcuma domestica* Val.

Pada umumnya rimpang *Curcuma domestica* Val. digunakan masyarakat sebagai obat mencret, obat sakit perut, pencahar (urus-urus), obat sakit kulit (Depkes RI, 1981). Pada beberapa penelitian disebutkan efek kurkumin sebagai anti-diabetes (Sharma, *et al.*, 1999), anti-bakteri (Chopra, *et al.*, 1998; Bhavani Sankar, *et al.*, 1979), anti-inflamasi (Araujo, *et al.*, 2001), dan anti kanker (Hong *et al.*, 1999; Strax, 2005).

## 2.2 Tinjauan tentang Tanaman *Andrographis paniculata* Nees.

### 2.2.1 Klasifikasi Sambiloto (*A. paniculata* Ness)

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Anak Kelas	: Sympetalae
Bangsa	: Tubiflorae
Suku	: Acanthaceae
Marga	: <i>Andrographis</i>
Jenis	: <i>Andrographis paniculata</i> Ness.

(Backer dan Van der Brink Jr., 1965; Depkes RI, 1979; Sugiarti dan Johny, 1991)

### 2.2.2 Nama Daerah Sambiloto (*A. paniculata* Ness.)

Ki oray, Ki peurat, takilo (Sunda), bidara, sadilata, sambilata, takila (Jawa), pepaitan (Sumatra), yi jian xi, lan he lian (China), xuyen tem liem, cong cong (Vietnam), kirata, mahatiika (India/Pakistan), creat, green chiretta, halviva, kariyat (Inggris) (Depkes RI, 1979; Sugiarti dan Johny, 1991).

### 2.2.3 Morfologi Sambiloto (*A. paniculata* Ness.)

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) merupakan tanaman tema, tumbuh tegak, tinggi 40 cm sampai 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 cm sampai 12 cm dan lebar 1 cm sampai 3 cm, panjang tangkai 5 mm sampai 25 mm; daun bagian atas bentuknya seperti pelindung.

Perbungaan tegak bercabang-cabang, gagang bunga 3 mm sampai 7 mm, panjang kelopak bunga 3 mm sampai 4 mm. Bunga berbibir tabung,

panjang 6 mm, bibir bunga bagian atas berwarna putih dengan warna kuning di bagian atasnya, ukurannya 7 mm sampai 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 keping (Depkes RI, 1979, 2003).

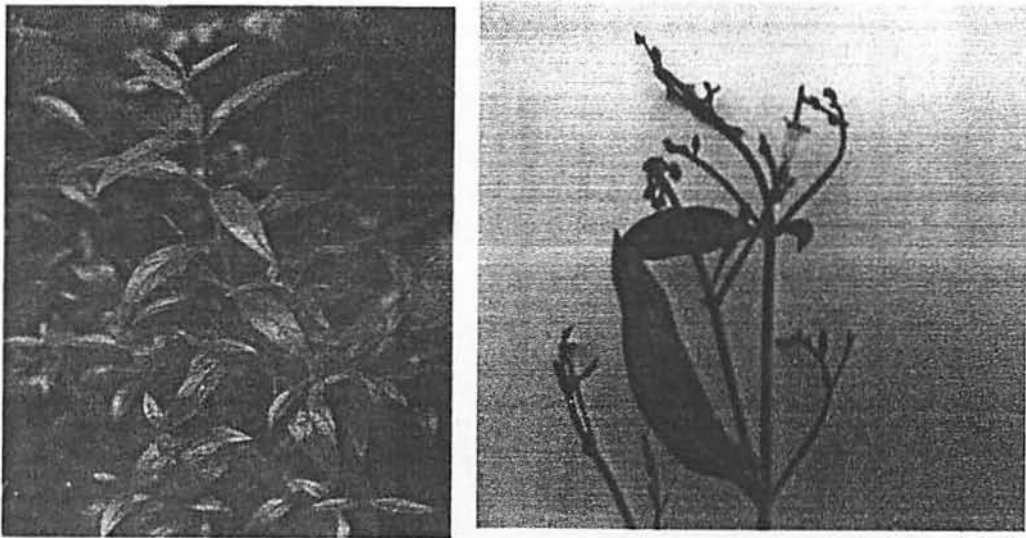
#### 2.2.4 Tinjauan tentang Herba Sambiloto (*A. paniculata* Ness.)

Herba sambiloto adalah bagian di atas tanah tanaman *Andrographis paniculata* Nees. Tidak berbau, rasa sangat pahit. Batang tidak berambut, tebal 2 mm sampai 6 mm, jelas persegi empat, batang bagian atas seringkali dengan sudut agak berusuk. Daun bersilang berhadapan, umumnya terlepas dari batang, bentuk lanset sampai bentuk lidah tombak, panjang 2 cm sampai 7 cm, lebar 1 cm sampai 3 cm, rapuh, tipis, tidak berambut, pangkal daun runcing, tepi daun rata. Permukaan atas berwarna hijau tua atau hijau kecoklatan, permukaan bawah berwarna hijau pucat. Tangkai daun pendek.

Kelopak bunga terdiri dari lima helai daun kelopak, panjang 3 mm sampai 4 mm, berambut. Daun mahkota berwarna putih sampai keunguan. Buah berbentuk jorong, pangkal dan ujung tajam, panjang lebih kurang 2 cm, lebar lebih kurang 4 mm, kadang-kadang pecah secara membujur menjadi lima keping. Permukaan luar kulit buah berwarna putih atau putih kelabu. Biji agak keras, panjang 1,5 mm sampai 3 mm, lebar lebih kurang 2 mm; permukaan luar berwarna coklat muda bertonjol-tonjol. Pada penampang melintang biji terlihat endosperm berwarna kuning kecoklatan, lembaga berwarna putih kekuningan.

Pada daun, epidermis atas terdiri atas satu lapis sel berbentuk polygonal, tidak mempunyai stomata, dan pada epidermis terdapat sistolit berbentuk jorong atau bulat telur panjang. Bentuk sistolit mirip rangkaian anggur. Rambut kelenjar banyak, rambut penutup sedikit. Pada epidermis

bawah banyak ditemukan stomata tipe bidiasitik dan diasitik, rambut kelenjar dan litosis lebih banyak. Berkas pembuluh tipe bikolateral. Pada batang terdapat epidermis yang terdiri dari satu lapis sel, rambut kelenjar dan litosis. Di bawah epidermis ada jaringan kolenkim, parenkim korteks, xylem, floem, kambium dan empulur. Pada batang sambiloto masih terdapat warna hijau seperti pada daun karena masih mengandung kloroplas yang disebut klorenkim (Depkes RI, 1979; Standard of ASEAN Herbal Medicine, 1993).



Gambar 2.5 *Andrographis paniculata* Nees.

### 2.2.5 Penyebaran Tanaman

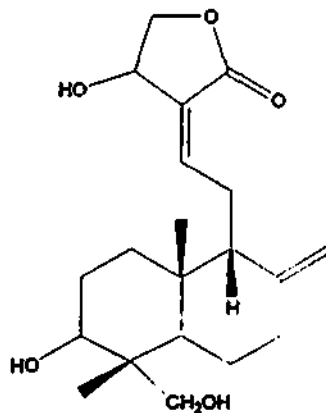
Tumbuh di India, semenanjung Malaya dan hampir di seluruh Indonesia pada tempat terbuka, di kebun, di tepi sungai, pada tanah yang gembur, seringkali tumbuh berkelompok. Tumbuh pada ketinggian tempat 1 m sampai 700 m di atas permukaan laut (Depkes RI, 1979).



### 2.2.6 Kandungan Kimia

Komponen utama sambiloto adalah andrografolida yang berguna sebagai bahan obat. Kandungan lakton lain adalah neoandrografolida, deoksiandrografolida, androneoandrografolida,

14-deoksi 11,12-didehidroandrografolida (dehidroandrografolida), homo andrographolide, andrographan, andrographon, andrographosterin,  $\beta$ -sitosterol-D-glucoside. Disamping itu, daun sambiloto mengandung saponin, flavonoid meliputi polimetoksi flavon, andrografenin, panicolin, mono-o-metilwightin dan apigenin-7,4-dimetil eter, alkaloid dan tanin. Kandungan kimia lain terdapat pada daun dan batang adalah lakton, kalmegin dan hablur kuning yang memiliki rasa pahit (Chang, 1987; Depkes RI, 1979; Matsuda, dkk, 1994; Yusron dkk, 2005).



Gambar 2.6 Struktur Andrografolida

### 2.2.7 Kegunaan Sambilloto (*Andrograps paniculata* Ness.)

Hepatitis, infeksi saluran empedu, disetri basiler, tifoid, diare, influenza, radang amandel (tonsilitis), abses paru, malaria, radang paru (pneumonia), radang saluran napas (bronkhitis), radang ginjal akut (pielonefritis), radang telinga tengah (OMA), Radang usus Buntu, sakit gigi, demam, kencing nanah (gonore), kencing manis (DM), TB paru, skrofuloderma, batuk rejan (pertusis), sesak nafas (asma), leptospirosis, darah tinggi, (hipertensi), kusta, keracunan

oleh jamur, singkong, tempe bongkrek, makanan laut, kanker: penyakit trofoblas, kehamilan anggur (mola hidatidosa), trofoblas ganas (tumor trofoblas), tumor paru, obat HIV dan kanker (Depkes RI, 1979; Yusron, dkk, 2005). Obat HIV dan kanker (Yusron, dkk, 2005), anti kanker (Rajagopal, 2003; Sukardiman, 1997), anti kanker payudara (Sukardiman, 2002), malaria (Suyanto, 1995; Kusumawardhani, 2005), sebagai imunostimulan (Puri *et al.*, 1993), hepatoprotektif (Handa dan Sharma, 1990), dan antidiare (Gupta *et al.*, 1990), anti piretik (Madav *et al.*, 1995), dll.

### 2.3. Tinjauan Tentang Standardisasi

Standardisasi simplisia mempunyai pengertian bahwa simplisia yang akan digunakan untuk obat sebagai bahan baku harus memenuhi persyaratan yang tercantum dalam monografi terbitan resmi pemerintah sebagai pihak pembina dan pengawasan (Materia Medika Indonesia) yang meliputi makroskopis, mikroskopis (iris dan serbuk) serta kimia (Depkes RI, 1989).

### 2.4. Tinjauan Tentang Simplisia

Simplisia adalah bahan alam yang digunakan sebagai obat, belum mengalami pengolahan apapun, umumnya dalam keadaan kering, langsung digunakan sebagai obat dalam atau banyak digunakan sebagai obat dalam sediaan galenik tertentu atau digunakan sebagai bahan dasar untuk memperoleh bahan baku obat. Sedangkan sediaan galenik berupa ekstrak total mengandung 2 atau lebih senyawa kimia yang mempunyai aktifitas farmakologi dan diperoleh sebagai produk ekstraksi bahan alam serta langsung digunakan sebagai obat atau digunakan setelah dibuat bentuk formulasi sediaan obat tertentu yang sesuai (Depdikbud, 1984).

Dalam buku "Materia Medika Indonesia" ditetapkan definisi bahwa simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 2000).

## 2.4.1 Klasifikasi Siplisia

Simplisia dibagi menjadi 3 golongan yaitu: simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan (mineral) (Midian dkk, 1985).

### 2.4.1.1 Siplisia Nabati

Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman/eksudat tanaman (Depkes RI, 1979). Yang dimaksud dengan eksudat tanaman adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya, atau zat-zat nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya (Midian dkk, 1985).

### 2.4.1.2 Siplisia Hewani

Simplisia hewani ialah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni (Midian dkk, 1985).

### 2.4.1.3 Siplisia Pelikan (Mineral)

Simplisia pelikan atau mineral ialah simplisia yang berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Midian dkk, 1985).

## 2.4. 2. Pembuatan simplisia secara umum

### 2.4.2.1 Pengumpulan bahan baku

Kadar senyawa aktif dalam suatu simplisia berbeda-beda antara lain tergantung pada :

1. Bagian tanaman yang digunakan
2. Umur tanaman atau bagian tanaman pada saat panen
3. Waktu panen
4. Lingkungan tempat tumbuh

Waktu panen sangat erat hubungannya dengan pembentukan senyawa aktif di dalam bagian tanaman yang akan dipanen. Waktu panen yang tepat pada saat bagian tanaman tersebut mengandung senyawa aktif dalam jumlah terbesar. Senyawa aktif terbentuk secara maksimal di dalam bagian tanaman atau tanaman pada umur tertentu. Penentuan waktu panen dalam sehari juga perlu dipertimbangkan karena kestabilan kimia dan fisik senyawa aktif dari beberapa simplisia yang mengandung minyak atsiri dipengaruhi oleh sinar matahari.

Panen dilakukan dengan tangan, menggunakan alat atau mesin. Ketrampilan memetik sangat diperlukan agar diperoleh simplisia yang benar, tidak tercampur dengan bagian tanaman lain dan tidak merusak tanaman induk. Alat yang terbuat dari logam sebaiknya tidak digunakan bila diperkirakan akan merusak senyawa aktif simplisia seperti : fenol, glikosida dan sebagainya.

Tanaman yang pada saat panen diambil rimpangnya, pengambilan dilakukan pada musim kering dengan tanda-tanda mengeringnya bagian atas tanaman. Dalam keadaan ini, rimpang dalam keadaan besar maksimum. Cara pengumpulan simplisia yang berupa rimpang yaitu ; rimpang dicabut, dibersihkan dari akar, dipotong dengan ketebalan tertentu (Depkes RI, 1985).

#### **2.4.2.2. Sortasi basah**

Sortasi basah dilakukan untuk menghilangkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Misalnya pada simplisia yang dibuat dari akar suatu tanaman obat, bahan-bahan asing seperti tanah, serta pengotoran lainnya harus dibuang. Tanah mengandung bermacam-macam mikroba dalam jumlah yang tinggi, oleh karena itu pembersihan simplisia dari tanah yang terikut dapat mengurangi jumlah mikroba awal (Depkes RI, 1985).

#### **2.4.2.3. Pencucian**

Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotoran lainnya yang melekat pada bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih, misalnya air dari mata air, air sumur atau air PAM. Bahan simplisia yang mengandung zat yang mudah larut di dalam air yang mengalir, pencucian agar dilakukan dalam waktu sesingkat mungkin. Cara sortasi dan pencucian sangat mempengaruhi jenis dan jumlah mikroba awal simplisia. Misalnya jika air yang digunakan untuk pencucian kotor, maka akan menambah jumlah mikroba dan air pada permukaan bahan simplisia yang akan mempercepat pertumbuhan mikroba (Depkes RI, 1985).

#### **2.4.2.4. Perajangan**

Beberapa jenis bahan simplisia perlu mengalami proses perajangan. Perajangan bahan simplisia dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan. Tanaman yang baru diambil jangan langsung dirajang tetapi dijemur dalam keadaan utuh selama 1 hari. Hal ini diperlukan untuk menghindari pewarnaan akibat reaksi antara bahan dengan logam pisau. Perajangan dapat dilakukan dengan pisau, dengan alat mesin perajang khusus sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran yang dikehendaki. Semakin tipis bahan yang akan dikeringkan, semakin cepat penguapan air, sehingga mempercepat waktu pengeringan. Akan tetapi irisan yang terlalu tipis juga dapat menyebabkan berkurangnya atau hilangnya zat berkhasiat yang mudah menguap, sehingga mempengaruhi komposisi, bau dan rasa yang diinginkan (Depkes RI, 1985).

#### **2.4.2.5. Pengeringan**

Tujuan pengeringan ialah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Dengan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik akan dicegah penurunan mutu atau kerusakan simplisia. Pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan sinar matahari atau menggunakan suatu

alat pengering. Hal-hal yang perlu diperhatikan selama proses pengeringan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara, waktu pengeringan dan luas permukaan bahan.

Pada dasarnya dikenal dua cara pengeringan, yaitu pengeringan secara alamiah dan buatan. Pengeringan alamiah dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan panas sinar matahari langsung dan dengan diangin-anginkan. Pengeringan dengan sinar matahari langsung dilakukan untuk mengeringkan bagian tanaman yang relatif keras seperti kayu, kulit kayu, biji, dan mengandung senyawa aktif yang relatif stabil. Kecepatan pengeringan dari cara ini sangat tergantung pada keadaan iklim, sehingga baik jika dilakukan di daerah yang udaranya panas atau kelembabannya rendah, serta tidak turun hujan. Pengeringan dengan cara diangin-anginkan dan tidak dipanaskan dengan sinar matahari langsung digunakan untuk mengeringkan bagian tanaman yang lunak seperti bunga, daun dan bagian tanaman yang mengandung senyawa aktif mudah menguap. Pada pengeringan buatan digunakan suatu alat yang suhu, kelembaban, tekanan dan aliran udaranya dapat diatur. Dengan menggunakan alat ini dapat diperoleh simplisia dengan mutu yang lebih baik karena pengeringan akan lebih merata dan waktu pengeringan lebih cepat tanpa dipengaruhi oleh keadaan cuaca (Depkes RI, 1985).

#### **2.4.2.6. Sortasi kering**

Sortasi setelah pengeringan sebenarnya merupakan tahap akhir pembuatan simplisia. Tujuan sortasi untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotoran-pengotoran lain yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering. Proses ini dilakukan sebelum simplisia dibungkus untuk kemudian disimpan. Seperti halnya pada sortasi awal, sortasi disini dapat dilakukan dengan atau secara mekanik. Pada simplisia bentuk rimpang, jumlah akar yang melekat pada rimpang terlampau besar dan harus dibuang (Depkes RI, 1985).

#### **2.4.2.7 Pengepakan dan Penyimpanan**

Simplisia dapat rusak, mundur atau berubah mutunya karena berbagai faktor luar dan dalam, antara lain : cahaya, oksigen udara, reaksi kimia intern, dehidrasi, penyerapan air, pengotoran, serangga, dan kapang. Selama penyimpanan ada kemungkinan terjadi kerusakan pada simplisia. Kerusakan tersebut dapat mengakibatkan kemunduran mutu, sehingga simplisia bersangkutan tidak lagi memenuhi syarat yang diperlukan atau yang ditentukan. Oleh karena itu pada penyimpanan simplisia perlu diperhatikan beberapa hal yang dapat mengakibatkan kerusakan simplisia, yaitu cara pengepakan, pembungkusan dan pewadahan, persyaratan gudang simplisia, cara sortasi dan pemeriksaan mutu, serta cara pengawetannya. Penyebab kerusakan pada simplisia yang utama adalah air dan kelembaban.

Cara pengemasan simplisia tergantung pada jenis simplisia dan tujuan penggunaan pengemasan. Bahan dan bentuk pengemasannya harus sesuai, dapat melindungi dari kemungkinan kerusakan simplisia, dan memperhatikan segi pemanfaatan ruang untuk keperluan pengangkutan maupun penyimpanan. Wadah harus bersifat tidak beracun dan tidak bereaksi (inert) dengan isinya sehingga tidak menyebabkan terjadinya reaksi serta penyimpangan warna, bau, rasa dan sebagainya pada simplisia. Selain itu wadah harus melindungi simplisia dari cemaran mikroba, kotoran dan serangga serta mempertahankan senyawa aktif yang mudah menguap atau mencegah pengaruh sinar, masuknya uap air dan gas-gas lain yang dapat menurunkan mutu simplisia (Depkes RI, 1985).

#### **2.4.2.8 Pemeriksaan Mutu**

Pemeriksaan mutu simplisia dilakukan pada waktu penerimaan atau pembelinya dari pengumpul atau pedagang simplisia. Simplisia yang diterima harus berupa simplisia murni dan memenuhi persyaratan umum untuk simplisia seperti yang disebutkan dalam buku Farmakope Indonesia, Ekstra Farmakope Indonesia ataupun Materia Medika Indonesia edisi terakhir.

Apabila untuk simplisia yang bersangkutan terdapat paparannya dalam salah satu atau ketiga buku tersebut, maka simplisia tadi harus memenuhi persyaratan yang disebutkan pada paparannya. Suatu simplisia dapat dinyatakan bermutu Farmakope Indonesia, Ekstra Farmakope Indonesia, atau Materia Medika Indonesia, apabila simplisia bersangkutan memenuhi persyaratan yang disebutkan dalam buku-buku yang bersangkutan. Pada pemeriksaan mutu simplisia pemeriksaan dilakukan dengan cara organoleptik, makroskopik dan atau cara kimia. Beberapa jenis simplisia tertentu ada yang perlu diperiksa dengan uji mutu secara biologi. Sebelum disortir simplisia diayak dulu untuk membuang debu pasir yang terikut (Depkes RI, 1985).

## **2.5 Tinjauan tentang Ekstrak**

### **2.5.1 Definisi Ekstrak**

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 rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. (Farmakope Indonesia IV, 1995)

Ekstrak tumbuhan obat yang dibuat dari simplisia nabati dapat dipandang sebagai bahan awal, bahan antara, atau bahan produk jadi. Ekstrak sebagai bahan awal dianalogkan dengan komoditi bahan baku obat yang dengan teknologi fitofarmasi diproses menjadi bahan yang dapat diproses lagi menjadi fraksi-fraksi, isolat senyawa tunggal ataupun tetap sebagai campuran dengan ekstrak lain. Ekstrak sebagai produk jadi berarti ekstrak yang berada dalam sediaan obat jadi siap digunakan oleh penderita. (Sutarjadi dan Noor Cholies, 1992).

### **2.5.2 Faktor Yang Berpengaruh pada Mutu Ekstrak**



### 2.5.2.1 Faktor Biologi

Mutu ekstrak dipengaruhi oleh bahan asal yaitu tanaman obatnya dan khusus dipandang dari segi biologi. Faktor biologi baik untuk bahan dari tumbuhan obat hasil budidaya (kultivar), maupun dari tumbuhan liar (wild crop) yang meliputi beberapa hal, yaitu :

#### 1. Identitas jenis (spesies)

Jenis tanaman dari sudut keragaman hayati dapat dikonfirmasi sampai informasi genetik sebagai faktor internal untuk validasi jenis (spesies).

#### 2. Lokasi tanaman asal

Lokasi berarti faktor eksternal, yaitu lingkungan (tanah dan atmosfer) dimana tanaman berinteraksi berupa energi (cuaca, temperatur, cahaya) dan materi (air, senyawa organik, dan senyawa anorganik).

#### 3. Periode pemanenan hasil tanaman

Faktor ini merupakan dimensi waktu dari proses kehidupan tanaman terutama metabolisme sehingga menentukan senyawa kandungan. Kapan senyawa kandungan mencapai kadar optimal dari proses biosintesis dan sebaliknya kapan sebelum senyawa tersebut dikonversi atau dibiotransformasi atau biodegradasi menjadi senyawa lain.

#### 4. Penyimpanan bahan tanaman

Merupakan faktor eksternal yang dapat diatur karena berpengaruh pada stabilitas bahan serta adanya kontaminasi (biotik dan abiotik).

#### 5. Umur tanaman dan bagian yang digunakan.

Selain kelima faktor diatas, maka untuk bahan dari tanaman obat hasil budidaya (kultivar) adalagi faktor GAP (*Good Agriculture Practice*) sedangkan untuk bahan dari tumbuhan liar ada faktor kondisi proses pengeringan yang umumnya dilakukan di lapangan (Depkes RI, 2000).

#### 2.5.2.2 Faktor Kimia

Mutu ekstrak dipengaruhi oleh bahan asal yaitu tanaman obatnya, khususnya dipandang dari segi kandungan kimianya.faktor kimia baik untuk bahan dari tanaman obat hasil budidaya (kultivar) ataupun dari tumbuhan liar (*wildcrop*), meliputi beberapa hal, yaitu :

- a. Faktor internal:
  1. Jenis senyawa aktif dalam bahan
  2. Komposisi kualitatif senyawa aktif
  3. Komposisi kuantitatif senyawa aktif
  4. Kadar total rata-rata senyawa aktif
- b. Faktor eksternal:
  1. Metode ekstraksi
  2. Perbandingan ukuran alat ekstraksi (diameter dan tinggi alat)
  3. Ukuran, kekerasan, dan kekeringan bahan
  4. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi
  5. Kandungan logam berat
  6. Kandungan pestisida

Senyawa kimia dalam ekstrak ditinjau dari asalnya dapat dibedakan menjadi beberapa kelompok, yaitu :

1. Senyawa kandungan asli dari tanaman asal  
 Senyawa asli sebenarnya berarti senyawa yang memang sudah ada sejak masa tanaman tersebut hidup. Jika proses preparasi simplisia dan ekstraksi dijamin tidak menyebabkan perubahan kimia, maka hasil analisis kimia terhadap ekstrak mencerminkan komposisi senyawa kandungan asli.
2. Senyawa dari hasil perubahan senyawa asli

Dari kajian dan riset memang sudah dapat diprediksi terjadi perubahan kimia senyawa asli karena memang sifat fisika kimia senyawa asli dan proses penstabilan yang sulit.

### 3. Senyawa kontaminasi

Senyawa kontaminasi merupakan senyawa eksogen yang tercampur pada ekstrak baik polusi yang tidak terhindari atau sebagai sisa atau residu proses.

### 4. Senyawa hasil interaksi kontaminasi dengan senyawa asli atau senyawa perubahan.

Pengertian dan kesadaran akan adanya 4 kelompok senyawa yang terkandung dalam ekstrak akan meningkatkan validasi standarisasi dan parameter mutu ekstrak. Kelompok pertama dan kedua terkait dengan parameter standard umum yang bersifat spesifik sedangkan kelompok tiga dan empat merupakan parameter standard nonspesifik ( Depkes RI, 2000).

## 2.5.3 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu :Pembuatan serbuk simplisia dan klasifikasinya, menentukan cairan pengekstraksi, separasi dan pemurnian, pemekatan dan penguapan, pengeringan ekstrak (Depkes RI, 2000).

### 2.5.3.1 Pembuatan serbuk simplisia

Proses awal pembuatan ekstrak adalah tahapan pembuatan serbuk simplisia kering. Dari simplisia dibuat serbuk simplisia dengan peralatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak dengan beberapa hal, yaitu :

- Makin halus serbuk simplisia, proses ekstraksi makin efektif-efisien namun makin halus serbuk maka makin rumit secara teknologi peralatan untuk tahapan filtrasi.
- Selama penggunaan peralatan penyerbukan dimana ada gerakan dan interaksi dengan benda keras (logam, dan lain-lain) yang dapat

berpengaruh pada senyawa kandungan. Namun hal ini dapat dikompensasi dengan penggunaan nitrogen cair.

#### **2.5.3.2. Menentukan cairan pengestraksi**

Cairan pengestraksi 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 kandungan yang diinginkan. Dalam hal ekstrak total, maka cairan pengestraksi dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Faktor utama untuk pertimbangan dalam pemilihan cairan pengestraksi adalah :

- Selektifitas
- Kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut
- Ekonomis
- Ramah lingkungan
- Keamanan

Pada prinsipnya cairan pengestraksi harus memenuhi syarat kefarmasian atau dalam perdagangan dikenal dengan kelompok spesifikasi "Pharmaceutical grade" (Depkes RI, 2000).

#### **2.5.3.3 Separasi dan Pemurnian**

Tujuan dari tahapan ini adalah menghilangkan (memisahkan) senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki, sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. Proses-proses pada tahapan ini adalah pengendapan, pemisahan dua cairan tidak campur, sentrifugasi, dekantasi, filtrasi serta proses adsorpsi dan penukar ion (Depkes RI, 2000).

#### **2.5.3.4. Pemekatan atau penguapan (vaporasi dan evaporasi)**

Pemekatan berarti peningkatan jumlah partial solut (senyawa terlarut) secara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kondisi kering. Ekstrak hanya menjadi kental atau pekat (Depkes RI, 2000). Alat yang sering digunakan yaitu dengan menggunakan Konsentrator Tradisional Tipe Robert, *Descending-Film Evaporator* dan *Horizontal-Film Evaporator*. Pada evaporator lapis tipis, pelarut menguap pada lapisan yang berisi larutan ekstrak dalam jumlah sedikit, sehingga pemekatan dengan menggunakan alat ini membutuhkan waktu yang singkat. Dengan penggunaan vakum/penghisap dan suhu evaporasi yang cukup rendah, sangat mungkin menjamin perlakuan yang hati-hati dari produk yang termosensitif (Wijsekera, 1991).

#### 2.5.3.5. Pengerinan Ekstrak

Pengerinan berarti menghilangkan pelarut dari bahan sehingga menghasilkan serbuk, massa kering rapuh, tergantung proses dan peralatan yang digunakan. Ada beberapa proses pengerinan ekstrak, yaitu dengan cara:

- Pengerinan evaporasi
- Pengerinan vaporasi
- Pengerinan sublimasi
- Pengerinan konveksi
- Pengerinan kontak
- Pengerinan radiasi
- Pengerinan dielektrik

(Depkes RI, 2000).

#### 2.5.4. Metode Ekstraksi

##### 2.5.4.1 Ekstraksi dengan menggunakan pelarut

###### 1. Cara dIngn.

###### 1.1 Maserasi

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada

keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes RI, 2000).

## **1.2 Perkolasi**

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/ penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Depkes RI, 2000).

## **2. Cara panas**

### **2.1 Refluks**

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI, 2000).

### **2.3 Digesti**

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinyu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yang secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C (Depkes RI, 2000).

### **2.4 Infus**

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup ke dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15- 20 menit) (Depkes RI, 2000).

### **2.5 Dekok**

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ( $\geq 30^\circ\text{C}$ ) dan temperatur sampai titik didih air (Depkes RI, 2000).

## **2.6 Destilasi uap**

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan partial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dan ketel secara kontinyu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama sentawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian.

Pada destilasi uap, bahan (simplisia) benar-benar tidak tercelup ke air yang mendidih, namun dilewati uap air sehingga senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi. Destilasi uap dan air, bahan (simplisia) bercampur sempurna atau sebagian dengan air mendidih, senyawa kandungan menguap tetap kontinyu ikut terdestilasi (Depkes RI, 2000).

### **2.5.4.2. Cara ekstraksi lainnya.**

#### **1. Ekstraksi berkesinambungan**

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi (Depkes RI, 2000).

#### **2. Superkritikal karbondioksida**

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia, dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variabel temperatur dan tekanan akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak (Depkes RI, 2000).

### 3. Ekstraksi ultrasonik

Getaran ultrasonik (>20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (cavitation) sebagai stress dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekwensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi (Depkes RI, 2000).

### 4. Ekstraksi energi listrik

Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta "electric-discharges" yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelembung tekanan berkecepatan ultrasonik (Depkes RI, 2000).

## 2.6 Tinjauan tentang Parameter Standar Umum Simplisia dan Ekstrak

### 2.6.1 Parameter Non Spesifik

Parameter non spesifik merupakan tolak ukur baku yang dapat berlaku untuk semua jenis simplisia maupun ekstrak, tidak khusus untuk jenis simplisia atau ekstrak dari tanaman tertentu, ataupun jenis proses yang telah dilalui (Depkes RI, 2000).

#### 2.6.1.1 Susut Pengeringan.

Pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C selama 30 menit atau sampai berat konstan, yang dinyatakan sebagai nilai prosen. Dalam hal khusus (bahan tidak mengandung minyak menguap/etisii dan sisa pelarut menguap) identik dengan kadar air, yaitu kandungan air karena kandungan air berada di atmosfer/lingkungan udara terbuka. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (Depkes RI, 2000).



### **2.6.1.2 Kadar Air**

Pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan, dilakukan dengan cara yang tepat diantara cara titrasi, destilasi atau gravimetri. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air dalam bahan (Depkes RI, 2000)

### **2.6.1.3 Kadar Abu**

Dilakukan dengan memanaskan bahan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak (Depkes RI, 2000).

### **2.6.1.4. Cemaran Logam Berat**

Penentuan kandungan logam berat secara spektroskopi serapan atom atau lainnya yang lebih valid. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung logam berat tertentu (Hg, Pb, Cd dan lain-lain) melebihi nilai yang ditetapkan karena berbahaya (toksik) bagi kesehatan (Depkes RI, 2000)

### **2.6.1.6 Cemaran Mikroba**

#### **1. Parameter Cemaran Mikroba**

Penentuan /identifikasi adanya mikroba yang patogen secara analisis mikrobiologis. Penentuan parameter ini untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak boleh mengandung mikroba nonpatogen melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan berbahaya (toksik) bagi kesehatan.

#### **2. Parameter Cemaran Kapang, Khamir dan Aflatoksin.**

Penentuan adanya jamur secara mikrobiologis dan adanya aflatoksin dengan KLT. Penentuan parameter ini untuk memberikan jaminan bahwa

ekstrak tidak mengandung cemaran jamur melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan aflatoksin yang berbahaya bagi kesehatan (Depkes RI, 2000).

### **2.6.2 Parameter Spesifik**

Parameter spesifik merupakan tolak ukur khusus yang dapat dikaitkan dengan jenis tanaman asal ekstrak atau proses ekstraksi tertentu. Umumnya yang spesifik adalah komposisi kandungan dalam ekstrak yang dapat diartikan sebagai komponen utama, dalam hal ini kurkumin (Depkes RI, 2000).

#### **2.6.2.1 Identitas**

Parameter identitas ekstrak meliputi deskripsi tata nama meliputi nama ekstrak (generik, dagang, paten), nama latin tumbuhan (sistematika botani), bagian tumbuhan yang digunakan (rimpang, daun, dan sebagainya) dan nama Indonesia tumbuhan. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan identitas obyektif dari nama dan spesifik dari senyawa identitas, yaitu senyawa tertentu yang menjadi petunjuk spesifik dengan metode tertentu (Depkes RI, 2000).

#### **2.6.2.2 Organoleptik**

Parameter organoleptik ekstrak merupakan pendeskripsian bentuk, warna, bau, rasa dengan menggunakan pancaindra. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan pengenalan awal yang sederhana dan seobyektif mungkin (Depkes RI, 2000).

#### **2.6.2.3 Senyawa Terlarut Dalam Pelarut Tertentu**

Parameter senyawa terlarut dalam pelarut tertentu ditentukan dengan cara melarutkan ekstrak dengan pelarut (alkohol atau air) untuk ditentukan jumlah solut yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetri. Dalam hal tertentu dapat diukur senyawa yang terlarut dalam pelarut lain, misalnya heksana, diklorometan, metanol. Penentuan

parameter ini dilakukan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan (Depkes RI, 2000).

#### **2.6.2.4 Kadar Senyawa Kimia Tertentu**

Dengan tersedianya suatu kandungan kimia yang berupa senyawa identitas atau senyawa kimia utamaataupun kandungan kimia lainnya, maka secara kromatografi instrumental dapat dilakukan penetapan kadar kandungan kimia tersebut. Instrumen yang dapat digunakan adalah Densitometer, Kromatografi Gas, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau instrumen lain yang sesuai. Metode penetapan kadar harus diuji dulu validitasnya, yaitu batas deteksi, selektivitas, linieritas, ketelitian, ketepatan dan lain-lain. Penentuan kadar senyawa identitas ini dapat memberikan data kadar kandungan kimia tertentu sebagai senyawa identitas atau senyawa yang diduga bertanggung jawab pada efek farmakologi (Depkes RI, 2000).

### **2.5 Tinjauan tentang Kromatografi**

#### **2.6.1 Kromatografi secara Umum**

Kromatografi merupakan salah satu metode pemisahan yang memungkinkan peneliti untuk mengidentifikasi, memisahkan, dan memumikan komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Pemisahan dalam kromatografi ditunjang oleh adanya fase diam dan fase gerak. Prinsip dari kromatografi adalah proses penarikan komponen zat berkhasiat dan zat lain yang ada di fase diam oleh fase gerak yang berdasarkan proses partisi, adsorpsi, dan pertukaran ion. Kromatografi terbagi menjadi kromatografi kolom dan kromatografi planar. Berdasar fase geraknya kromatografi kolom terbagi menjadi kromatografi cair dan kromatografi gas (Skoog, 1985).

### 2.6.2 Kromatografi lapis tipis

Digunakan pada pemisahan zat secara cepat, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca. Pemisahan didasarkan pada penyerapan, pembagian atau gabungannya, tergantung dari zat penyerap dan cara pembuatan lapisan zat penyerap dan jenis pelarut (Markham, 1988). Pada dasarnya teknik KLT adalah sebagai berikut : larutan sampel ditotolkan di dekat ujung fase diam, yaitu lapisan tipis penyerap, sebagai zona awal. Sampel kemudian dikeringkan. Fase diam yang sudah mengandung totolan sampel tersebut kemudian dieluasi dengan fase geraknya, biasanya merupakan campuran dari 2 sampai 4 pelarut murni, di dalam bejana tertutup. Jika lapisan penyerap dan fase geraknya tepat, komponen – komponen dalam campuran pelarut akan bermigrasi dari fase gerak melewati fase diam. Jika fase gerak telah bermigrasi pada jarak yang ditentukan, fase diam diangkat dan dikeringkan, dan zona bercak di deteksi dengan penglihatan langsung atau dengan lampu ultraviolet, dengan atau tanpa penampak noda yang sesuai. Macam–macam fase diam yang sering digunakan di KLT adalah silika gel, selulosa, alumina, silikon dioksida inert, poliamida dan sephadex (Sherma, 2003).

Mekanisme partisi adalah campuran yang akan dipisahkan, didistribusikan diantara dua fase cair yang tidak saling campur. Hal ini berdasarkan perbedaan kelarutan relatif dari masing-masing komponen dan fase gerak.

Sebagai parameter untuk menentukan letak noda pada KLT adalah harga  $R_f$  yaitu hasil bagi jarak noda dari titik awal dengan jarak yang ditempuh pelarut dari titik awal.

$$R_f = \frac{\text{Jarak noda dari titik awal}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Setiap zat akan memiliki nilai Rf yang spesifik dengan fase gerak dan fase diam tertentu (Skoog, 1985)

## 2.8 Tinjauan tentang kanker payudara

Kanker payudara merupakan tumor ganas dan menduduki peringkat kedua setelah kanker leher rahim di antara kanker yang menyerang wanita Indonesia. Di Indonesia, prevalensi kanker payudara meningkat, jumlahnya mencapai 11,6 % dari seluruh keganasan. Prevalensi ini cenderung meningkat disebabkan perubahan pola hidup di antaranya perubahan pola makanan dengan mengkonsumsi lemak tinggi dan peningkatan kesadaran masyarakat tentang kesehatan serta kemajuan teknologi kedokteran di bidang diagnosis dini ([www.pitapink.com](http://www.pitapink.com), 2005).

Pada tahun 2006, kurang lebih 212.980 wanita di Amerika Serikat didiagnosis menderita kanker payudara. Meskipun kanker payudara pada pria jarang terjadi dan jumlahnya kurang dari satu persen, tahun ini telah terdiagnosa sebanyak 1300 pria menderita kanker payudara ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com), 2003).

Kanker payudara tergolong tumor ganas. Tumor ganas mempunyai sifat yang khas yaitu dapat menyebar luas ke bagian lain di seluruh tubuh untuk berkembang menjadi tumor yang baru. Penyebaran ini disebut metastase. Kanker memiliki karakteristik yang berbeda-beda. Ada yang tumbuh secara cepat, ada yang tumbuh tidak terlalu cepat, seperti kanker payudara. Khusus untuk kasus kanker payudara, sel kanker yang pertama dapat tumbuh menjadi tumor sebesar 1 cm pada waktu 8-12 tahun. Sel kanker tersebut diam pada kelenjar payudara ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com), 2003).

Sel-sel kanker payudara ini dapat menyebar melalui aliran darah ke seluruh tubuh. Sel kanker payudara dapat bersembunyi di dalam tubuh selama bertahun-tahun tanpa diketahui dan tiba-tiba aktif menjadi tumor ganas atau kanker. Pada tahap awal kanker payudara, penderita tidak

merasakan sakit atau tidak ada tanda-tandanya sama sekali. Namun, ketika tumor semakin membesar, akan timbul gejala-gejala seperti : benjolan yang tidak hilang atau permanen, biasanya tidak sakit dan terasa keras bila disentuh atau penebalan pada kulit payudara atau di sekitar ketiak; perubahan ukuran atau bentuk payudara; kerutan pada kulit payudara; keluarnya cairan dari payudara, umumnya berupa darah, nanah, cairan encer atau keluar air susu pada ibu yang tidak hamil atau tidak sedang menyusui; serta adanya pembengkakan atau tarikan pada puting susu ([www.pitapink.com](http://www.pitapink.com), 2005).

## 2.9 Tinjauan tentang antikanker

Obat antikanker adalah senyawa kemoterapeutik yang digunakan untuk pengobatan tumor yang membahayakan kehidupan. Obat antikanker sering diramalkan pula sebagai obat sitotoksik, sitostatik atau antineoplasma (Soekardjo, 2000). Obat antikanker yang ideal adalah yang mampu membunuh sel-sel kanker saja tanpa membahayakan sel-sel yang normal. Sampai saat ini belum ada obat yang mampu memenuhi kriteria tersebut. Oleh karena itu, penggunaan kliniknya dilakukan dengan memperhitungkan keuntungan atau kemanfaatannya dibandingkan efek toksisitasnya untuk dapat mencapai terapi yang optimal (Katzung, 1995).

Obat antikanker banyak yang bekerja dengan cara mempengaruhi metabolisme asam nukleat, terutama DNA atau biosintesis protein. Antikanker diharapkan memiliki toksisitas yang selektif, artinya menghancurkan tanpa merusak jaringan normal. Pada umumnya antineoplastik menekan pertumbuhan atau proliferasi sel dan menimbulkan toksisitas karena menghambat sel yang proliferasinya cepat seperti sumsum tulang, epitel geminativum, mukosa saluran cerna dan folikel rambut. Antikanker berhasil baik bila dosis yang digunakan dapat mematikan sel kanker dan tidak terlalu mengganggu sel normal yang berproliferasi (Nafrialdi dan Ganiswara, 1995).

Obat antikanker dapat mempengaruhi proses kehidupan sel. Proses kehidupan sel merupakan suatu siklus yang terdiri dari beberapa fase sebagai berikut :

1. Fase mitotik (M) : fase pembelahan sel aktif

Setelah melalui fase ini ada dua alternatif yaitu :

- a. Menuju fase G1 dan melalui proses proliferasi
- b. Masuk ke fase istirahat (Go), kemampuan sel untuk berproliferasi hilang dan sel meninggalkan siklus secara tak terpuhkan.

2. Fase post mitotik (G1), pada fase ini tidak terjadi sintesis DNA tetapi terjadi sintesis RNA dan protein. Pada akhir fase G1 terjadi sintesis RNA yang optimum.

3. Fase sintetik (S), pada fase ini terjadi replikasi DNA sel

4. Fase post sintetik (G2), fase ini dimulai bila sel sudah tetraploid dan mengandung 2 DNA, kemudian sintesis RNA dan protein dilanjutkan. Selanjutnya sel kembali ke fase mitotik, demikian seterusnya sehingga merupakan suatu siklus.

Obat antikanker dibagi menjadi lima kelompok yaitu senyawa pengalkilasi, antimetabolit, antikanker produk alam, hormon dan golongan lain.

1. Senyawa pengalkilasi

Senyawa pengalkilasi adalah senyawa reaktif yang dapat mengalkilasi ADN, ARN dan enzim-enzim tertentu. Senyawa ini terutama digunakan untuk pengobatan kanker pada jaringan limfoid dan sistem retikuloendotel, seperti limfosarkoma dan penyakit Hodgkin, leukemia limfositik dan mieloma.

Contoh : mekloreタミン, klorambusil, melfalan, busulfan.

2. Antimetabolit

Antimetabolit adalah senyawa yang dapat menghambat jalur metabolit yang penting untuk kehidupan dan reproduksi sel kanker, melalui penghambatan asam folat, purin, pirimidin dan asam amino, serta jalur nukleosida pirimidin, yang diperlukan pada sintesis ADN.

Contoh : antagonis pirimidin (5-fluorourasil, tegafur, sitarabin), antagonis purin (6-merkaptopurin, azatioprin, 6-tioguanin), antagonis asam folat (aminopterin, metotreksat, ketotreksat), antagonis asam amino (azaserin, DON).

### 3. Antikanker Produk Alam

Antikanker produk alam adalah senyawa yang dihasilkan dari produk alam dan berkhasiat sebagai antikanker.

Contoh : antibiotika antikanker (mitomisin C, daktinomisin, plikamisin), antikanker produk tanaman (vinblastin sulfat, vinkristin sulfat, etoposida), antikanker produk rekayasa genetika (antineoplaston, avaron, interferon  $\alpha$ -2a).

### 4. Hormon

Beberapa neoplasma dapat dikontrol dengan baik oleh hormon seks, seperti hormon androgen, progesterin dan estrogen serta hormon adrenokortikoid. Biasanya untuk pengobatan tambahan sesudah pembedahan, dikombinasi dengan obat antikanker yang lain.

Contoh : tamoksifen sitrat, flutamid, megestrol asetat.

### 5. Golongan Lain-Lain

Contoh : mitotan, L-Asparaginase, sisplatinum, hidroksiurea (Soekardjo, 2000).

## 2.10 Tinjauan tentang kultur sel

Kultur sel merupakan kultur yang diperoleh dari hasil dispersi sel jaringan hidup. Jaringan yang akan digunakan dipecah-pecah melalui proses enzimatis, kimiawi ataupun secara mekanis untuk menghasilkan suspensi sel, yang kemudian ditanam ke dalam media yang sesuai. Kultur ini disebut sebagai kultur sel primer. Hasil pembiakan secara berulang-ulang ataupun hasil transformasi dari kultur sel primer disebut *cell line*. Pemisahan kultur *cell line* berdasarkan karakteristik tertentu akan menghasilkan kelompok-kelompok tertentu yang disebut *strain cell* (Freshney, 1987).



Pada kultur sel, sel yang akan diteliti ditempatkan dalam wadah kultur yang memiliki permukaan pertumbuhan dan nutrisi yang cukup sebagai media kultur, 37°C, lingkungan gas (5 % CO<sub>2</sub> / 95 % O<sub>2</sub>) dan pH 7,4-7,7 (Spector, 1998).

Keuntungan penggunaan sistem kultur ini antara lain terletak pada segi kontrol lingkungan fisika kimia yang lebih tepat dan kondisi biologis yang relatif konstan. Selain itu karakterisasi dan homogenitas sampel dari sistem kultur sel jauh lebih baik dibandingkan jaringan hidup dari hewan. Secara ekonomi, penggunaan sistem kultur sel ini juga lebih menguntungkan karena pereaksi yang digunakan lebih sedikit, konsentrasi larutan uji lebih kecil dan bahan uji yang digunakan lebih sedikit (Freshney, 1987).

Di sisi lain, kerugian yang ditimbulkan dari kultur sel ini tidak sedikit. Diantaranya karena teknik ini harus dikerjakan pada kondisi aseptik sehingga memerlukan keahlian khusus. Selain itu, biaya yang dihabiskan dalam penelitian menggunakan kultur sel lebih banyak daripada bila dilakukan pada hewan coba (Freshney, 1987).

### BAB III

## METODOLOGI PENELITIAN

#### 1. Pembuatan Ekstrak

##### 1.1 Pembuatan Ekstrak Sambiloto

Herba sambiloto sebanyak 2 kg dicuci hingga bersih dan dikeringkan. Setelah kering kemudian diserbuk dan dibagi menjadi empat dengan berat masing-masing sebanyak 500 gram kemudian dimasukkan ke dalam toples dan ditambahkan ke dalamnya etanol 96% sebanyak 1,25 liter, aduk-aduk dan diamkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, saring larutan ekstrak dengan corong buchner dan lakukan penambahan etanol 96% kembali sebanyak 1,25 liter pada serbuk yang sudah disaring tersebut. Prosedur tersebut dilakukan sebanyak 5 kali untuk mendapatkan zat yang diinginkan dalam jumlah yang banyak, kemudian seluruh larutan ekstrak cair dicampur dan dipekatkan dengan rotavapor sampai didapatkan berat ekstrak kental sejumlah berat simplisia awal yang ditimbang. Ekstrak kental tersebut kemudian dikeringkan dengan menggunakan campuran Avicel dan Laktosa dengan perbandingan 1:4.

##### 1.2 Pembuatan Ekstrak Kunyit

Rimpang kunyit sebanyak 1,5 kg dibersihkan kemudian dipotong dan dikeringkan. Setelah kering kemudian diserbuk dan dibagi menjadi tiga dengan berat masing-masing sebanyak 500 gram kemudian dimasukkan ke dalam toples dan ditambahkan ke dalamnya etanol 96% sebanyak 1,25 liter, aduk-aduk dan diamkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, saring larutan ekstrak dengan corong buchner dan lakukan penambahan etanol 96% kembali sebanyak 1,25 liter pada serbuk yang sudah disaring tersebut. Prosedur tersebut dilakukan sebanyak 5 kali untuk mendapatkan zat yang diinginkan dalam jumlah yang banyak, kemudian seluruh larutan ekstrak cair dicampur dan dipekatkan dengan rotavapor sampai didapatkan berat ekstrak kental sejumlah berat simplisia awal yang ditimbang. Ekstrak kental tersebut kemudian dikeringkan dengan menggunakan campuran Avicel dan Laktosa dengan perbandingan 1:4.

### 1.3 Pencarian Formulasi Pengering

Dilakukan formulasi untuk pengering menggunakan avicel dan laktosa dengan berbagai persentase dan perbandingan. Diambil masing-masing ekstrak cair sebanyak 20 ml kemudian dilakukan formulasi sebagai berikut:

- Avicel : Laktosa perbandingan 1:4 sebanyak 10% dari ekstrak cair
- Avicel : Laktosa perbandingan 1:4 sebanyak 20% dari ekstrak cair
- Avicel : Laktosa perbandingan 1:4 sebanyak 25% dari ekstrak cair
- Avicel : Laktosa perbandingan 1:7 sebanyak 10% dari ekstrak cair
- Avicel : Laktosa perbandingan 1:7 sebanyak 20% dari ekstrak cair
- Avicel : Laktosa perbandingan 1:7 sebanyak 25% dari ekstrak cair
- Laktosa sebanyak 10% dari ekstrak cair
- Laktosa sebanyak 15% dari ekstrak cair
- Laktosa sebanyak 20% dari ekstrak cair

Dari perbandingan-perbandingan tersebut kemudian dipilih perbandingan yang terbaik untuk pengeringan ekstrak.

## 2. Validasi Metode HPLC untuk Penetapan Kadar Andrografolida dalam Ekstrak Sambiloto dan Kurkumin dalam Ekstrak Kunyit

Masing-masing ekstrak etanol sambiloto dan kunyit yang sudah pekat dikeringkan dengan menggunakan campuran Avicel dan Laktosa dengan perbandingan 1:4 sebanyak 20% dari volume ekstrak pekat dan ditetapkan kadarnya. Sebelum penetapan kadar, terlebih dahulu dilakukan validasi metode.

### 1. Penentuan Kondisi HPLC

Langkah awal untuk memilih kondisi yang sesuai untuk analisis adalah menelusuri kepustakaan yang ada. Setelah didapat publikasi tentang cara analisis dengan metode HPLC, maka langkah selanjutnya adalah melakukan modifikasi sesuai dengan kondisi dan kemampuan instrumen HPLC yang dimiliki.

Metode yang dijadikan acuan untuk analisis kadar andrografolida diambil dari penelitian yang pernah dilakukan oleh Aryani (2005). Kondisi yang digunakan dalam penelitian tersebut adalah:

Fase gerak = Metanol-Air  
 Detektor = UV-Vis Spektrofotometer  
 $\lambda$  = 228 nm  
 Kolom = RP C18  
 Flow rate = 1,0 ml/min

Berdasarkan penelitian Alianita dkk (2005), kondisi yang digunakan untuk analisis kadar andrografolida:

Fase gerak = Air-Asetonitril  
 Detektor = UV-Vis Spektrofotometer  
 $\lambda$  = 225 nm  
 Kolom = RP C18  
 Flow rate = 1,0 ml/min

Sedangkan metode yang dijadikan acuan untuk analisis kurkumin diambil dari penelitian yang pernah dilakukan oleh Jadhav *et al* (2007), kondisi yang digunakan dalam penelitian tersebut adalah:

Fase gerak = Asetonitril – 0,1% trifluoro-asam asetat (50:50)

Detektor = UV  
 $\lambda$  = 420 nm  
 Kolom = RP C18  
 Flow rate = 1,5 ml/min

Berdasarkan penelitian Taylor dan McDowell (2005), kondisi yang digunakan untuk analisis kadar kurkumin:

Fase gerak = Asetonitril-Air (55:45)  
 Detektor = Diode array  
 $\lambda$  = 425 nm  
 Kolom = RP C18  
 Flow rate = 1,0 ml/min

Maka kondisi yang digunakan untuk analisis kadar andrografolida dan kurkumin:

Fase gerak	= Metanol:Air (60:40) untuk andrografolida Asetonitril:Asam asetat 1% (50:50) untuk kurkumin
Detektor	= Diode array
Kolom	= RP C18
Flow rate	= 1,0 ml/min

## 2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Untuk analisis, digunakan instrumen HPLC. Untuk andrografolida, diinjeksikan larutan standar andrografolida 50 ppm dan 200 ppm sebanyak 100 µl ke dalam kolom HPLC kemudian dianalisis pada panjang gelombang 200-300 nm. Untuk kurkumin, diinjeksikan larutan standar kurkumin 50 ppm dan 200 ppm sebanyak 100 µl ke dalam kolom HPLC kemudian dianalisis pada panjang gelombang 400-500 nm.

## 3. Penentuan Fase Gerak

Eluasi secara isokratik, untuk andrografolida digunakan fase gerak metanol:air dan dicari perbandingan terbaik untuk pemisahan yang paling bagus. Untuk kurkumin digunakan fase gerak asetonitril:asam asetat 1% dan dicari perbandingan yang terbaik untuk pemisahan yang paling bagus.

Dari kromatogram yang didapatkan dipilih fase gerak yang memberikan pemisahan yang paling bagus baik untuk andrografolida maupun kurkumin.

## 4. Pembuatan Larutan Standar

Untuk andrografolida, dari larutan baku induk andrografolida 1000 ppm dibuat larutan baku kerja dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 180 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm.

Untuk kurkumin, dari larutan baku induk kurkumin 1000 ppm dibuat larutan baku kerja dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm.

#### 5. Linieritas

Linieritas dapat ditentukan dengan menginjektikan larutan standar andrografolida 100, 150, 180, 200, dan 250 ppm yang sudah disaring dengan membran filter 0,2  $\mu\text{m}$  pada kolom HPLC sebanyak 100  $\mu\text{l}$  pada panjang gelombang untuk kurkumin. Dari data yang diperoleh dapat dibuat persamaan baku senyawa andrografolida dan kurkumin antara kadar dengan area sehingga kadar yang terdapat dalam campuran ekstrak dapat dihitung.

#### 6. Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Masing-masing larutan baku andrografolida 5 ppm dan larutan baku kurkumin 5 ppm disaring dengan membran filter 0,2  $\mu\text{m}$  kemudian diinjeksikan pada HPLC pada kondisi terpilih, kemudian konsentrasi diperkecil hingga tinggi puncak tiga kali derau noise untuk LOD dan sepuluh kali derau noise untuk LOQ. Dari kromatogram yang diperoleh dihitung persamaan regresi antara konsentrasi dengan area puncak andrografolida dalam metanol serta koefisien korelasi. Dihitung batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ).

#### 7. Akurasi

Eksrak sambiloto ditimbang teliti 10,0 mg dimasukkan labu ukur 5,0 ml kemudian tambahkan baku andrografolida sebesar 30%, 50% dan 70% dari konsentrasi sampel kemudian ditambahkan pelarut metanol ad 5,0 ml. Demikian juga ekstrak kunyit ditimbang teliti 10,0 mg dimasukkan labu ukur 5,0 ml kemudian tambahkan baku kurkumin sebesar 30%, 50% dan 70% dari konsentrasi sampel kemudian ditambahkan pelarut metanol ad 5,0 ml. Sebelum ditambah metanol ad 5,0 ml, semua sampel digetarkan dengan ultasonik selama 10 menit, supernatan disaring menggunakan membran filter 0,2  $\mu\text{m}$  lalu

diinjeksikan ke HPLC pada kondisi terpilih sebanyak 100  $\mu$ l. Dibaca areanya. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

### 8. Presisi

Larutan baku andrografolida 100 ppm dan larutan baku kurkumin 100 ppm dalam pelarut metanol masing-masing diinjeksikan ke HPLC sebanyak 100  $\mu$ l, dan masing-masing dilakukan 10 kali. Dihitung harga KV.

## 3. Penetapan Kadar Andrografolida dan Kurkumin

### 3.1 Penetapan Kadar Andrografolida dalam Ekstrak Sambitoto

Ditimbang tiga sampel masing-masing sebanyak 10,0 mg ekstrak sambitoto kemudian dilarutkan dalam metanol ad volume 5,0 ml, sebelum semua sampel ditambahkan ad 5,0 ml, semua sampel digetarkan dengan ultrasonik selama 5 menit. Setelah diadkan, semua sampel disaring dengan membran filter 0,2  $\mu$ m kemudian masing-masing diinjeksikan pada kolom HPLC sebanyak 100  $\mu$ l.

Untuk andrografolida digunakan linearitas dengan konsentrasi larutan standar andrografolida 50, 70, 100, 150, dan 200 ppm yang sudah disaring dengan membran filter 0,2  $\mu$ m kemudian diinjeksikan pada kolom HPLC sebanyak 100  $\mu$ l.

Dari data yang diperoleh dapat dibuat persamaan baku senyawa andrografolida antara kadar dengan area sehingga kadar yang terdapat dalam ekstrak sambitoto dapat dihitung.

### 3.2 Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Kunyit

Ditimbang tiga sampel masing-masing sebanyak 10,0 mg ekstrak kunyit kemudian dilarutkan dalam metanol ad volume 5,0 ml, sebelum semua sampel ditambahkan ad 5,0 ml, semua sampel digetarkan dengan ultrasonik selama 5 menit. Setelah diadkan, semua sampel disaring dengan membran filter 0,2  $\mu$ m kemudian diinjeksikan pada kolom HPLC sebanyak 100  $\mu$ l.

Linderitas dapat ditentukan dengan menginjektikan larutan estandar 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm yang sudah disaring dengan membran filter 0,2  $\mu\text{m}$  pada kolom HPLC sebanyak 100  $\mu\text{l}$ .

Dari data yang diperoleh dapat dibuat persamaan baku senyawa kurkumin antara kadar dengan area sehingga kadar kurkumin yang terdapat dalam ekstrak kunyit dapat dihitung.

#### 4. Pembuatan Kapsul

Ekstrak sambiloto dan kunyit yang telah ditentukan kadarnya kemudian dicampur dan dimasukkan ke dalam kapsul. Berikut perhitungan dosis untuk kapsul. Untuk sediaan fitofarmaka ini dibuat dalam bentuk sediaan kapsul dengan dosis 90 mg andrografolida dan 90 mg kurkumin per hari, dan diminum sehari tiga kali dengan dosis 30 mg andrografolida dan 30 mg kurkumin untuk sekali minum. Dosis yang digunakan mengacu pada literatur-literatur yang ditemukan. Karena belum ditemukan dosis yang tepat untuk antikanker termasuk antikanker payudara maka digunakan pendekatan menggunakan dosis untuk *respiratory track* yaitu 30 mg andrografolida per hari. Diharapkan dengan peningkatan kadar andrografolida sebanyak 3 kali dan dengan adanya efek sinergisme dengan kurkumin dapat menghasilkan efek antikanker payudara yang memadai.

Total jumlah campuran ekstrak sambiloto dan kunyit untuk dosis masing-masing 30 mg andrografolida dan kurkumin yaitu 778,8 mg. Diperlukan kapsul ukuran 00 untuk 778,8 mg ekstrak campuran, sedangkan ukuran kapsul 00 terlalu besar sehingga tidak aseptabel.

Maka dari itu, setiap sediaan kapsul dibuat dengan dosis setengahnya yaitu andrografolida dan kurkumin masing-masing 15 mg. Sehingga sekali minum, diminum dua kapsul.

Untuk mendapatkan kadar andrografolida 15 mg dari ekstrak sambiloto dengan kadar 8,13% maka dibutuhkan ekstrak sambiloto sebanyak:



$$= \frac{100}{8,13} \times 15 \text{ mg}$$

$$= 184,5 \text{ mg ekstrak sambiloto}$$

Untuk mendapatkan kadar kurkumin 15 mg dari ekstrak kunyit dengan kadar 7,32% maka dibutuhkan ekstrak sambiloto sebanyak:

$$= \frac{100}{7,32} \times 15 \text{ mg}$$

$$= 204,9 \text{ mg ekstrak kunyit}$$

Total jumlah campuran ekstrak etanol herba sambiloto dengan rimpang kunyit yang dibutuhkan adalah  $184,5 \text{ mg} + 204,9 \text{ mg} = 389,4 \text{ mg}$ .

Sediaan kapsul dimasukkan ke dalam kapsul berukuran 1.

## 5. Pengujian Mutu Fisik Kapsul

### 5.1 Keseragaman Bobot Sediaan Kapsul

Prosedur keseragaman bobot kapsul:

Ditimbang 20 kapsul. Kemudian ditimbang lagi kapsul satu per satu. Dikeluarkan isi semua kapsul, kemudian ditimbang seluruh bagian cangkang kapsul, dihitung bobot isi kapsul dan bobot rata-rata tiap isi kapsul. Perbedaan dalam persen bobot isi tiap kapsul terhadap bobot rata-rata tiap isi kapsul tidak boleh lebih dari yang ditetapkan kolom A dan untuk setiap 2 kapsul tidak lebih dari yang ditetapkan kolom B.

### 5.2 Uji Waktu Hancur Sediaan Kapsul

#### a. Pembuatan Media Uji Waktu Hancur

Media uji waktu hancur yang digunakan adalah air dengan suhu media diatur konstan  $37^\circ \pm 2^\circ \text{ C}$ .

#### b. Prosedur Uji Waktu Hancur

Dimasukkan 1 kapsul pada masing-masing tabung dari keranjang, dimasukkan 1 kasa berukuran 10 mesh pada tiap tabung dan jalankan

alat, digunakan air dengan suhu media diatur konstan  $37^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ . Diamati kapsul dalam batas waktu 15 menit. Semua kapsul harus hancur, kecuali bagian dari cangkang kapsul. Bila 2 kapsul tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan 12 kapsul lainnya: tidak kurang 16 dari 18 kapsul yang diuji harus hancur sempurna. Waktu untuk pengujian waktu hancur kapsul tidak boleh lebih dari 15 menit.

#### **6. Keseragaman Kandungan Sediaan Kapsul**

Diambil 10 sambilan kapsul secara acak dan dihitung rata-ratanya. Dikeluarkan isinya dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml, ditambah metanol ad tanda. Sebelumnya ditambah metanol ad 100,0 ml, semua sampel digetarkan dengan ultrasonik selama 5 menit dan dipanaskan di water bath pada suhu  $50^{\circ} \text{C}$  selama 10 menit, supernatan disaring menggunakan membran filter  $0,2 \mu\text{m}$  lalu diinjeksikan ke HPLC pada kondisi terpilih sebanyak 100  $\mu\text{l}$ . Ditetapkan kadarnya satu per satu dengan anggapan bahwa zat aktif terdistribusi secara homogen. Dengan persyaratan keseragaman kandungan dipenuhi jika jumlah zat aktif dalam masing-masing dari 10 satuan sediaan seperti yang ditetapkan dari cara keseragaman bobot terletak antara 85,0% hingga 115,0% dari yang tertera pada etiket dan tidak ada satupun terletak di luar rentang 75,0% hingga 125,0% yang tertera pada etiket serta simpangan baku relatif dari 10 satuan sediaan kurang dari atau sama dengan 6,0%.

#### **7. Uji Disolusi Sediaan Kapsul**

##### **a. Pembuatan Media Disolusi**

Media disolusi yang digunakan adalah cairan lambung buatan tanpa peptin.

Cara pembuatan media cairan lambung:

2,0 gram NaCl dilarutkan dalam 7,0 ml HCl dan air secukupnya hingga 1000 ml. Larutan mempunyai pH lebih kurang 1,2.

#### b. Penentuan Disolusi

Ke dalam bejana disolusi dimasukkan 900 ml cairan lambung buatan sebagai media disolusinya, suhu media diatur konstan  $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$  C.

Dua buah kapsul dimasukkan ke dalam bejana yang berisi media disolusi, pengadukan dilakukan dengan basket kemudian basket diturunkan hingga  $2,5 \pm 0,2$  cm di atas alas bejana, selanjutnya basket diputar 100 rpm. Kemudian diambil 5 ml dengan spuit injeksi pada menit ke 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, dan 180. Pengambilan sampel pada daerah antara alas bejana dan alas basket dan tidak kurang 1 cm dari dinding bejana. Setiap kali pengambilan 5 ml sampel, ditambahkan 5 ml media disolusi dengan suhu yang sama ke dalam bejana (USP, 2000). Kemudian dilakukan penetapan kadar masing-masing cuplikan sampel dengan menggunakan HPLC.

#### 8. Penentuan dosis pada kelinci

Dosis ekstrak sambiloto yang banyak digunakan pada berbagai penelitian

adalah 1000-2000 mg/hari dalam tiga dosis terbagi, dengan kadar andrografolida

dalam ekstrak sambiloto berkisar antara 4-6% (Anonim, 2008). Hasil penelitian

Anggraini (2007), menyatakan bahwa campuran andrografolida dan kurkumin dengan perbandingan 1:1 terbukti potensial terhadap sel kanker manusia T47D secara *in vitro*.

Berdasarkan data tersebut, maka untuk pelaksanaan pengujian bioavailabilitas digunakan dosis campuran ekstrak sambiloto dan kunyit yang setara dengan andrografolida dan kurkumin masing-masing 6,3 mg. Dicoba dosis efektif andrografolida sebagai antikanker pada manusia ialah 90 mg per hari. Konversi dosis dari manusia berat 70 kg ke kelinci dengan berat 1,5 kg adalah 0,07.

Dosis pakai andrografolida :

Untuk setiap manusia : 15 mg/ kapsul

Untuk setiap kelinci 1,5 kg :  $0,07 \times 90 \text{ mg} = 6,3 \text{ mg}$

Dicoba dosis efektif kurkumin sebagai antikanker pada manusia ialah 90 mg per hari.

Dosis pakai kurkumin :

Untuk setiap manusia : 15 mg/kapsul

Untuk setiap kelinci 1,5 kg :  $0,07 \times 90 \text{ mg} = 6,3 \text{ mg}$

## 9. Hewan percobaan

Hewan coba yang digunakan adalah 3 ekor kelinci jantan, jenis *New Zealand*, umur 4 bulan, dengan berat badan pada tabel IV.1

Tabel IV.1 Berat badan kelinci

Kelinci	Berat badan (kg)
I	1,727
II	1,967
III	1,809
A	1,569
B	1,801
C	1,751

Keterangan: Kelinci I, II, III untuk penentuan kadar kurkumin  
Kelinci A, B, C untuk penentuan kadar andrografolida

## 10. Preparasi sampel darah menjadi serum

Diambil jarum suntik lalu diambil darah blangko sebanyak 7 ml dari vena marginal telinga kelinci dan dimasukkan ke *venoject* lalu didiamkan 1 jam hingga darah memisah dan disentrifuse 5900 rpm selama 15 menit, setelah itu diambil supernatannya. Supernatan inilah serum, bila tidak langsung dipreparasi, maka serum disimpan di lemari es (*freezer*).

### 1. Preparasi sampel andrografolida

Dibuat standar dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25, 40  $\mu\text{g/ml}$ .  
Diambil serum blangko 400  $\mu\text{l}$  dan masing-masing ditambah dengan 400  $\mu\text{l}$  metanol lalu divortex selama 5 menit dengan

kecepatan 1400 rpm, setelah itu disentrifuse 5900 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifuse diambil bagian atasnya dan ditambah 1000  $\mu$ l standar lalu divortex selama 5 menit dengan kecepatan 1400 rpm dan disentrifuse 5900 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifuse diambil bagian atasnya lalu disaring dengan membran filter Whatman 0,22  $\mu$ m dan siap disuntikkan ke HPLC.

## 2. Preparasi sampel kurkumin

Dibuat standar dengan konsentrasi 25, 28, 30, 35, 40  $\mu$ g/ml. Diambil serum blangko 400  $\mu$ l lalu ditambah 500  $\mu$ l pelarut campur dengan perbandingan etil asetat : metanol = 95:5 (v/v), kemudian divortex 5 menit dengan kecepatan 1400 rpm dan disentrifuse 5900 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifuse, diambil bagian atasnya dan dipindahkan ke eppendorf baru lalu ditambah standar 500  $\mu$ l lalu divortex 5 menit dengan kecepatan 1400 rpm kemudian diuapkan, setelah kering masing-masing ditambah dengan 500  $\mu$ l campuran fase gerak lalu divortex 5 menit dan disentrifuse 5900 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifuse tersebut disaring dengan membran filter Whatman 0,22  $\mu$ m setelah itu disuntikkan ke HPLC.

## 11. Penetapan kadar campuran andrografolida dan kurkumin dalam campuran ekstrak sambiloto dan kunyit

### 11.1 Validasi metode HPLC

Langkah awal untuk memilih kondisi yang sesuai untuk analisis adalah menelusuri kepustakaan yang ada. Setelah didapat publikasi tentang cara analisis dengan metode HPLC, maka langkah selanjutnya ialah melakukan modifikasi sesuai dengan kondisi dan kemampuan instrumen HPLC yang dimiliki.

Metode terpilih dalam penentuan kadar andrografolida dengan Instrumen HPLC Agilent 1100 series :

Fase gerak = Metanol - air (60 : 40)

Detektor = Diode Array Detector

$\lambda$  = andrografolida (230 nm)

Kolom = Nucleodur RP C18 (150 x 4,0 mm x 5 $\mu$ m)

Flow rate = 1,0 ml/min

Metode terpilih dalam penentuan kadar kurkumin dengan Instrumen HPLC Agilent 1100 series :

Fase gerak = Asetonitril - asam asetat 1% (50 : 50)

Detektor = Diode Array Detector

$\lambda$  = Kurkumin (425 nm)

Kolom = Nucleodur RP C18 (150 x 4,0 mm x 5 $\mu$ m)

Flow rate = 1,0 ml/min

### 11.2 Pembuatan larutan standar andrografolida

1. Dibuat larutan baku induk andrografolida dengan cara ditimbang standar andrografolida 10,0 mg, kemudian dilarutkan dalam labu ukur 10,0 ml (1000 ppm).
2. Dari baku induk 1000 ppm dibuat larutan baku kerja dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25, 40 ppm.
  - a. Larutan baku kerja 10 ppm  
Dipipet 10  $\mu$ l larutan baku induk 1000 ppm ditambah metanol 990  $\mu$ l
  - b. Larutan baku kerja 15 ppm  
Dipipet 15  $\mu$ l larutan baku induk 1000 ppm ditambah metanol 985  $\mu$ l
  - c. Larutan baku kerja 20 ppm  
Dipipet 20  $\mu$ l larutan baku induk 1000 ppm ditambah metanol 980  $\mu$ l
  - d. Larutan baku kerja 25 ppm  
Dipipet 25  $\mu$ l larutan baku induk 1000 ppm ditambah metanol 975  $\mu$ l
  - e. Larutan baku kerja 40 ppm  
Dipipet 40  $\mu$ l larutan baku induk 1000 ppm ditambah metanol 960  $\mu$ l

### 11.3 Penentuan panjang gelombang maksimum andrografolida

Disuntikkan standar andrografolida dengan konsentrasi 40 ppm sebanyak 100  $\mu$ l ke dalam kolom HPLC dan dianalisis pada  $\lambda$  200-300 nm. Hasil analisis menunjukkan  $\lambda$  230 nm memberikan serapan terbesar sehingga digunakan untuk pengamatan andrografolida selanjutnya.

#### 11.4 Linieritas andrografolida

Larutan baku kerja konsentrasi 10, 15, 20, 25, 40 ppm disuntikkan pada kolom HPLC sebanyak 100  $\mu$ l yang terlebih dahulu disaring dengan membran filter *Whatman* ukuran pori 0,22  $\mu$ m, diameter 13 mm.

Dari data yang diperoleh dapat dibuat persamaan baku, antara konsentrasi dengan area sehingga konsentrasi yang terdapat dalam campuran ekstrak dapat dihitung.

#### 11.5 Penetapan kembali kadar andrografolida yang ditambahkan dalam darah (akurasi)

Untuk menentukan kembali kadar andrografolida dalam serum (akurasi), dibuat larutan andrografolida hasil ekstraksi dari serum kosong yang sengaja ditambahkan andrografolida hingga dihasilkan larutan dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25, 40  $\mu$ g/ml, setelah itu disuntikkan ke dalam kolom HPLC sebanyak 100  $\mu$ l. Dari hasil pengamatan dihitung persen akurasi dan ditentukan persamaan akurasi.

#### 11.6 Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) andrografolida

##### 1. Penentuan LOD dilakukan dengan:

Disuntikkan standar andrografolida dalam serum dengan konsentrasi kecil dan diperkecil lagi sampai tidak memberikan puncak yang tingginya 3 kali *derau noise*.

##### 2. Penentuan LOQ dilakukan dengan:

Disuntikkan standar andrografolida dalam serum dengan konsentrasi kecil dan diperkecil lagi sampai tidak memberikan puncak yang tingginya 10 kali *derau noise*.

#### 11.7 Presisi andrografolida

- a. Diambil larutan baku kerja konsentrasi 40 ppm yang sudah ditambah serum blangko 400  $\mu$ l hasil dari pembuatan akurasi.

- b. Campuran tersebut disaring dengan membran filter *Whatman* lalu diinjeksikan ke HPLC 100  $\mu$ l sebanyak 6 kali.

### 11.8 Penetapan kadar andrografolida dalam sampel

Sampel darah diambil tiap interval waktu 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 480 menit sebanyak 1 ml dan dianalisis sesuai dengan prosedur preparasi sampel setelah itu diinjeksikan ke HPLC. Dari hasil pengamatan luas area kromatogram dapat dihitung kadar andrografolida dengan menggunakan persamaan akurasi.

### 11.9 Pembuatan larutan standar kurkumin

1. Dibuat larutan baku induk kurkumin dengan cara ditimbang standar kurkumin 10,0 mg, kemudian dilarutkan dalam labu ukur 10,0 ml (1000 ppm).
2. Dari baku induk 1000 ppm dibuat larutan baku kerja dengan konsentrasi 25, 28, 30, 35, 40  $\mu$ g/ml
  - a. Larutan baku kerja 25 ppm  
Dipipet 25  $\mu$ l larutan baku induk 1000 ppm ditambah metanol 975  $\mu$ l
  - b. Larutan baku kerja 28 ppm  
Dipipet 28  $\mu$ l larutan baku induk 1000 ppm ditambah metanol 972  $\mu$ l
  - c. Larutan baku kerja 30 ppm  
Dipipet 30  $\mu$ l larutan baku induk 1000 ppm ditambah metanol 970  $\mu$ l
  - d. Larutan baku kerja 35 ppm  
Dipipet 35  $\mu$ l larutan baku induk 1000 ppm ditambah metanol 965  $\mu$ l
  - e. Larutan baku kerja 40 ppm  
Dipipet 40  $\mu$ l larutan baku induk 1000 ppm ditambah metanol 960  $\mu$ l



### 11.10 Penentuan panjang gelombang maksimum kurkumin

Disuntikkan standar kurkumin dengan konsentrasi 40 ppm sebanyak 100 µl ke dalam kolom HPLC dan dianalisis pada  $\lambda$  300-500 nm. Hasil analisis menunjukkan  $\lambda$  425 nm memberikan serapan terbesar sehingga digunakan untuk pengamatan kurkumin selanjutnya.

### 11.11 Linieritas kurkumin

Larutan baku kerja kurkumin konsentrasi 25, 28, 30, 35, 40 ppm disuntikkan pada kolom HPLC sebanyak 100 µl yang terlebih dahulu disaring dengan membran filter *Whatman* ukuran pori 0,22 µm, diameter 13 mm.

Dari data yang diperoleh dapat dibuat persamaan baku, antara konsentrasi dengan area sehingga konsentrasi kurkumin yang terdapat dalam campuran ekstrak dapat dihitung.

### 11.12 Penetapan kembali kadar kurkumin yang ditambahkan dalam darah (akurasi)

Untuk menentukan kembali kadar kurkumin dalam serum (akurasi), dibuat larutan kurkumin hasil ekstraksi dari serum kosong yang sengaja ditambahkan kurkumin hingga dihasilkan larutan dengan konsentrasi 25, 28, 30, 35, 40 µg/ml. Kemudian dilakukan penyuntikan analit ke dalam kolom HPLC sebanyak 100 µl. Dari hasil pengamatan dihitung persen akurasi dan ditentukan persamaan akurasi.

### 11.13 Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) kurkumin

Penentuan LOD dilakukan dengan:

1. Disuntikkan standar kurkumin dalam serum dengan konsentrasi terkecil dan diperkecil lagi sampai tidak memberikan puncak yang tingginya 3 kali *derau noise*.
2. Penentuan LOQ dilakukan dengan:

Disuntikkan standar kurkumin dalam serum dengan konsentrasi terkecil dan diperkecil lagi sampai tidak memberikan puncak yang tingginya 10 kali *derau noise*.

#### 11.14 Presisi kurkumin

- a. Diambil larutan baku kerja konsentrasi 40 ppm yang sudah ditambah serum blanko 400 µl hasil dari pembuatan akurasi.
- b. Campuran tersebut disaring dengan membran filter Whatman lalu diinjeksikan ke HPLC 100 µl sebanyak 6 kali.

#### 11.15 Penetapan kadar kurkumin dalam sampel

Sampel darah diambil tiap interval waktu 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 480 menit dan dianalisis sesuai dengan prosedur preparasi sampel setelah itu diinjeksikan ke HPLC. Dari hasil pengamatan luas area kromatogram dihitung kadar kurkumin dengan menggunakan persamaan akurasi.

#### 11.16 Analisis data

Parameter yang akan ditentukan ialah waktu obat mencapai kadar maksimum ( $t_{maks}$ ), kadar obat maksimum ( $C_{maks}$ ), dan luas area di bawah kurva (AUC).

##### 1. $t_{maks}$

$t_{maks}$  ditentukan dengan melihat waktu yang diperlukan andrografolida/ kurkumin untuk mencapai kadar maksimum dalam darah.

##### 2. $C_{maks}$

$C_{maks}$  ditentukan dengan melihat kadar andrografolida/kurkumin saat mencapai  $t_{maks}$ .

##### 3. AUC

Luas area di bawah kurva pada setiap selang waktu dapat dihitung berdasarkan rumus di bawah ini:

$$AUC_0^{480} = \frac{C_n - 1 + C_n (t_n - (n-1))}{2}$$

**Keterangan:**

**AUC** = area di bawah kurva

**$t_n$**  = waktu pengamatan dari konsentrasi obat  $C_n$

**$t_{n-1}$**  = waktu pengamatan sebelumnya yang berhubungan dengan konsentrasi obat  $C_{n-1}$

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

#### 1. Validasi Metode untuk Penetapan Kadar Andrografolida dan Kurkumin dalam Campuran Ekstrak Sambiloto dan Kunyit

##### 1.1 Kondisi HPLC yang Digunakan

###### 1.1.1 Kondisi HPLC untuk Andrografolida

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis andrografolida adalah 230 nm. Larutan andrografolida dalam sampel adisi standar andrografolida 15,0 ppm berbagai komposisi fase gerak metanol:air disuntikkan ke gerbang suntik pada HPLC. Kemudian dilakukan *match factor* senyawa andrografolida sehingga dapat diketahui posisi senyawa andrografolida dalam sampel tersebut.

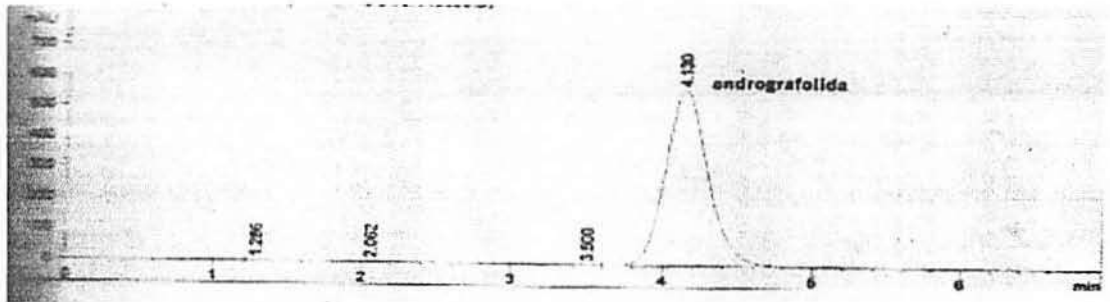
Waktu tambat larutan andrografolida dalam sampel yang diadisi standar andrografolida 15,0 ppm dengan berbagai komposisi fase gerak metanol:air dapat dilihat pada gambar 1, 2, 3 dan tabel 1.



**Gambar 1** Kromatogram larutan andrografolida dalam sampel yang diadisi standar andrografolida 15,0 ppm dengan panjang gelombang 230 nm, fase gerak metanol:air 50:50, aliran 1 ml/menit

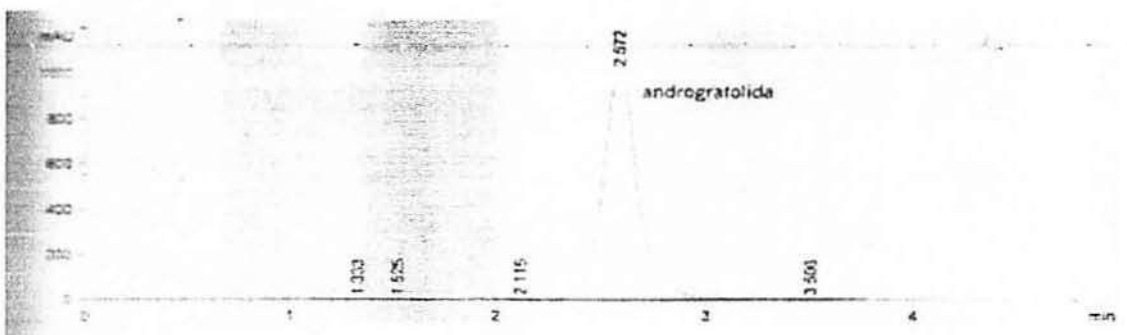
Pada perbandingan fase gerak metanol:air 50:50, dilakukan *match factor* puncak pada menit ke 7,745 dan didapatkan bahwa puncak tersebut adalah senyawa andrografolida dengan kecocokan 999,7792. Didapatkan hasil  $t_R$  andrografolida (waktu

tambat) 7,745 menit, dengan faktor keterpisahan 1,17 dan faktor selektivitas 2,52.



**Gambar 2** Kromatogram larutan andrografolida dalam sampel yang diadisi standar andrografolida 15,0 ppm dengan panjang gelombang 230 nm, fase gerak metanol:air 60:40, aliran 1 ml/menit

Pada perbandingan fase gerak metanol:air 60:40, dilakukan *match factor* puncak pada menit ke 4,130 dan didapatkan bahwa puncak tersebut adalah senyawa andrografolida dengan kecocokan 999,7143. Didapatkan hasil  $t_R$  andrografolida (waktuambat) 4,130 menit, dengan faktor keterpisahan 1,18 dan faktor selektivitas 1,52.



**Gambar 3** Kromatogram larutan andrografolida dalam sampel yang diadisi standar andrografolida 15,0 ppm dengan panjang gelombang 230 nm, fase gerak metanol:air 70:30, aliran 1 ml/menit

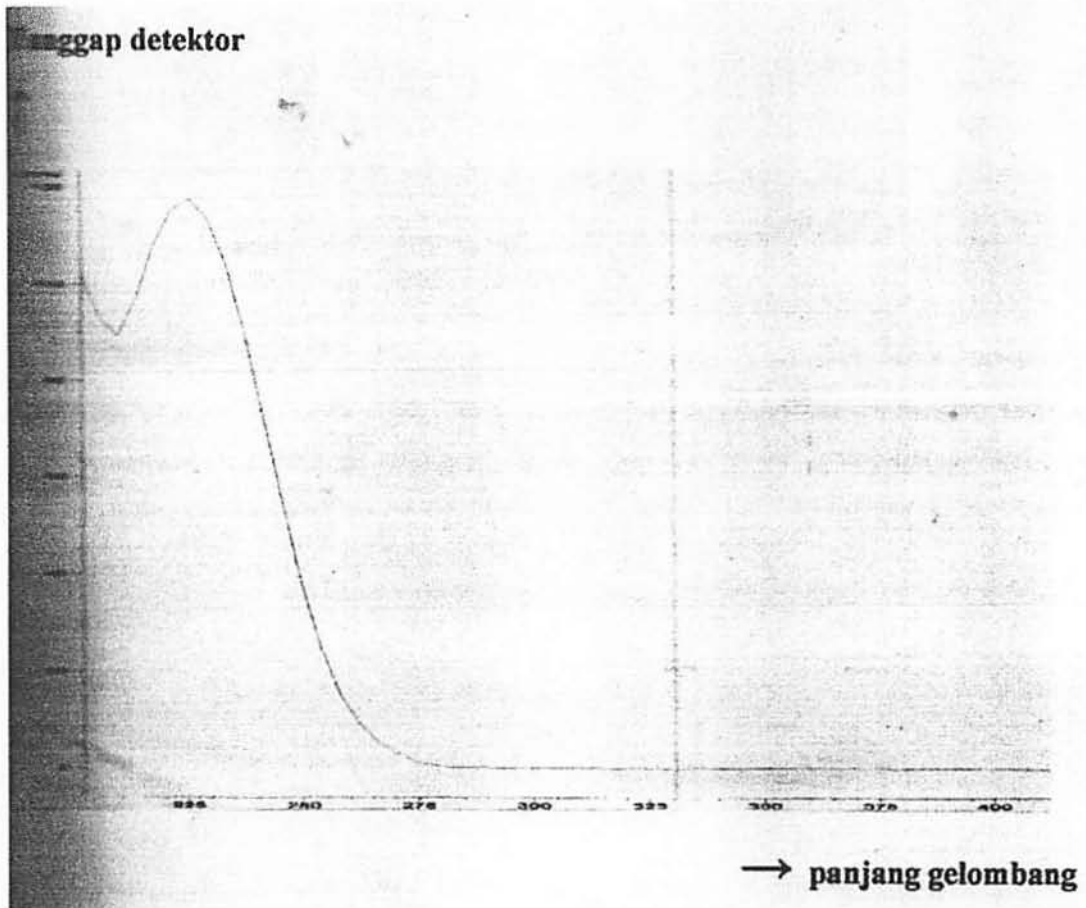
Pada perbandingan fase gerak metanol:air 70:30, dilakukan *match factor* puncak pada menit ke 2,572 dan didapatkan bahwa puncak tersebut adalah senyawa andrografolida dengan kecocokan 999,5535. Didapatkan hasil  $t_R$  andrografolida (waktu tambal) 2,572 menit, dengan faktor keterpisahan 1,36 dan faktor selektivitas 2,53.

Dari data di atas dapat diketahui bahwa pemisahan puncak andrografolida memiliki harga  $\alpha > 1$  dan  $R_s$  1-1,5, hal ini berarti dari uji  $R_s$  kondisi ini telah memenuhi syarat (Munson, 1991). Dari data di atas, fase gerak metanol:air 60:40 dipilih sebagai fase gerak untuk analisis karena telah memenuhi persyaratan  $R_s = 1,52$  dan  $\alpha = 1,18$  serta waktu yang efisien yaitu memiliki  $t_R$  sekitar 4 menit (pada perbandingan 50:50, waktu kurang efisien karena terlalu lama yaitu 7-8 menit). Ringkasan data dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1 Harga waktu tambal, faktor selektivitas ( $\alpha$ ) dan factor keterpisahan ( $R_s$ ) larutan andrografolida**

Fase gerak Metanol:air	$t_R$ andrografolida (menit)	Faktor selektivitas ( $\alpha$ )	Faktor keterpisahan ( $R_s$ )
50:50	7,745	1,17	2,52
60:40	4,130	1,18	1,52
70:30	2,572	1,36	2,53

Kemudian dilakukan penentuan spectra absorpsi andrografolida dengan hasil yang dapat dilihat pada gambar 4.

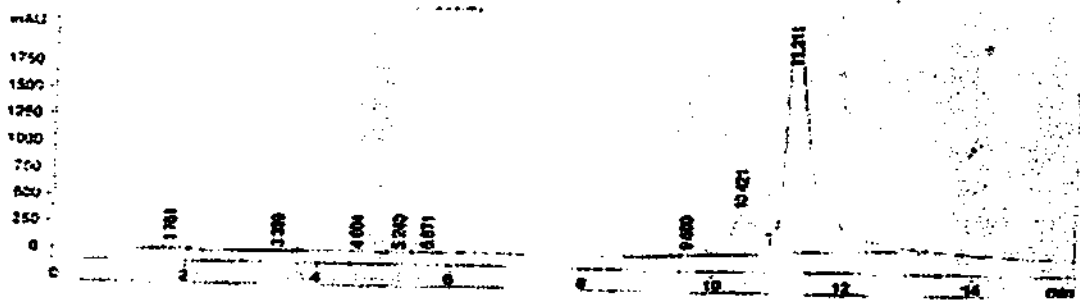


**Gambar 4 Profil spektra absorpsi andrografolida dalam metanol**

#### 1.1.2 Kondisi HPLC untuk Kurkumin

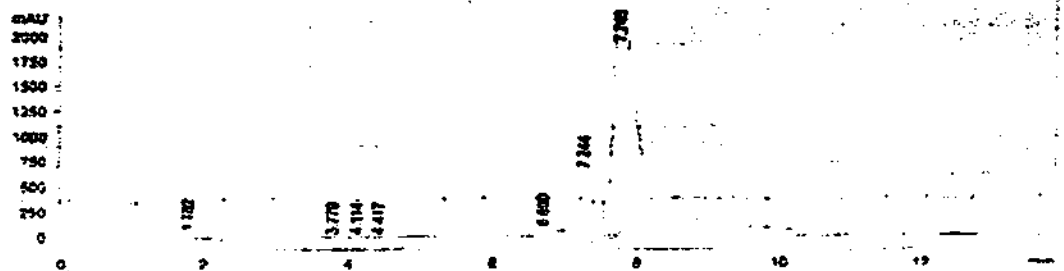
Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kurkumin adalah 425 nm. Larutan kurkumin dalam sampel adisi standar kurkumin 20,0 ppm berbagai komposisi fase gerak asetoneitril:asam asetat 1% disuntikkan ke gerbang suntik pada HPLC. Kemudian dilakukan *match factor* senyawa kurkumin sehingga dapat diketahui posisi senyawa kurkumin dalam sampel tersebut.

Waktu tambat larutan kurkumin dalam sampel yang diadisi standar kurkumin 20,0 ppm dengan berbagai komposisi fase gerak asetoneitril:asam asetat 1% dapat dilihat pada gambar 5, 6, 7 dan tabel 2.



**Gambar 5** Kromatogram larutan kurkumin dalam sampel yang diadisi standar kurkumin 20,0 ppm dengan panjang gelombang 425 nm, fase gerak asetonitril:asam asetat 1% 50:50, aliran 1 ml/menit

Pada perbandingan fase gerak asetonitril:asam asetat 1% 50:50, dilakukan *match factor* puncak pada menit ke 11,211 dan didapatkan bahwa puncak tersebut adalah senyawa kurkumin dengan kecocokan 999,7283. Didapatkan hasil  $t_R$  kurkumin (waktu tambat) 11,211 menit, dengan faktor keterpisahan 1,08 dan faktor selektivitas 1,07.

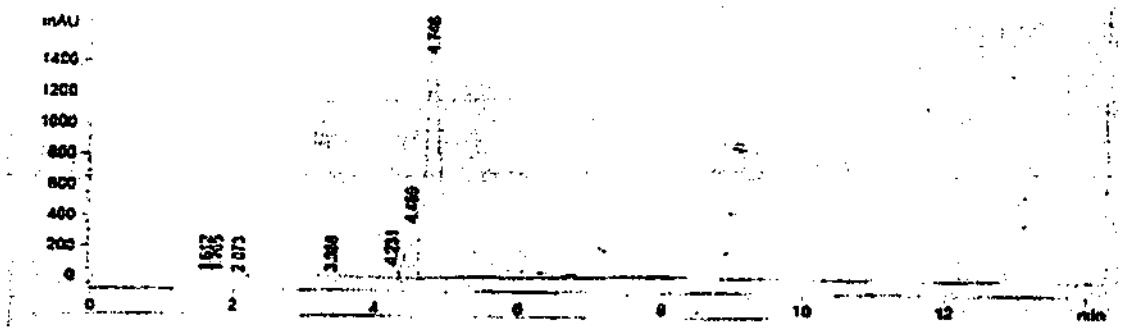


**Gambar 6** Kromatogram larutan kurkumin dalam sampel yang diadisi standar kurkumin 20,0 ppm dengan panjang gelombang 425 nm, fase gerak asetonitril:asam asetat 1% 55:45, aliran 1 ml/menit

Pada perbandingan fase gerak asetonitril:asam asetat 1% 55:45, dilakukan *match factor* puncak pada menit ke 7,745 dan didapatkan bahwa puncak tersebut adalah senyawa kurkumin dengan kecocokan 999,5962. Didapatkan hasil  $t_R$  kurkumin (waktu



tambat) 7,745 menit, dengan faktor keterpisahan 1,07 dan faktor selektivitas 0,81.



**Gambar 7** Kromatogram larutan kurkumin dalam sampel yang diadisi standar kurkumin 20,0 ppm dengan panjang gelombang 425 nm, fase gerak asetonitril:asam asetat 1% 65:35, aliran 1 ml/menit

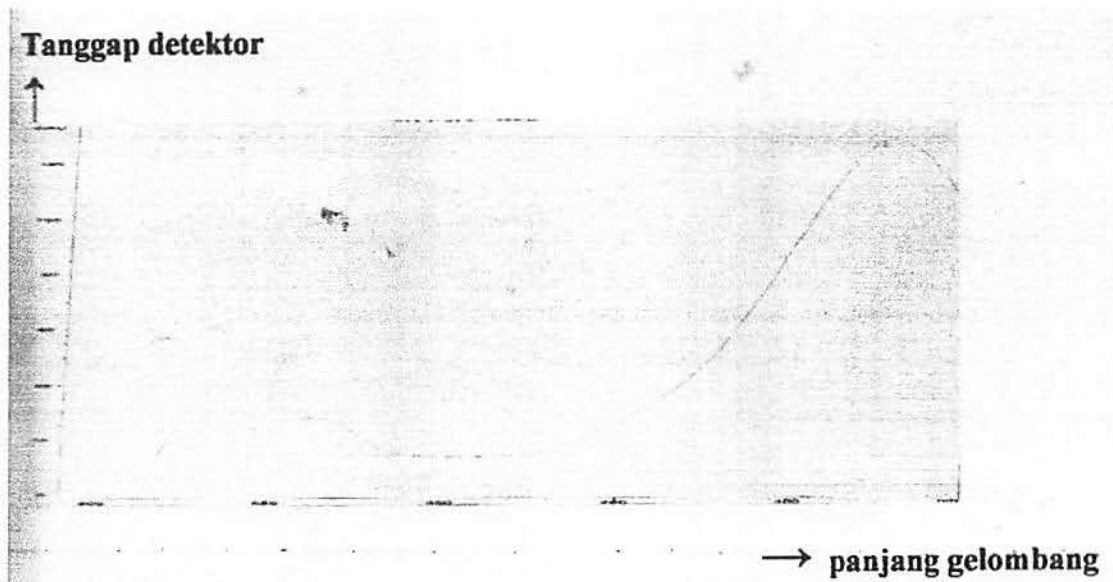
Pada perbandingan fase gerak asetonitril:asam asetat 1% 65:35, dilakukan *match factor* puncak pada menit ke 4,748 dan didapatkan bahwa puncak tersebut adalah senyawa kurkumin dengan kecocokan 999,5839. Didapatkan hasil  $t_R$  kurkumin (waktuambat) 4,748 menit, dengan faktor keterpisahan 1,06 dan faktor selektivitas 0,86.

Dari data di atas dapat diketahui bahwa pemisahan puncak kurkumin dengan fase gerak asetonitril:asam asetat 1% 50:50 memiliki harga  $\alpha > 1$  yaitu 1,08 dan  $R_s$  1-1,5 yaitu  $R_s=1,07$ , hal ini berarti dari uji  $R_s$  kondisi ini telah memenuhi syarat (Munson, 1991). Maka fase gerak asetonitril:asam asetat 1% 50:50 yang dipilih untuk analisis. Ringkasan data dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2** Harga waktu tambat, faktor selektivitas ( $\alpha$ ) dan factor keterpisahan ( $R_s$ ) larutan kurkumin

Fase gerak	$t_R$ kurkumin (menit)	Faktor selektivitas ( $\alpha$ )	Faktor keterpisahan ( $R_s$ )
etonitri:asam asetat 1%			
50:50	11,211	1,08	1,07
55:45	7,745	1,07	0,81
65:35	4,748	1,06	0,86

Kemudian dilakukan penentuan spectra absorpsi kurkumin dengan hasil yang dapat dilihat pada gambar 8.



**Gambar 8** Profil spektra absorpsi kurkumin dalam metanol

## 1.2 Linearitas

### 1.2.1 Linearitas untuk Keseragaman Kandungan

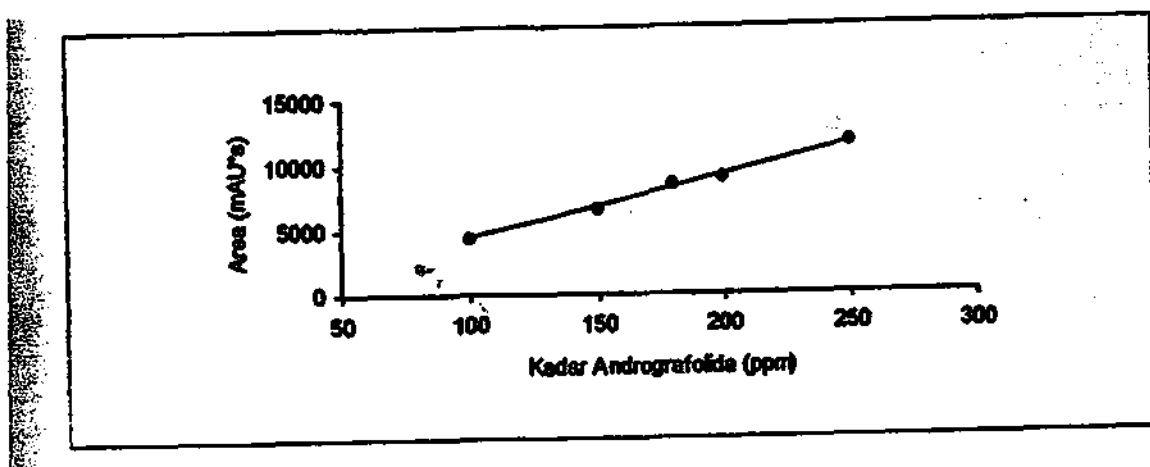
Hasil pengamatan area puncak terhadap lima macam kadar andrografolida dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3** Data hubungan antara kadar dengan area dari baku andrografolida

Kadar andrografolida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area (mAU*s)
100	4407,8706
150	6583,5679
180	8374,6152
200	8907,0615
250	11489,0000

$Y = 46,4535x - 94,2712$ ,  $r_{hitung} = 0,9991$ ,  $r_{tabel} = 0,811$  ( $n-1=4$ ,  $\alpha=0,05$ )  
 $V_{xo} = 3,16\%$

Dari data-data pada tabel di atas kemudian dibuat kurva persamaan garis regresi antara kadar dan area dari baku andrografolida. Dan didapatkan kurva persamaan garis yang linear.



**Gambar 9** Kurva persamaan garis regresi kadar ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs area (mAU\*s) dari baku andrografolida

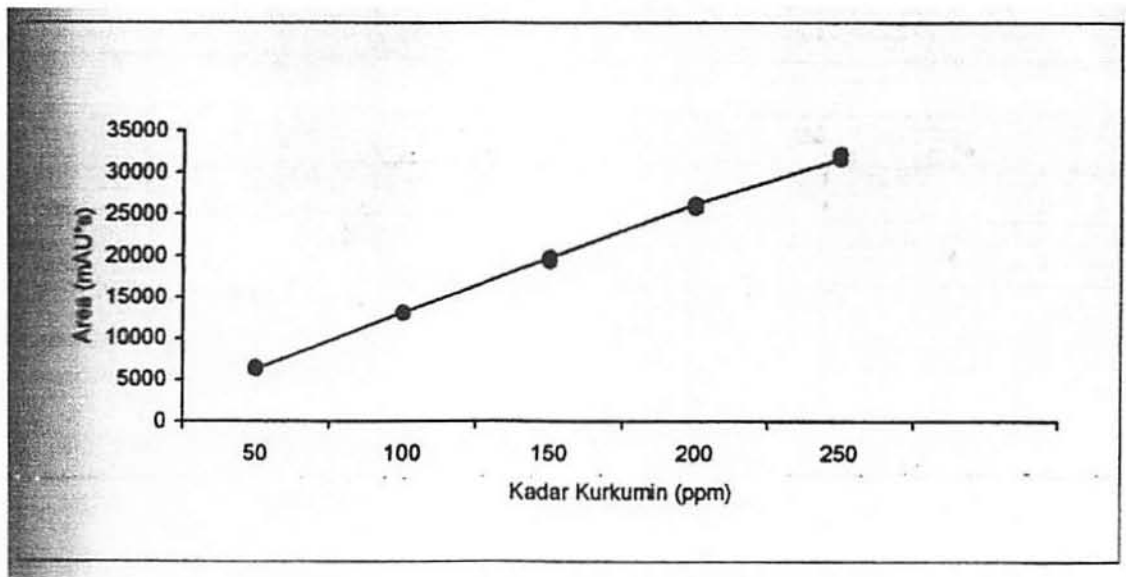
Kemudian hasil pengamatan area puncak terhadap lima macam kadar kurkumin dalam metanol dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4** Data hubungan antara kadar dengan area dari baku kurkumin

Kadar kurkumin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area (mAU*s)
50	6244,7817
100	13061,1000
150	19820,4000
200	26194,0000
250	31611,5000

$Y = 128,3797 x + 107,8283$ ,  $r_{\text{hitung}} = 0,9994$ ,  $r_{\text{tabel}} = 0,811$  ( $n-1=4$ ,  $\alpha=0,05$ )  
 $V_{\text{xo}} = 2,71 \%$

Dari data-data pada tabel di atas kemudian dibuat kurva persamaan garis regresi antara kadar dan area dari baku kurkumin. Dan didapatkan kurva persamaan garis yang linear.



Gambar 10 Kurva persamaan garis regresi kadar ( $\mu\text{g/ml}$ ) vs area (mAU\*s) dari baku kurkumin

Dari data-data tersebut didapatkan  $r_{\text{hitung}} > r_{\text{tabel}}$ ,  $V_{\text{xo}} < 5\%$  untuk andrografolida maupun kurkumin. Data tersebut menunjukkan adanya hubungan yang linear antara konsentrasi andrografolida dengan area puncak andrografolida maupun konsentrasi kurkumin dengan area puncak kurkumin. Oleh karena itu persamaan linearitas tersebut dapat digunakan untuk penentuan keseragaman

kandungan andrografolida dan kurkumin dalam sediaan kapsul campuran ekstrak sambiloto dan kunyit.

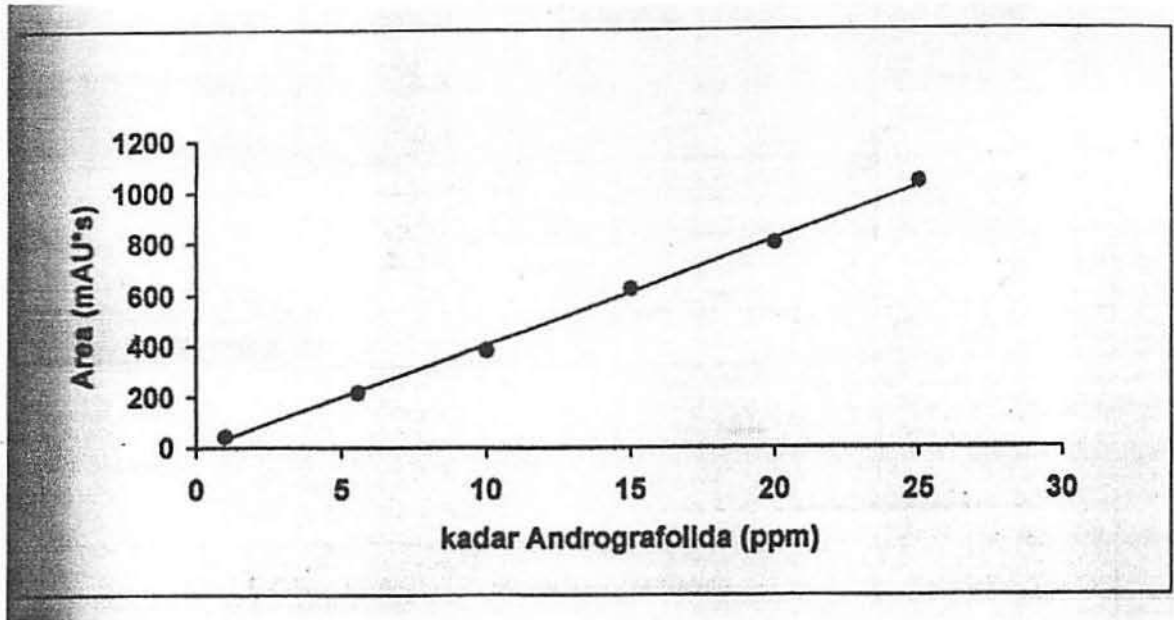
### 1.2.2 Linearitas untuk Disolusi

Hasil pengamatan area puncak terhadap lima macam kadar andrografolida dapat dilihat pada tabel 5.

**Tabel 5 Data hubungan antara kadar dengan area dari baku andrografolida (untuk disolusi)**

Kadar andrografolida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area (mAU*s)
1,00	44,4505
5,00	215,5128
10,00	383,4355
15,00	625,9096
20,00	802,4450
25,00	1039,8893
$y = 41,2794 x - 6,9582$ , $r_{\text{hitung}} = 0,9993$ , $r_{\text{tabel}} = 0,811$ ( $n-1=4$ , $\alpha=0,05$ ) $\text{RSD} = 3,45 \%$	

Dari data-data pada tabel di atas kemudian dibuat kurva persamaan garis regresi antara kadar dan area dari baku andrografolida. Dan didapatkan kurva persamaan garis yang linear.



Gambar 11 Kurva persamaan garis regresi kadar untuk disolusi ( $\mu\text{g/ml}$ ) vs area (mAU\*s) dari baku andrografolida

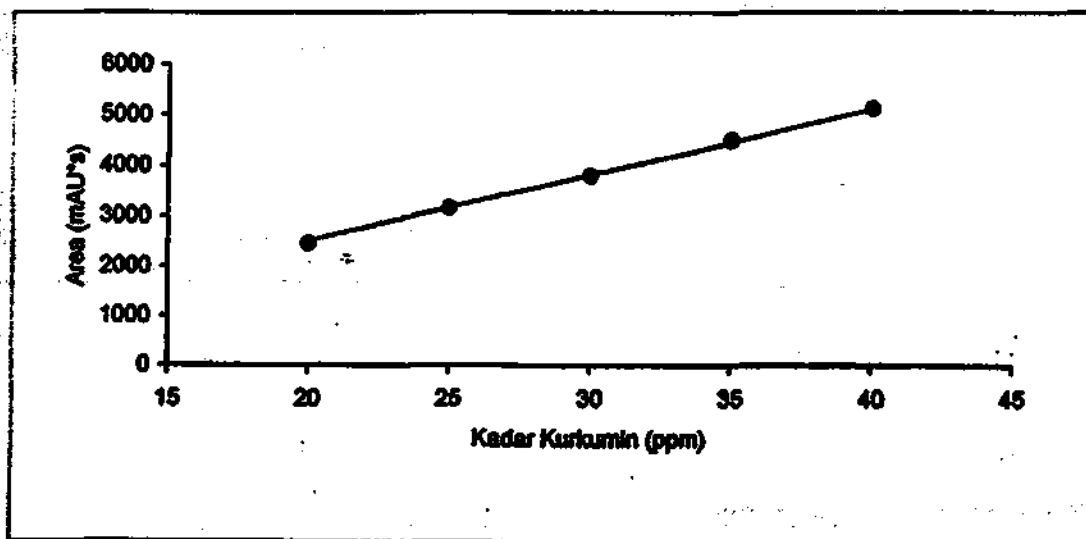
Hasil pengamatan area puncak terhadap lima macam kadar kurkumin dalam metanol dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6 Data hubungan antara kadar dengan area dari baku kurkumin (untuk disolusi)

Kadar kurkumin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area (mAU*s)
20,00	2474,4565
25,00	3165,3638
30,00	3801,4885
35,00	4520,9839
40,00	5132,3999

$Y = 128,8310 x - 38,3262$ ,  $r_{\text{hitung}} = 0,9997$ ,  $r_{\text{tabel}} = 0,811$  ( $n-1=4$ ,  $\alpha=0,05$ )  
 $V_{x0} = 1,32\%$

Dari data-data pada tabel di atas kemudian dibuat kurva persamaan garis regresi antara kadar dan area dari baku kurkumin. Dan didapatkan kurva persamaan garis yang linear.



**Gambar 12** Kurva persamaan garis regresi kadar untuk disolusi ( $\mu\text{g/ml}$ ) vs area ( $\text{mAU*s}$ ) dari baku kurkumin

Dari data-data tersebut didapatkan  $r_{\text{hitung}} > r_{\text{tabel}}$ ,  $V_{XO} < 5\%$  untuk andrografolida maupun kurkumin. Data tersebut menunjukkan adanya hubungan yang linear antara konsentrasi andrografolida dengan area puncak andrografolida maupun konsentrasi kurkumin dengan area puncak kurkumin. Oleh karena itu persamaan linearitas tersebut dapat digunakan untuk perhitungan disolusi andrografolida dan kurkumin dalam sediaan kapsul campuran ekstrak sambitoto dan kunyit.

### 1.3 Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantisasi (LOQ)

Untuk menentukan batas deteksi dan batas kuantisasi, maka dibuat persamaan regresi antara konsentrasi dengan area untuk andrografolida dan kurkumin. Dari percobaan yang dilakukan, diperoleh data seperti yang tercantum pada tabel 7 dan 8. Untuk menentukan harga slope blank ( $s_b$ ) ditentukan dengan menyuntikkan pelarut metanol.

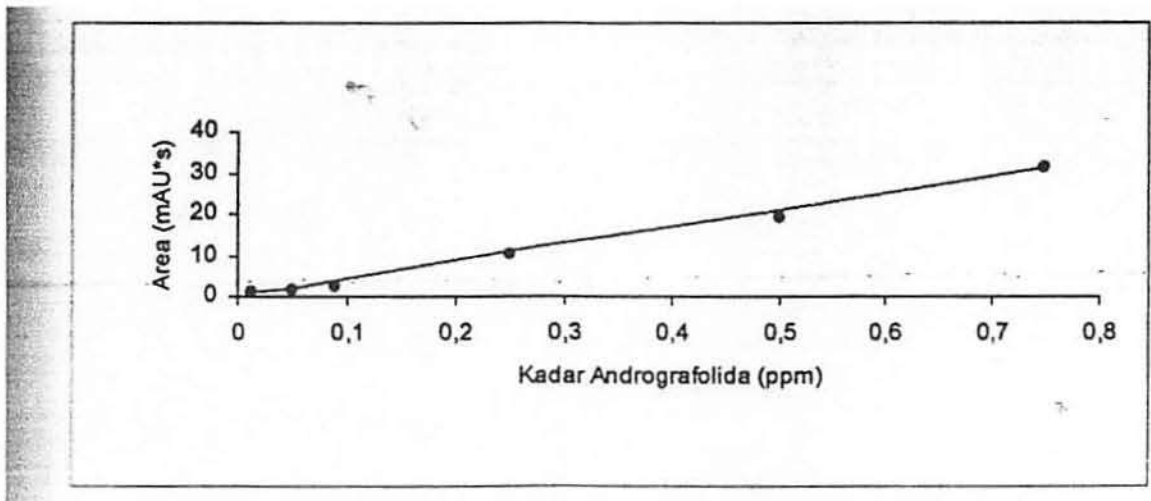
$$s_b = \frac{NP - P}{5} = \frac{0,4000 - (-0,1500)}{5} = 0,1100$$

Tabel 7 Kadar andrografolida dan area andrografolida untuk penentuan LOD dan LOQ

Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ ) X	Area Andrografolida Y
0,0130	0,8147
0,0500	1,4610
0,0900	2,3974
0,2500	10,0030
0,5000	18,8809
0,7500	31,4078

$Y = 41,5892x - 0,6304$ ,  $r_{\text{hitung}} = 0,9975$ ,  $r_{\text{tabel}} = 0,811$  ( $n-1=4$ ,  $\alpha=0,05$ )

Dari data-data pada tabel di atas kemudian dibuat kurva persamaan garis regresi antara kadar dan area dari baku andrografolida. Dan didapatkan kurva persamaan garis yang linear.



Gambar 13 Linearitas andrografolida untuk LOD dan LOQ

Berikut adalah perhitungan LOD dan LOQ untuk andrografolida:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_b}{\text{Slope}} = \frac{3 \times 0,1100}{41,5892} = 0,0079$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_b}{\text{Slope}} = \frac{10 \times 0,1100}{41,5892} = 0,0265$$



Slope 41,5892

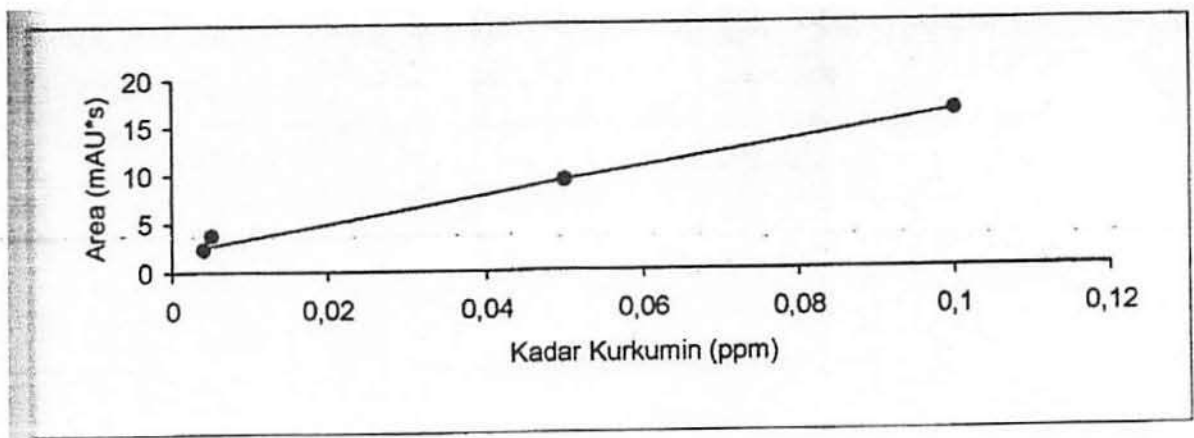
Untuk kurkumin, didapatkan data-data kadar dan area sebagai berikut:

**Tabel 8 Kadar kurkumin dan area kurkumin untuk penentuan LOD dan LOQ**

Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ ) X	Area Kurkumin Y
0,0040	2,3609
0,0050	3,7928
0,0500	9,2920
0,1000	16,3225

$Y = 148,9727 x + 1,6163$ ,  $r_{\text{hitung}} = 0,9859$ ,  $r_{\text{tabel}} = 0,811$  ( $n-1=4$ ,  $\alpha=0,05$ )

Dari data-data pada tabel di atas kemudian dibuat kurva persamaan garis regresi antara kadar dan area dari baku kurkumin. Dan didapatkan kurva persamaan garis yang linear.



**Gambar 14 Linearitas kurkumin untuk LOD dan LOQ**

Berikut adalah perhitungan LOD dan LOQ untuk kurkumin:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_b}{\text{Slope}} = \frac{3 \times 0,1100}{148,9727} = 0,0022$$

$$\text{Slope} \quad 148,9727$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_b}{\text{Slope}} = \frac{10 \times 0,1100}{148,9727} = 0,0074$$

$$\text{Slope} \quad 148,9727$$

Dari parameter LOD dan LOQ di atas dapat dihitung LOD dan LOQ dari andrografolida dan kurkumin. Untuk andrografolida, LOD dan LOQ nya yaitu 0,0079  $\mu\text{g/ml}$  dan 0,0265  $\mu\text{g/ml}$ , dan untuk kurkumin, LOD dan LOQ nya yaitu 0,0022  $\mu\text{g/ml}$  dan 0,0074  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 1.4 Akurasi

Pada tahap ini dilakukan penimbangan sampel ekstrak sambiloto 10,0 mg untuk akurasi andrografolida dan penimbangan ekstrak kunyit 10,0 mg untuk akurasi kurkumin yang selanjutnya ditambah baku masing-masing sebesar 30%, 50%, dan 70% dari konsentrasi masing-masing sampel. Sehingga dari proses tersebut didapatkan prosen perolehan kembali seperti pada tabel 9 dan 10.

Tabel 9 Prosen perolehan kembali (%) andrografolida dalam sampel

Penimbangan sampel	Penambahan adisi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Kadar sampel (rata-rata)	Kadar yang diperoleh kembali ( $\mu\text{g/ml}$ )	% recovery
10,0 mg	45,0	160,2567	198,0025	96,46 %
	45,0		212,9796	103,76 %
	45,0		201,2313	98,04 %
10,0 mg	80,0	160,2567	244,6127	101,81 %
	80,0		233,5575	97,21 %
	80,0		246,5291	102,61 %
10,0 mg	115,0	160,2567	269,1613	97,78 %
	115,0		264,6019	96,13 %
	115,0		276,0494	100,29 %
% recovery rata-rata				99,34 %
SD				2,8393
KV				0,02

Tabel 10 Prosen perolehan kembali (%) kurkumin dalam sampel

Penimbangan sampel	Penambahan adisi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Kadar sampel (rata-rata)	Kadar yang diperoleh kembali ( $\mu\text{g/ml}$ )	% recovery
10,0 mg	45,0	152,3310	171,1080	86,71 %
	45,0		173,1020	87,72 %
	45,0		177,9900	90,20 %
10,0 mg	75,0	152,3310	251,3140	110,55 %
	75,0		241,3660	106,18 %
	75,0		242,6360	106,74 %
10,0 mg	105,0	152,3310	270,0570	104,95 %
	105,0		267,9740	104,14 %
	105,0		276,6150	107,50 %
% recovery rata-rata				100,52 %
SD				9,4461
KV				0,09

Pada penentuan akurasi didapatkan bahwa rata-rata prosen perolehan kembali andrografolida 99,34% dan kurkumin 100,52% dimana

syarat untuk penentuan akurasi sampel bahan alam sebesar 80 – 120% (Indrayanto, 1994). Maka dari itu, penentuan akurasi andrografolida dan kurkumin telah memenuhi persyaratan validasi.

### 1.5 Presisi

Untuk memperoleh data penentuan presisi dilakukan penyuntikan larutan baku andrografolida dan baku kurkumin dalam metanol dengan kadar yang sama sebanyak 10 kali. Dari percobaan yang dilakukan diperoleh data seperti pada tabel 11 dan 12.

**Tabel 11 Data hasil penentuan presisi andrografolida dalam metanol dengan kadar 100 µg/mL**

No	Area (mAU*s)
1	4407,8706
2	4282,8037
3	4245,2017
4	4301,6260
5	4191,3086
6	4386,7647
7	4295,5913
8	4350,8403
9	4353,4409
10	4337,3926
Rata - rata	4315,2840
SD	65,6603
KV (%)	1,52

Uji presisi andrografolida menunjukkan nilai KV = 1,52%, memenuhi syarat validasi yaitu KV < 2%.

**Tabel 12 Data hasil penentuan presisi kurkumin dalam metanol dengan kadar 100 µg/mL**

No	Area (mAU*s)
1	13157,4000
2	13021,1000
3	13138,0000
4	12757,6000
5	12753,7000
6	12545,9000
7	12615,7000
8	12852,6000
9	12741,0000
10	13061,1000
<b>Rata - rata</b>	<b>12865,7222</b>
<b>SD</b>	<b>230,7916</b>
<b>KV (%)</b>	<b>1,79</b>

Uji presisi kurkumin menunjukkan nilai KV = 1,79%, memenuhi syarat validasi yaitu KV < 2% (Indrayanto, 1994).

Dari data-data linearitas, LOD, LOQ, akurasi, dan presisi baik untuk andrografolida maupun kurkumin dapat disimpulkan bahwa metode yang digunakan valid.

## 1.6 Penetapan Kadar Andrografolida dan Kurkumin

### 1.6.1 Penetapan Kadar Andrografolida dalam Ekstrak Sambiloto dengan HPLC

Untuk penetapan kadar andrografolida, ditimbang sampel masing-masing sebanyak 10,0 mg ekstrak sambiloto kemudian dilarutkan dalam metanol ad volume 5,0 ml, kemudian masing-masing disuntikkan pada kolom HPLC sebanyak 100 µl. Berikut adalah tabel hasil perhitungan kadar andrografolida dalam ekstrak sambiloto. Cara perhitungan dapat dilihat pada lampiran 5.

**Tabel 13 Hasil perhitungan kadar andrografolida dalam ekstrak sambiloto (HPLC)**

Sampel	Berat sampel (mg)	Kadar andrografolida (ppm)	Kadar andrografolida dalam sampel (mg)	% kadar andrografolida dalam ekstrak
I	10,2	178,6745	0,8930	8,76
II	9,9	155,7653	0,7790	7,64
III	10,1	161,3390	0,8070	7,99
Rata-rata			0,8263	8,13

Untuk perhitungan kadar andrografolida dengan HPLC didapatkan rata-rata kadar andrografolida dalam sampel adalah 0,8263 mg dan rata-rata persen kadar andrografolida dalam ekstrak adalah 8,13%.

#### 1.6.2 Penetapan Kadar Kurkumin dalam Ekstrak Kunyit dengan HPLC

Untuk penetapan kadar kurkumin, ditimbang sampel masing-masing sebanyak 10,0 mg ekstrak kunyit kemudian dilarutkan dalam metanol ad volume 5,0 ml, kemudian masing-masing disuntikkan pada kolom HPLC sebanyak 100  $\mu$ l. Berikut adalah tabel hasil perhitungan kadar kurkumin dalam ekstrak kunyit. Cara perhitungan dapat dilihat pada lampiran 5.

**Tabel 14 Hasil perhitungan kadar kurkumin dalam ekstrak kunyit**

Sampel	Berat sampel (mg)	Kadar kurkumin (ppm)	Kadar kurkumin dalam sampel (mg)	% kadar kurkumin dalam ekstrak
I	10,2	150,37	0,7519	7,37
II	10,1	146,93	0,7347	7,27
III	10,0	146,43	0,7322	7,32
Rata-rata			0,7396	7,32

Untuk perhitungan kadar kurkumin dengan HPLC didapatkan rata-rata kadar kurkumin dalam sampel adalah 0,7396 mg dan rata-rata persen kadar kurkumin dalam ekstrak adalah 7,32%.

## **2. Hasil Pengujian Mutu Fisik**

Mutu fisik yang dimaksud dalam pengujian ini meliputi keseragaman bobot dan waktu hancur.

### **2.1 Keseragaman Bobot**

Untuk perhitungan keseragaman bobot, ditimbang kapsul satu per satu. Dikeluarkan isi semua kapsul, kemudian ditimbang seluruh bagian cangkang kapsul sehingga % penyimpangan bobot isi kapsul. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 6. Hasil uji keseragaman bobot isi kapsul campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dapat dilihat pada tabel 15.

Tabel 15 Hasil uji keseragaman bobot isi kapsul campuran ekstrak sambiloto dan kunyit

No.	Cangkang + isi (g)	Cangkang (g)	Isi (g)	% penyimpangan bobot isi kapsul
1.	0,4605	0,0747	0,3858	1,05
2.	0,4550	0,0727	0,3823	1,95
3.	0,4681	0,0761	0,3920	0,54
4.	0,4771	0,0766	0,4005	2,72
5.	0,4628	0,0773	0,3855	1,13
6.	0,4625	0,0717	0,3908	0,23
7.	0,4670	0,0807	0,3863	0,92
8.	0,4658	0,0732	0,3926	0,69
9.	0,4627	0,0745	0,3882	0,44
10.	0,4657	0,0727	0,3930	0,80
11.	0,4590	0,0790	0,3800	2,54
12.	0,4644	0,0738	0,3906	0,18
13.	0,4748	0,0762	0,3986	2,23
14.	0,4736	0,0796	0,3940	1,05
15.	0,4578	0,0787	0,3791	2,77
16.	0,4645	0,0795	0,3850	1,26
17.	0,4716	0,0760	0,3956	1,46
18.	0,4634	0,0724	0,3910	0,28
19.	0,4663	0,0798	0,3865	0,87
20.	0,4711	0,0709	0,4002	2,64
		Rata-rata	0,3899	1,29
		SD	0,0062	0,88

Berdasarkan hasil uji keseragaman bobot kapsul pada tabel 15, diketahui bahwa tidak terdapat kapsul yang isinya menyimpang di atas 7,5% sampai 15% dari rata-rata isi kapsul. Hal ini berarti kapsul memenuhi persyaratan keseragaman bobot.



$7,5\% \times 0,3899 = 0,0292$  berarti rentang yang diperbolehkan  $0,3899 \pm 0,0292$  yaitu  $0,3607 - 0,4191$  gram.

## 2.2 Uji Waktu Hancur Kapsul

Pada pengujian waktu hancur, dimasukkan 1 kapsul pada masing-masing tabung (enam tabung) dengan kasa berukuran 10 mesh pada tiap tabung dan alat dijalankan, digunakan media air dengan suhu media diatur konstan  $37^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ . Hasil uji waktu hancur dapat dilihat pada tabel 16.

**Tabel 16 Hasil waktu hancur kapsul campuran ekstrak sambiloto dan kunyit**

Replikasi	Waktu hancur (detik)
I	489
II	465
III	496
Rata-rata	$483,33 \pm 16,26$

Persyaratan dari waktu hancur untuk kapsul adalah semua kapsul harus hancur, kecuali bagian dari cangkang kapsul dan uji waktu hancur tidak menyatakan bahwa sediaan atau bahan aktifnya terlarut sempurna. Sediaan dinyatakan hancur sempurna bila sisa sediaan yang tertinggal pada kasa alat uji merupakan massa lunak yang tidak mempunyai inti yang jelas, kecuali bagian dari penyalut atau cangkang kapsul yang tidak larut (Depkes RI, 1995).

Waktu untuk pengujian waktu hancur kapsul tidak boleh lebih dari 15 menit. Hasil rata-rata pengujian waktu hancur untuk kapsul campuran ekstrak sambiloto dan kunyit adalah  $483,33 \pm 16,26$  detik atau 8 menit lebih 3 detik. Hal ini berarti waktu hancur untuk kapsul campuran ekstrak sambiloto dan kunyit memenuhi persyaratan.

### 3. Keseragaman Kandungan

Pemeriksaan kandungan kapsul dilakukan dengan HPLC dengan fase gerak metanol:air 60:40 untuk andrografolida dan asetonitril:asam asetat 1% = 50:50 untuk kurkumin. Diambil 10 sampel kapsul secara acak dan dihitung rata-ratanya. Dikeluarkan isinya dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml, ditambah methanol ad 100,0 ml. Hasil pemeriksaan keseragaman kandungan untuk andrografolida dan kurkumin dapat dilihat pada tabel 17 dan 18. contoh perhitungan dapat dilihat pada lampiran 7.

**Tabel 17 Hasil pemeriksaan keseragaman kandungan andrografolida dalam sediaan kapsul campuran ekstrak sambiloto dan kunyit**

Kapsul no.	Bobot isi kapsul (g)	Area (mAU*s)	Kadar (mg/L)	Kandungan Andrografolida dalam kapsul (mg)	Kandungan Andrografolida terhadap dosis (%)
1.	0,3906	6501,04199	141,92	14,19	94,60
2.	0,3859	6812,69434	148,63	14,86	99,07
3.	0,3893	6588,12988	143,79	14,38	95,87
4.	0,3954	6145,09033	134,26	13,43	89,53
5.	0,3899	6646,85400	145,06	14,51	96,73
6.	0,3909	6725,64063	146,75	14,68	97,87
7.	0,3807	6236,99951	136,24	13,62	90,80
8.	0,3971	7064,56543	154,05	15,41	102,73
9.	0,3985	7144,42725	155,77	15,58	103,87
10.	0,3908	6741,88867	147,10	14,71	98,07
			Rata-rata	14,54	96,79
			SD	0,68	4,82
			% KV	4,67	4,97

Tabel 18 Hasil pemeriksaan keseragaman kandungan kurkumin dalam sediaan kapsul campuran ekstrak sambiloto dan kunyit

No. kapsul	Bobot isi kapsul (g)	Area (mAU*s)	Kadar (mg/L)	Kandungan Kurkumin dalam kapsul (mg)	Kandungan Kurkumin terhadap dosis (%)
1.	0,3906	1,98212e4	153,53	15,35	102,33
2.	0,3859	1,87264e4	145,28	14,53	96,87
3.	0,3893	1,97556e4	153,02	15,30	102,00
4.	0,3954	2,08778e4	162,07	16,21	108,07
5.	0,3899	2,03210e4	157,42	15,74	104,93
6.	0,3909	1,90202e4	147,57	14,76	98,40
7.	0,3807	2,11061e4	163,85	16,39	109,27
8.	0,3971	1,99832e4	154,79	15,48	103,20
9.	0,3985	2,04919e4	158,75	15,88	105,87
10.	0,3908	1,96969e4	152,56	15,26	101,73
			Rata-rata	15,49	103,27
			SD	0,59	3,92
			% KV	3,81	3,80

Persyaratan keseragaman kandungan dipenuhi jika jumlah zat aktif terletak antara 85,0% hingga 115,0% dari yang tertera pada etiket dan tidak ada satuan terletak di luar rentang 75,0% hingga 125,0% yang tertera pada etiket dan simpangan baku relatif dari 10 satuan sediaan kurang dari atau sama dengan 6,0% (Depkes RI, 1995).

Dari data di atas didapatkan bahwa untuk per satuan kapsul, baik andrografolida maupun kurkumin berada dalam rentang 75,0% hingga 125,0%. Dengan rata-rata kandungan andrografolida di antara 85,0% - 115,0% yaitu 96,79% dan %KV < 6% yaitu 4,97%, dan dengan rata-rata kandungan kurkumin di antara 85,0% - 115,0% yaitu 103,27% dan %KV < 6%

yaitu 3,80% maka keseragaman kandungan andrografolida dan kurkumin telah memenuhi persyaratan yang ditentukan.

#### 4. Hasil Pangujian Disolusi Kapsul

Untuk uji disolusi, dimasukkan dua buah kapsul ke dalam bejana yang berisi media disolusi cairan lambung buatan tanpa pepsin dengan pH 1,2, pengadukan dilakukan dengan *basket* kemudian *basket* diturunkan hingga  $2,5 \pm 0,2$  cm di atas alas bejana, selanjutnya *basket* diputar 100 rpm. Kemudian diambil 5 ml dengan spuit injeksi pada menit ke 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, dan 180. Hasil uji disolusi andrografolida dalam sediaan kapsul campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dapat dilihat pada tabel 19 dan 20, dan contoh perhitungan dapat dilihat pada lampiran 8. Untuk hasil uji disolusi kurkumin dalam sediaan kapsul campuran ekstrak sambiloto dan kunyit tidak dicantumkan karena tidak didapatkan kadar kurkumin terlarut dalam uji disolusi sehingga persen kurkumin terlarut dan Efisiensi Disolusi untuk kurkumin tidak dapat dihitung.

Tabel 19 Kadar andrografolida terlarut selama 180 menit

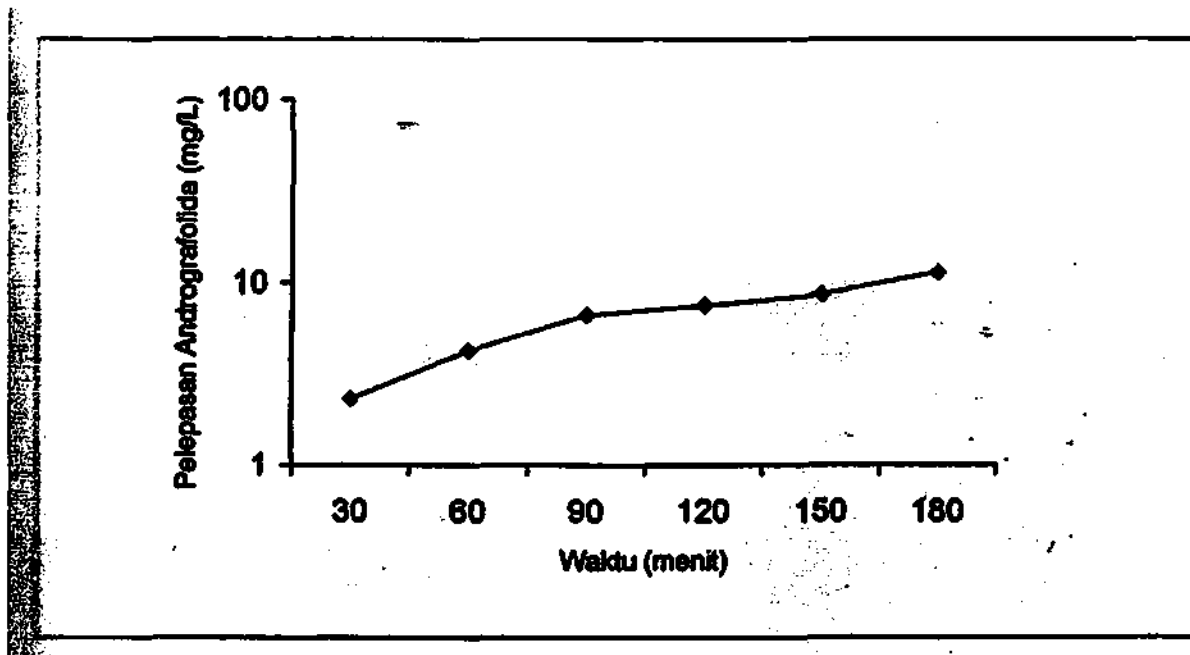
Waktu (menit)	Kadar andrografolida terlarut (mg/L)			Rata-rata	SD
	I	II	III		
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	2,16	2,55	2,26	2,32	0,20
60	4,94	4,00	3,80	4,25	0,61
90	6,69	6,72	6,85	6,75	0,09
120	7,65	7,78	7,40	7,61	0,19
150	8,89	9,03	8,21	8,71	0,44
180	11,39	11,92	10,70	11,34	0,61

Tabel 20 Hasil uji disolusi andrografolida dalam sediaan kapsul campuran ekstrak sambiloto dan kunyit

Waktu (menit)	Kadar andrografolida terlepas ( $\mu\text{g/mL}$ )			Prosen (%) andrografolida terlepas			Rata-rata $\pm$ SD
	I	II	III	I	II	III	
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 % $\pm$ 0,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 % $\pm$ 0,00
30	2,16	2,55	2,26	6,47	7,67	6,77	6,97 % $\pm$ 0,62
60	4,94	4,00	3,80	14,87	12,03	11,43	12,78 % $\pm$ 1,84
90	6,69	6,72	6,85	20,20	20,27	20,63	20,37 % $\pm$ 0,23
120	7,65	7,78	7,40	23,20	23,57	22,40	23,06 % $\pm$ 0,60
150	8,89	9,03	8,21	27,03	27,47	24,97	26,49 % $\pm$ 1,33
180	11,39	11,92	10,70	34,67	36,27	32,57	34,50 % $\pm$ 1,86
AUC <sub>(180)</sub>				3224,63	3216,83	3023,78	3155,08 $\pm$ 113,78
% ED <sub>(180)</sub>				17,92	17,87	16,80	17,53 % $\pm$ 0,63

Dari data di atas diketahui bahwa pelepasan andrografolida pada menit ke 180, yaitu sebesar 11,34 mg/L  $\pm$  0,61 dengan prosen (%) andrografolida terlarut pada menit ke 180 yaitu sebesar 34,50%  $\pm$  1,86 serta Efisiensi Disolusi andrografolida (180) 17,53%  $\pm$  0,63. Untuk kurkumin, pelepasan kurkumin, prosen kurkumin terlarut dan Efisiensi Disolusi kurkumin tidak dapat dihitung karena tidak ada data yang dapat dilihat pada HPLC.

Berikut dicantumkan kurva disolusi andrografolida dalam cairan lambung buatan tanpa pepsin dengan pH 1,2 pada suhu 37°  $\pm$  0,5°C dengan waktu sebagai sumbu x dan pelepasan andrografolida sebagai sumbu y.

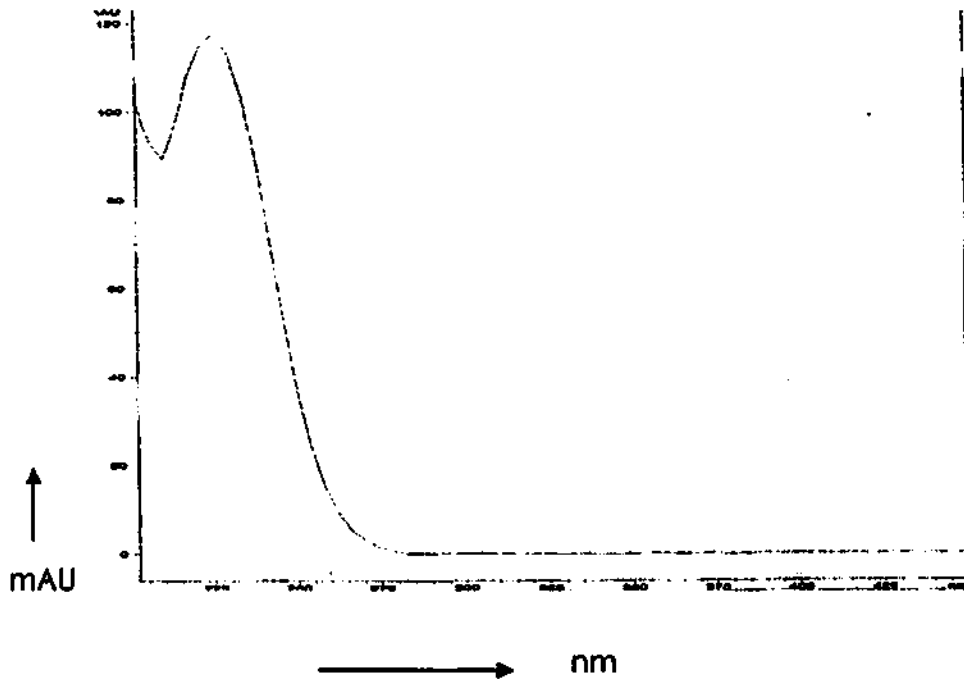


**Gambar 5.15** Kurva disolusi andrografolida dalam cairan lambung buatan tanpa pepsin dengan pH 1,2 pada suhu  $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

## 5. Penentuan kondisi HPLC

### 5.1 Pemilihan $\lambda$ maks Andrografolida

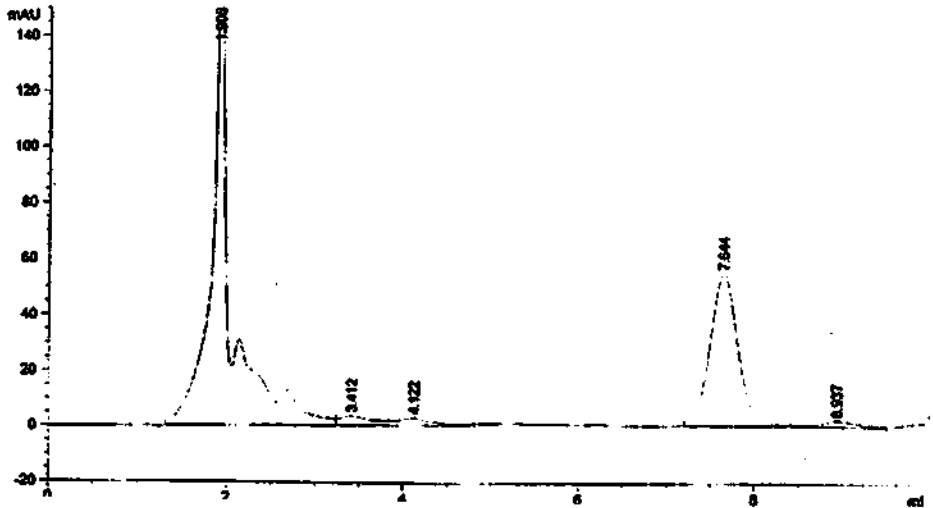
Andrografolida dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum kelinci dianalisis dengan instrumen HPLC yang dilengkapi dengan *Diode array detector*. Pencarian panjang gelombang maksimum andrografolida antara 200-300 nm dilakukan untuk mencari pada panjang gelombang berapa andrografolida memberikan serapan yang terbesar dan terpisah dari puncak yang lain. Hasil analisis menunjukkan  $\lambda$  230 nm memberikan serapan terbesar sehingga digunakan untuk pengamatan andrografolida selanjutnya.



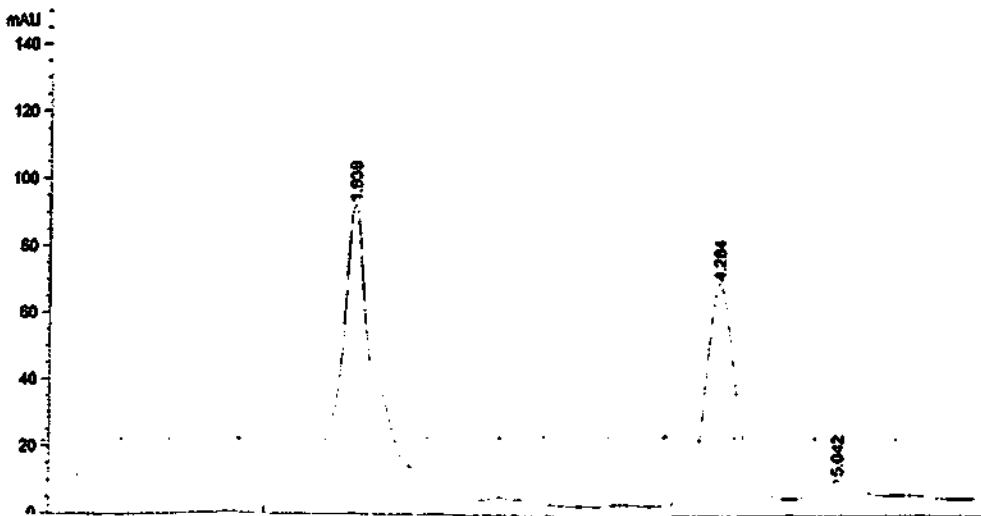
**Gambar 16 Spektrum andrografolida dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum kelinci yang diamati pada  $\lambda = 230$  nm menggunakan fase gerak metanol: air = 60:40**

## 5.2 Optimasi fase gerak andrografolida

Penyuntikkan andrografolida dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum kelinci dengan beberapa macam perbandingan komposisi fase gerak metanol : air didapatkan data seperti pada gambar 17;18;19;20; serta tabel 21

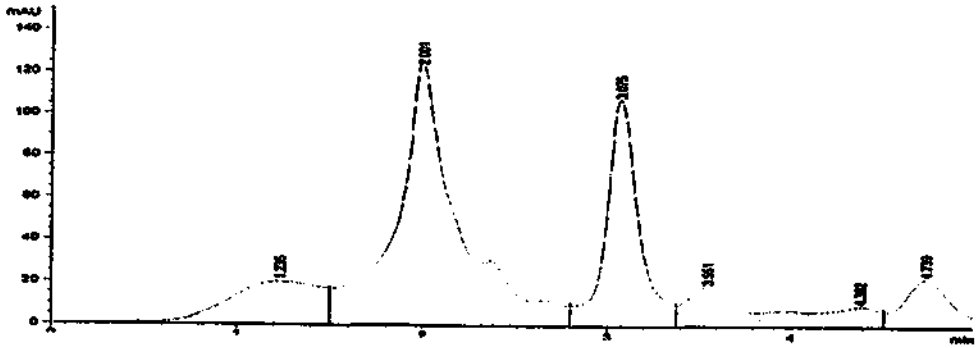


**Gambar 17** Kromatogram andrografolida dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum kelinci dengan fase gerak metanol : air = 50:50, tR = 7,644 menit, Match Factor = 999.6270, Purity = 999.335,  $\lambda$  = 230 nm

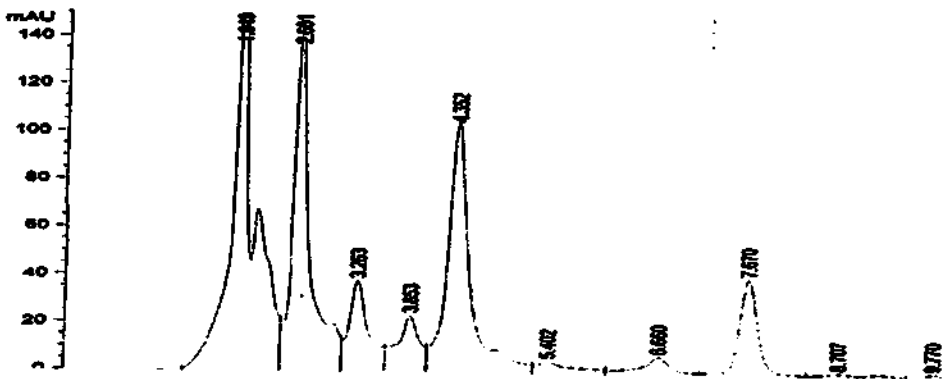


**Gambar 18** Kromatogram andrografolida dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum kelinci dengan fase gerak metanol : air = 60:40 tR = 4,284 menit, Match Factor = 999.9023, Purity = 996.096,  $\lambda$  = 230 nm





**Gambar 19** Kromatogram andrografolida dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum kelinci dengan fase gerak metanol : air = 70:30 tR = 3,075 menit, Match Factor = 998.9580, Purity = 909.041,  $\lambda$  = 230 nm



**Gambar 20** Kromatogram andrografolida dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum kelinci dengan fase gerak metanol : air = 80:20 tR = 2,601 menit, Match Factor = 993.3826, Purity = 618.425,  $\lambda$  = 230 nm

**Tabel 21 Waktu tambat (tR), selektivitas (a), resolusi (Rs), Match Factor, Purity andrografolida dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum kelinci pada beberapa macam perbandingan komposisi**

Komposisi fase gerak		tR Andrografolida	Selektivitas (a)	Resolusi (Rs)	Match Factor	Purity
Metanol (%)	Air (%)					
50	50	7,644	1,85	5,28	999.6270	999.335
60	40	4,284	2,21	7,13	999.9023	996.096
70	30	3,075	1,54	3,18	998.9580	909.041
80	20	2,601	1,33	2,96	993.3826	618.425

Selanjutnya pada penelitian ini digunakan komposisi fase gerak metanol -air dalam serum dengan perbandingan 60 : 40 . Pada perbandingan komposisi ini harga a telah memenuhi syarat, yaitu 2,21 (syarat > 1); dan harga Rs telah memenuhi syarat, yaitu 7,13.

Dari data tersebut diatas, kondisi HPLC yang dipakai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Fase gerak = Metanol - air (60:40)
- Detektor = Diode Array Detector
- $\lambda$  = andrografolida (230 nm)
- Kolom = Nucleodur RP C18 (150 x 4,0 mm x 5 $\mu$ m)
- Flow rate = 1,0 ml/min

## 6. Validasi Metode

### 6.1 Selektivitas

Dari hasil penyuntikkan andrografolida dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum kelinci diperoleh kromatogram HPLC serta harga  $\alpha$  dan  $R_s$  puncak andrografolida. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada gambar 18 dan tabel 22

**Tabel 22 Data faktor selektivitas ( $\alpha$ ) dan derajat keterpisahan ( $R_s$ ) puncak andrografolida dan komponen lainnya.**

Pemisahan puncak	tR	$R_s$	$\alpha$
Andrografolida	4,284	7,13	2,21

Dari gambar 18 dan tabel 22 Harga  $\alpha$  dan  $R_s$  andrografolida dari ekstrak sambiloto dalam serum kelinci telah memenuhi syarat.

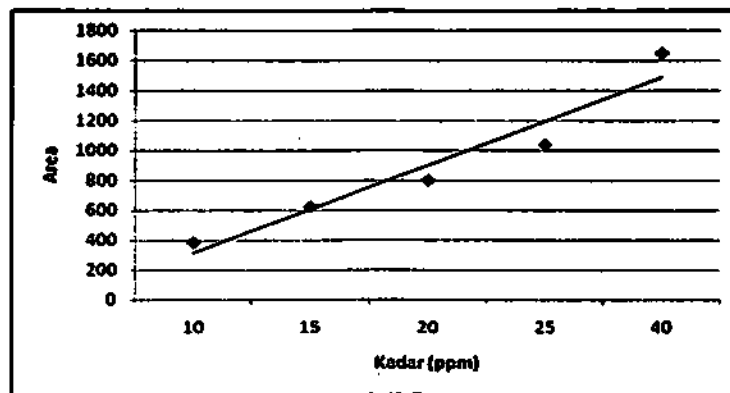
### 6.2 Linieritas Andrografolida

Penyuntikkan larutan baku kerja andrografolida dalam metanol dengan beberapa kadar pada HPLC menggunakan fase gerak metanol : air = 60 : 40 menghasilkan perbandingan kadar terhadap area kromatogram andrografolida. Perbandingan kadar dan area kromatogram andrografolida pada penentuan linieritas dapat dilihat pada tabel 23 dan gambar kurva baku pada gambar 21.

Dari data di atas, maka dibuat persamaan garis antara kadar andrografolida dengan area kromatogram andrografolida.

**Tabel 23 Kadar dan area kromatogram andrografolida pada penentuan linieritas**

No.	Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Area
1.	10	383,43552
2.	15	625,90955
3.	20	802,44501
4.	25	1039,88928
5.	40	1649,61401

**Gambar 21 Kurva linieritas andrografolida**

Persamaan kurva baku linieritas:

$$Y = 41,49641 x - 10,55189$$

$$r = 0,99963$$

$$V_{xo} = 2,09\%$$

Data tersebut menunjukkan bahwa ada hubungan linier antara kadar andrografolida pada rentang 10-40  $\mu\text{g/ml}$  dengan area kromatogram andrografolida.

### 6.3 Penentuan persen akurasi andrografolida

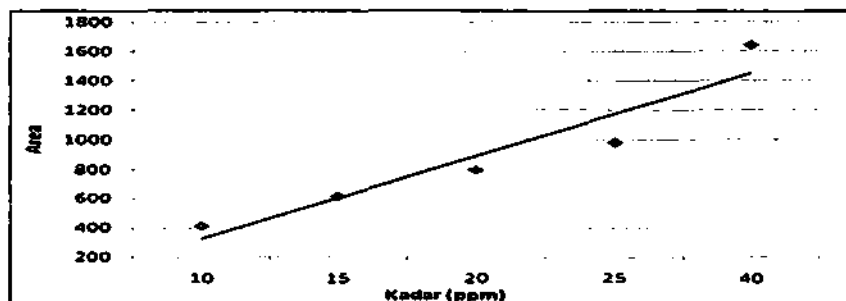
Untuk menentukan kembali kadar andrografolida dalam serum (akurasi) dibuat larutan andrografolida hasil ekstraksi dari serum kosong

yang sengaja ditambahkan andrografolida hingga dihasilkan larutan dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25, 40  $\mu\text{g/ml}$ . Dari data tabel 24, maka dibuat persamaan kurva baku antara kadar andrografolida dalam serum dengan area kromatogram andrografolida. Gambar kurva baku akurasi andrografolida dapat dilihat pada gambar 22.

Persamaan akurasi didapat digunakan untuk menentukan kadar andrografolida dalam serum kelinci.

**Tabel 24** Kadar dan area kromatogram pada penentuan kembali andrografolida dalam serum kelinci

No.	Kadar (ppm)	Area	Kadar yang didapat kembali	% akurasi
1.	10	411,60681	10,17	101,17
2.	15	614,94421	15,07	100,47
3.	20	796,91187	19,46	97,30
4.	25	977,48962	23,81	95,24
5.	40	1645,37402	39,90	99,75
RATA-RATA				98,78%



**Gambar 22** Kurva akurasi andrografolida

Persamaan kurva akurasi :

$$Y = 40,96506x - 11,96620$$

$$r = 0,99887$$

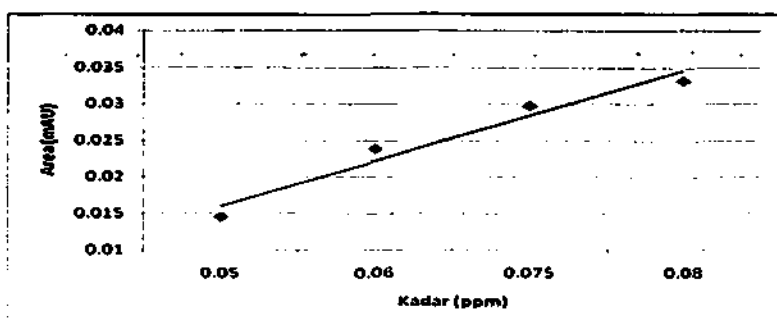
$$V_{xo} = 3,32\%$$

#### 6.4 Penentuan batas deteksi dan batas kuantisasi

Dari persamaan regresi antara kadar andrografolida dalam serum dengan area andrografolida (Tabel 25), dapat dihitung batas deteksi dan batas kuantisasi.

**Tabel 25 Kadar dan area kromatogram andrografolida pada penentuan batas deteksi dan batas kuantisasi**

No.	Kadar (ppm)	Area
1.	0,050	0,01446
2.	0,060	0,02378
3.	0,075	0,02967
4.	0,080	0,03315



**Gambar 23 Kurva baku andrografolida pada penentuan LOD dan LOQ andrografolida**

Persamaan kurva baku LOD dan LOQ :

$$Y = 0,40085x - 0,00053$$

$$r = 0,99402$$

Untuk mendapatkan harga slope blank ( $S_b$ ) ditentukan dengan menyuntikkan serum kosong sebagai matriks sampel ke dalam HPLC. Dari kromatogram dapat dihitung nilai  $S_b$  sebagai berikut:

$$S_b = \frac{0,186}{5} = 0,0372$$

Harga:

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = \frac{3 \times 0,0372}{0,40085} = 0,27840 \text{ ppm}$$

$$\text{Batas kuantisasi (LOQ)} = \frac{10 \times 0,0372}{0,40085} = 0,92803 \text{ ppm}$$

### 6.5 Presisi HPLC andrografolida

Penentuan presisi dilakukan dengan menyuntikkan larutan baku kerja andrografolida konsentrasi 40  $\mu\text{g/ml}$  dalam serum sebanyak 6 kali. Hasil penyuntikkan tersebut dapat dilihat pada tabel 26

**Tabel 26 Data hasil penentuan presisi andrografolida**

No.	Area
1.	1653, 23083
2.	1604, 60535
3.	1644, 46851
4.	1694, 23181
5.	1624, 50806
6.	1649, 97437
Rerata = 1645,1698	
SD = 30,22	
KV = 1,84%	

Berdasarkan tabel 26 maka presisi penyuntikkan andrografolida dalam serum kelinci 40 µg/ml mempunyai harga KV = 1,84 %. Harga KV ini menunjukkan bahwa presisi metode ini memenuhi persyaratan karena harga KV untuk bioanalisis 15-20%.

#### 7. Hasil pengujian bioavailabilitas andrografolida

Hasil perhitungan kadar andrografolida dalam sampel serum 3 kelinci dapat dilihat pada tabel 27; 28; 29 dengan profil kadar dalam darahnya terlihat gambar 24.

**Tabel 27** Data area dan kadar andrografolida dalam sampel serum kelinci A pada interval waktu 15-480 menit setelah pemberian kapsul yang berisi campuran ekstrak sambiloto dan kunyit

No.	Waktu (menit)	Area	Kadar andrografolida terhitung		
			Sampel : MeOH = (1 : 4,5)		Kadar dalam serum (µg/ml)
			Adisi 10 µg/ml	Tanpa adisi 10 µg/ml	
1.	15	413,90045	10,39	0,39	1,755
2.	30	416,72723	10,46	0,46	2,070
3.	45	419,27515	10,53	0,53	2,385
4.	60	429,63104	10,77	0,77	3,465
5.	90	437,83359	10,98	0,98	4,410
6.	120	426,17255	10,69	0,69	3,105
7.	240	420,41620	10,55	0,55	2,475
8.	480	417,89151	10,49	0,49	2,205



**Tabel 28 Data area dan kadar andrografolida dalam sampel serum kelinci B pada interval waktu 15-480 menit setelah pemberian kapsul yang berisi campuran ekstrak sambiloto dan kunyit**

No.	Waktu (menit)	Area	Kadar andrografolida terhitung		
			Sampel : MeOH = (1 : 4,5)		Kadar dalam serum ( $\mu\text{g/ml}$ )
			Adisi 10 $\mu\text{g/ml}$	Tanpa adisi 10 $\mu\text{g/ml}$	
1.	15	415,59665	10,44	0,44	1,980
2.	30	418,43845	10,51	0,51	2,295
3.	45	420,9261	10,69	0,69	3,105
4.	60	425,86356	10,81	0,81	3,645
5.	90	430,91653	10,64	0,64	2,880
6.	120	422,77411	10,61	0,61	2,745
7.	240	414,67084	10,41	0,41	1,845
8.	480	411,70236	10,34	0,34	1,530

**Tabel 29 Data area dan kadar andrografolida dalam sampel serum kelinci C pada interval waktu 15-480 menit setelah pemberian kapsul yang berisi campuran ekstrak sambiloto dan kunyit**

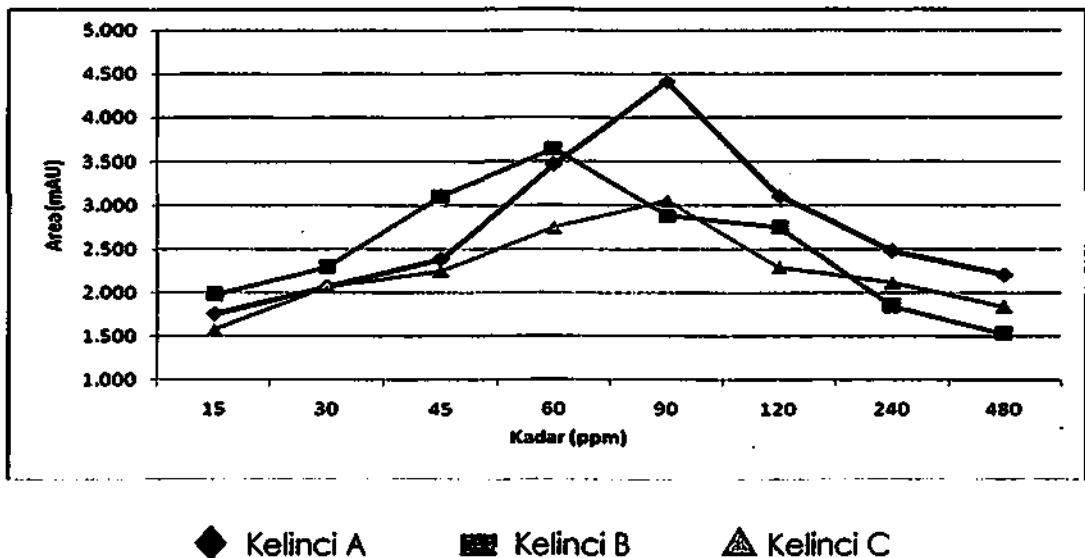
No.	Waktu (menit)	Area	Kadar andrografolida terhitung		
			Sampel : MeOH = (1 : 4,5)		Kadar dalam serum ( $\mu\text{g/ml}$ )
			Adisi 10 $\mu\text{g/ml}$	Tanpa adisi 10 $\mu\text{g/ml}$	
1.	15	411,82443	10,35	0,35	1,575
2.	30	416,75928	10,46	0,46	2,070
3.	45	418,13153	10,50	0,50	2,250
4.	60	422,95569	10,61	0,61	2,745
5.	90	425,83920	10,68	0,68	3,060
6.	120	418,56473	10,51	0,51	2,295
7.	240	416,99318	10,47	0,47	2,115
8.	480	414,47510	10,41	0,41	1,845

### 8. Analisis Data

Harga  $t_{\text{maks}}$ ,  $C_{\text{maks}}$ , dan  $\text{AUC}_{0-480}$  untuk ketiga hewan coba kelinci dapat dilihat pada tabel 30 sedangkan profil kadar andrografolida dalam sampel serum kelinci A, B, C secara overlay dapat dilihat pada gambar 24. Penentuan  $\text{AUC}_{0-480}$  dilakukan dengan metode trapezium, contoh perhitungannya dapat dilihat di lampiran 9.

**Tabel 30** Harga parameter bioavailabilitas ( $t_{maks}$ ,  $C_{maks}$ , dan  $AUC_{0-480}$ ) andrografolida pada 3 hewan coba kelinci setelah pemberian kapsul yang berisi campuran ekstrak sambiloto dan kunyit.

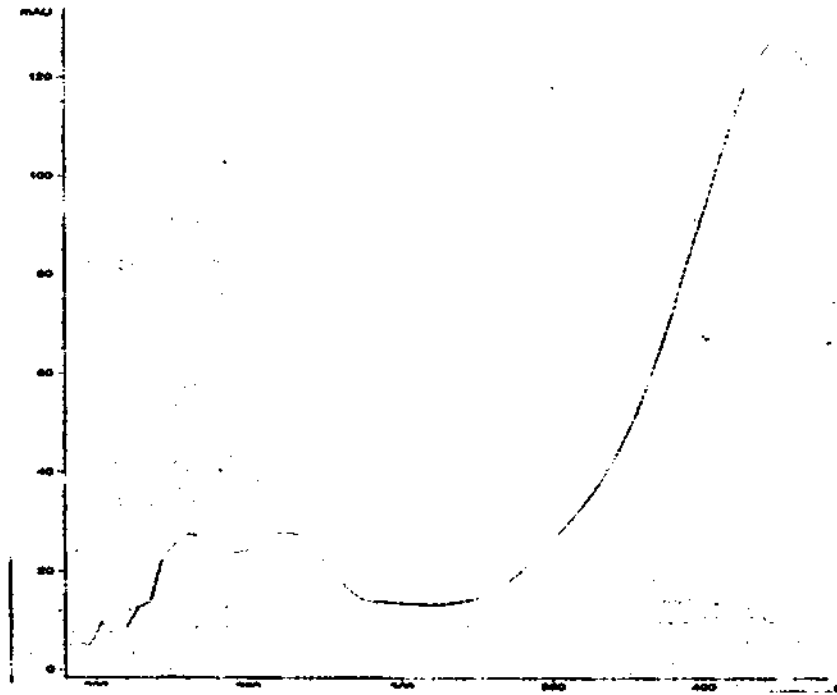
Kelinci	$t_{maks}$ (menit)	$C_{maks}$ (ppm)	$AUC$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{menit}/\text{ml}$ )
A	90	4,410	684,8413
B	60	3,645	595,7245
C	90	3,060	541,0575



**Gambar 24** Profil kadar andrografolida dalam sampel serum kelinci A, B, C secara overlay

### 9. Pemilihan $\lambda$ maks kurkumin

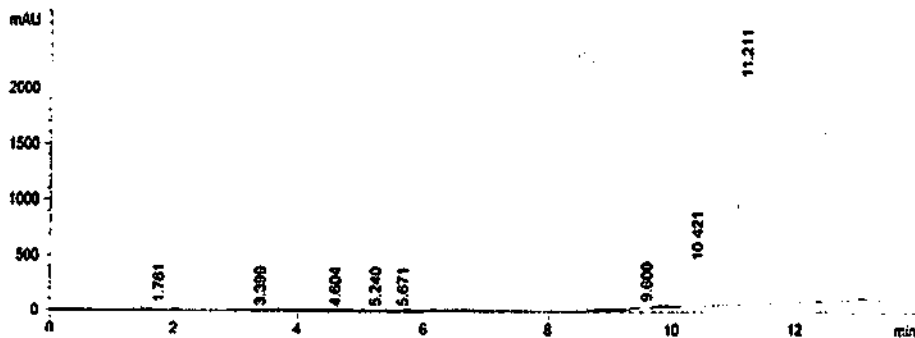
Data kromatogram kurkumin campuran ekstrak sambiloto dan kunyit yang dianalisis dengan instrumen HPLC yang dilengkapi dengan *Diode array detector* dan dianalisis pada panjang gelombang 300-500 nm untuk mencari pada panjang gelombang berapa kurkumin memberikan absorbansi yang terbesar dan terpisah dari puncak yang lain. Untuk selanjutnya digunakan  $\lambda$  425 nm sebagai panjang gelombang pengamatan kurkumin.



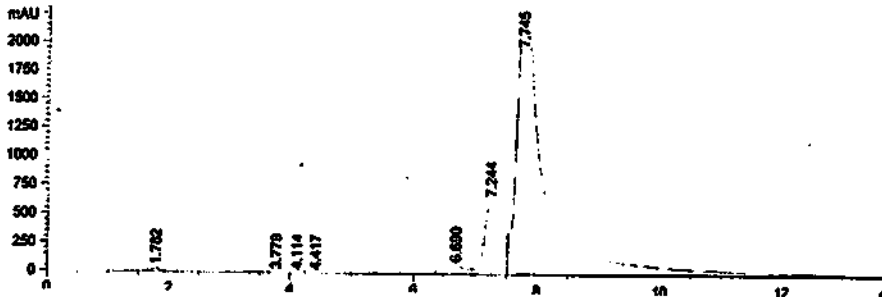
**Gambar 25** Spektrum kurkumin dalam campuran ekstrak sambaloto dan kunyit yang diamati pada  $\lambda = 425 \text{ nm}$  menggunakan fase gerak asetonitril : asam asetat 1% = 50:50

### 9.1 Optimasi fase gerak kurkumin

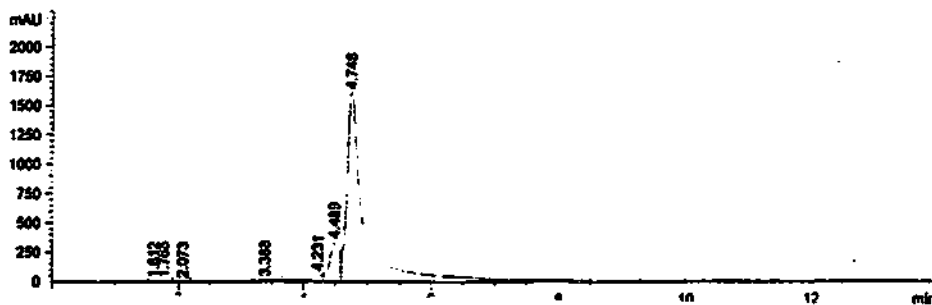
Penyuntikkan kurkumin dari campuran ekstrak sambaloto dan kunyit dalam metanol dengan beberapa macam perbandingan komposisi fase gerak asetonitril : asam asetat 1% didapatkan data seperti pada gambar 26; 27; 28; 29.



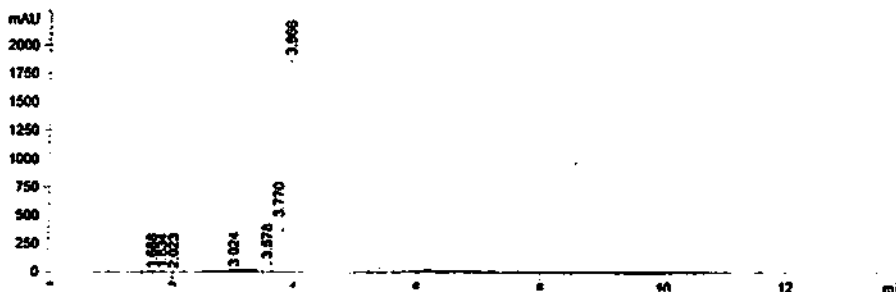
**Gambar 26** Kromatogram kurkumin dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam metanol dengan fase gerak asetonitril: asam asetat 1% = 50:50 (tR = 11,211 menit), λ = 425 nm



**Gambar 27** Kromatogram kurkumin dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam metanol dengan fase gerak asetonitril: asam asetat 1% = 55:45 (tR = 7,745 menit), λ = 425 nm

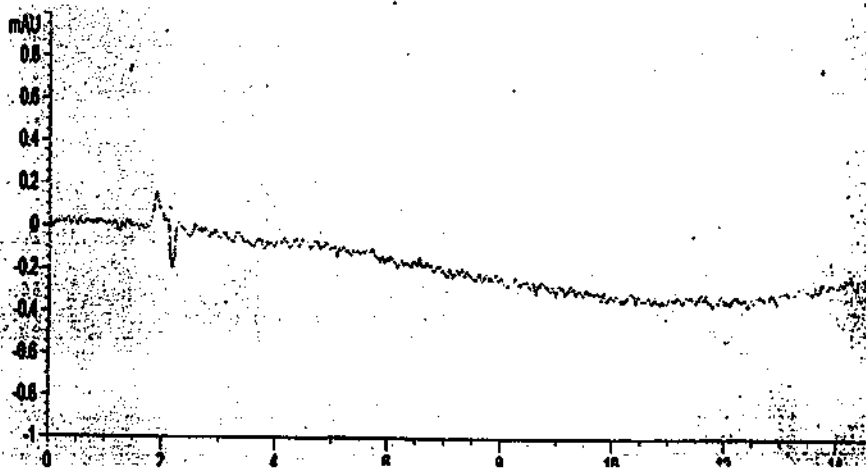


**Gambar 28** Kromatogram kurkumin dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam metanol dengan fase gerak asetonitril: asam asetat 1% = 65:35 (tR = 4,748 menit), λ = 425 nm

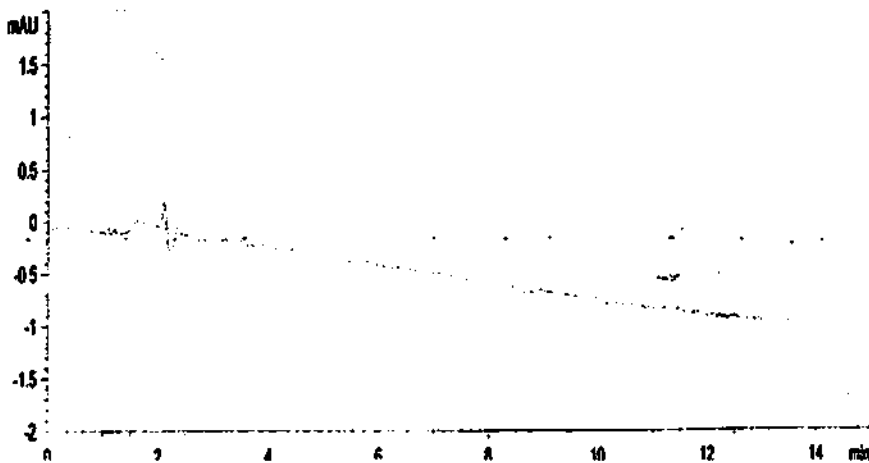


**Gambar 29** Kromatogram kurkumin dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam metanol dengan fase gerak asetonitril: asam asetat 1% = 70:30 (tR = 3,968 menit), λ = 425 nm

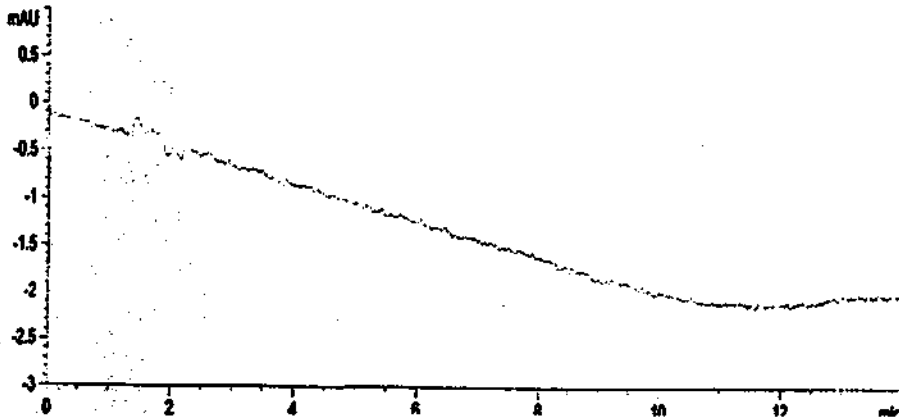
Penyuntikkan kurkumin dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum dengan beberapa macam perbandingan komposisi fase gerak asetonitril : asam asetat 1% didapatkan data seperti pada gambar 30; 31; 32; 33; serta tabel 31.



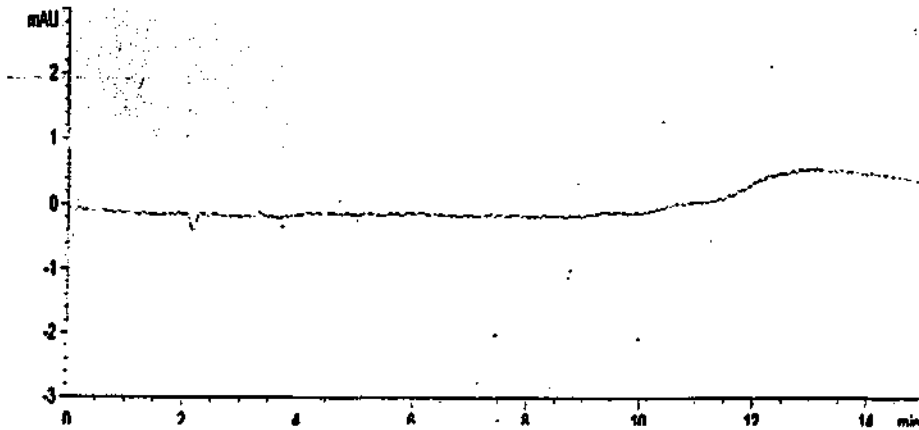
**Gambar 30** Kromatogram kurkumin dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum dengan fase gerak asetonitril: asam asetat 1% = 50:50,  $\lambda = 425 \text{ nm}$



**Gambar 31** Kromatogram kurkumin dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum dengan fase gerak asetonitril : asam asetat 1% = 55:45,  $\lambda = 425 \text{ nm}$



**Gambar 32** Kromatogram kurkumin dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum dengan fase gerak asetonitril: asam asetat 1% = 65:35,  $\lambda = 425 \text{ nm}$



**Gambar 33** Kromatogram kurkumin dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam serum dengan fase gerak asetonitril : asam asetat 1% = 70:30,  $\lambda = 425 \text{ nm}$

**Tabel 31 Waktu tambat, selektivitas ( $\alpha$ ), dan resolusi ( $R_s$ ) kurkumin dari campuran ekstrak sambiloto dan kunyit dalam metanol pada beberapa macam perbandingan komposisi fase gerak asetoni tril : asam asetat 1%**

Komposisi fase gerak		tR Kirkumin	Selektivitas	Resolusi ( $R_s$ )
Asetonitril (%)	Asam asetat (%)			
50	50	11,211	1,08	1,07
55	45	7,745	1,07	0,81
65	35	4,748	1,06	0,86
70	30	3,966	1,05	0,80

Selanjutnya pada penelitian ini digunakan komposisi kurkumin dalam metanol dengan fase gerak asetoni tril : asam asetat 1% = 50 : 50. Pada perbandingan komposisi ini harga  $\alpha$  telah memenuhi syarat, yaitu 1,07 (syarat > 1), dan harga  $R_s$  = 1,07 juga telah memenuhi syarat (syarat >1).

Dari data tersebut diatas, kondisi HPLC yang dipakai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Fase gerak = asetoni tril : asam asetat 1% (50 : 50)
- Detektor = Diode Array Detector
- $\lambda$  = kurkumin (425 nm)
- Kolom = Nucleodur.RP C18 (150 x 4,0 mm x 5 $\mu$ m).
- Flow rate = 1,0 ml/min

#### 10. Linieritas kurkumin

Penyuntikkan larutan baku kerja kurkumin dalam metanol dengan beberapa kadar pada HPLC yang menggunakan fase gerak asetoni tril : asam asetat 1% = 50 : 50 menghasilkan perbandingan kadar terhadap area kromatogram kurkumin dapat dilihat pada tabel 32 Sedangkan gambar kurva bakunya pada gambar 34. Dari data di atas, maka dibuat persamaan garis antara kadar kurkumin dengan area kromatogram kurkumin.



**Tabel 32 Kadar dan area kromatogram kurkumin pada penentuan linieritas**

No.	Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Area
1.	25	3186,10132
2.	28	3510,10400
3.	30	3821,66992
4.	35	4536,10937
5.	40	5152,18555

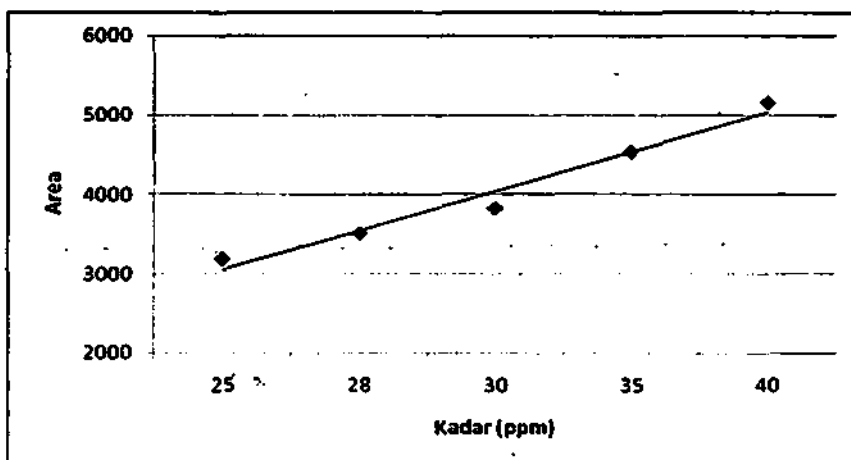
Persamaan kurva baku :

$$Y = 128,77498 x + 23,37939$$

$$r = 0,99970$$

$$V_{xo} = 2,02\%$$

Data tersebut menunjukkan bahwa ada hubungan linier antara kadar kurkumin pada rentang 25-40  $\mu\text{g/ml}$  dengan area kromatogram kurkumin.

**Gambar 34 Kurva linieritas kurkumin**

Kurkumin yang terkandung dalam campuran ekstrak sambiloto dan kunyit setelah diberikan per oral pada kelinci tidak terdeteksi kadarnya sehingga persen akurasi, presisi, lod-loq, dan analisis data tidak dapat dihitung.

## BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa keseragaman bobot kapsul, rata-rata persen penyimpangan bobot isi kapsul adalah  $1,29\% \pm 0,88$ . Hasil rata-rata pengujian waktu hancur untuk kapsul campuran ekstrak sambiloto kunyit adalah  $483,33 \pm 16,26$  detik atau 8 menit lebih 3 detik. Keseragaman kandungan rata-rata andrografolida  $96,79\%$  dan KV  $4,97\%$  dan rerata kandungan kurkumin  $103,27\%$  dan KV yaitu  $3,80\%$ . Hasil disolusi menunjukkan bahwa pada menit ke 180, pelepasan andrografolida tergolong cukup kecil yaitu  $11,34 \text{ mg/L} \pm 0,61$  dengan persen andrografolida terlarut yaitu  $34,50\% \pm 1,86$  serta efisiensi disolusi andrografolida adalah  $17,53\% \pm 0,63$ . Sedangkan pada pelepasan kurkumin sampai menit ke 180 tidak ada puncak yang dapat dideteksi, sehingga kelarutan kurkumin tidak bisa ditentukan. Parameter bioavailabilitas yang diperoleh untuk andrografolida, yaitu  $t_{\text{maks}} = 60-90$  menit,  $C_{\text{maks}} = 3,060 - 4,410$  ppm,  $AUC_{0-180} = 541,0575 - 684,8413$   $\mu\text{g.ml/menit}$ . Parameter bioavailabilitas untuk kurkumin tidak dapat dihitung karena kurkumin tidak terdeteksi dalam darah.

### 5.2. SARAN

Pertu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap uji klinik pada manusia, sehingga campuran kapsul sambiloto dan kunyit dan digunakan dalam sistem kesehatan formal jika menunjukkan efek secara klinis

## DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal BB, Kumar A, Aggarwal MS, and Shishodia S., 2005. Curcumin derived from turmeric (*Curcuma longa*): a spice for all seasons. In: Preuss H, ed. **Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention**. Boca Raton: CRC Press:349-387.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A. and Aggarwal, B.B. 2007. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Mol Pharm**. 4(6):807-18.
- Anggraini, F.N., 2007. Aktivitas Campuran Ekstrak Etanol Herba Sambitoto dan Rimpang Kunyit terhadap Sel Kanker Payudara Manusia T47D In Vitro dengan Metode MTT, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Anonim, 2008. *Andrographis*.  
<http://www.thirdage.com/ebSCO/files/21485.html>, diakses tanggal 16 April 2008.
- Bourne, K.Z., Bourne, N., Reising, S.F., and Stanbery, L.R., 1999. Plant Products as Topical Icrobicide Candidates: Assesment of In-vitro and In-vivo Activity Against Herpes Virus Type-2. in *Kurkumin Sebagai Obat Kanker: Menelusuri Mekanisme Aksinya* oleh Meiyanto, Edy. **Majalah Farmasi Indonesia**, Vol. 10 No. 4, hal. 224-236.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U. and Banerjee, K. 2004. Tumeric and curcumin: Biological Actions and Medicinal Applications. **Current Science**, Vol. 87, No. 1, hal. 44-50.
- Departemen Kesehatan RI, 1977. **Materia Medika Indonesia** jilid I. Jakarta. hal.47-52.
- Departemen Kesehatan RI, 1979. **Materia Medika Indonesia** jilid III. Jakarta. hal. 20-25.
- Firdaus, C., 2008. Validasi Metode KCKT untuk Analisis Kurkumin dalam Sediaan Kapsul, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Ganiswarna, S.G.,2005. **Farmakologi dan Terapi**. Edisi 4, Gaya Baru, Jakarta, hal. 686-701.
- Ghosh, M.N., 1971. **Fundamental of Experimental Pharmacology**, Scientific Book Agency, Calcuta, hal. 84-90.
- Hadjar , M.M.I., 1985. Teknik Analisis Obat Dalam Cairan Biologis Dengan GLC dan HPLC, **Cermin dunia Kedokteran**, No 37, hal. 26-31.

- Heath, D. D., Pruitt, M. A., Brenner, D.E. and Rock, C.L., 2003. Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 783: 287-295.
- Heyne K., 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid II*, diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan, departemen Kehutanan, Jakarta.
- Holder, G.M., Plummer, J.L. and Ryan, A.J. 1978. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica*, 8(12):761-8.
- Ireson, C., Orr, S., Jones, D., Verschoyte, R., Lim, C.K., Luo, J.L., Howells, L., Plummer, S., Jukes, R., Williams, M., Steward, W. and Gescher, A., 2001. Characterization of Metabolites of the Chemopreventive Agent Curcumin in Human and Rat Hepatocytes and in the Rat *in Vivo*, and Evaluation of Their Ability to Inhibit Phorbol Ester-induced Prostaglandin E<sub>2</sub> Production. *American Association for Cancer Research (United Kingdom)* 61, 1058-1064.
- Jada, S.R., Subur, G.S., Matthews, C., Hamzah A.S., Lajis, N.H. and Saad, M.S., 2007. Semisynthesis and *in vitro* anticancer activities of andrographolide analogues. *Phytochemistry. (Malaysia)* 68(6):904-12.
- Kumaran, K. S., Thirugnanasambantham, P., Viswanathan, S. and Ramamurthysree, M. 2003. An HPLC Method for The Estimation of Andrographolide in Rabbit Serum. *Indian Journal of Pharmacology* 35: 109-112.
- Mardiswojo, S dan Rajakmangunsudarso, H., 1985. *Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang*. Balai Pustaka, hal. 177-31.
- Matsuda, T., M. Kuroyanagi, S. Sugiyama, K. Umehara, A. Ueno, and K. Nishi. 1994. Cell-differentiation-inducing diterpenes from *Andrographis paniculata* Nees. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)* 42(6):1216-25.
- Mehta K, Pantazis P, McQueen T, and Aggarwal BB., 1997. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. *Anticancer Drugs (USA)*, 8:470-481.
- Mulja, M dan Hanwar, D., 2003. Prinsip-Prinsip Cara Bertlaboratorium yang Baik (Good Laboratory Practice) oleh Meiyanto, Edy. *Majalah Farmasi Airlangga*, Vol. 3 No. 2, hal. 71-6.
- Nikolin, B., Imamovic, B., Medanhodzic-Vuk, S., Sober, M., 2004. High Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analyses. *Basic Medical Science (Sarajevo)* 4(2):5-9.

Official Methods of Analysis of **AOAC INTERNATIONAL** (2000) 17<sup>th</sup> Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 999.11.

Paget and Barnes, 1964, **Evaluation of Drug Activities A Pharmacometrics**, eds. Laurance and Bacharach, vol. I, Academic Press, New York

Panossian A; Hovhannisyanyan A; Mamikonyan G; Abrahamian H; Hambardzumyang E; Gabrielian E; Goukasova G; Wikman G; Wagner H .. 2000. Pharmacokinetic and oral bioavailability of andrografolide from *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jang in rats and human. **Phytomedicine**. 7 (5): 351-64.

Ristchel W.A. 1974. **Laboratory Manual of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**. Drug Intelligence Publication, Inc.

Sajital, G.B.; Chithra, P. and Chandrakasan, G., 1998. Effect of Curcumin on Advanced Glycation and Cross-linking of Collagen in Diabetic Rats in Kurkumin Sebagai Obat Kanker: Menelusuri Mekanisme Aksinya oleh Meiyanto, Edy. **Majalah Farmasi Indonesia**, Vol. 10 No. 4, hal. 224-36.

Samuel, J., Ma, Z., Shayeganpour, A., Brocks, D.R., Lavasanifar, A., 2007. High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin. **Biomed Chromatography (Canada)** 21(5): 546-52.

Satoskar, R.R.; Shah, S.J. and Shenoy, S.G., 1986. Evaluation of Anti-inflammatory Property of Curcumin (diferuloyl methane) in Patient with Postoperative Inflammation in Kurkumin Sebagai Obat Kanker: Menelusuri Mekanisme Aksinya oleh Meiyanto, Edy. **Majalah Farmasi Indonesia**, Vol. 10 No. 4, hal. 224-236.

Shargel, L. And Andrew Yu. 2005. **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**. 4<sup>th</sup> ed. Appleton and Lange, New Jersey.

Sharma, R. A., McLelland, H. R., Hill, K. A., Ireson, C.R., Euden, S.A., Manson M.M., Pirmohamed, M., Marnett, L.J., Gescher, A.J. and Steward, W.P. 2001. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 7: 1894-1900

Singh S., Khar A., 2006. Biological Effects of Curcumin and Its Role in Cancer Chemoprevention and Therapy. **Anticancer Agents Medical Chemistry (India)** 6(3):259-70.

Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal**. Edisi ke-2, Surabaya:Airlangga University Press, hal. 163-4.

Sukardiman., 2007. Mekanisme Induksi Apoptosis Pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb. dan Andrografolida dari *Andrographis paniculata* Nees. Terhadap Sel Kanker Manusia secara In vitro dan Implikasinya pada Penggunaan secara In Vivo, **Disertasi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Syamsuhidayat, S.S., dan Hutapea, J.R., 1991, **Inventaris Tanaman Obat Indonesia**, Jilid I, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. 54-55.

**The Merck Index**. 1996. Merck & CO., INC. White House Station, NJ

**United State Pharmacopeial Convention, INC** 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852

Uripi, V., 2002. **Menu untuk Penderita Kanker**. Jakarta: Puspa Swara.

Wangboonskul, J., Daodee, S., Jarukarnjom, K. and Sripanidkulchai, B., 2006. Pharmacokinetic Study of *Andrographis paniculata* Tablets in Healthy Thai Male Volunteers. **Thai Pharmaceutical and Health Science Journal**, Vol. 1 No. 3, hal. 209-218.

Wijayakusuma, H.M.H., 1996, **Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia**, Jilid ke 2, Pustaka Kartini, Jakarta, hal. 117-119.

Viciano, V., 2009. Mutu Fisik dan Kimia dari Sediaan Kapsul Campuran Ekstrak Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dan Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica* Val.). **Skripsi**. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Vijaykumar, K., Murthy, P.B.S., Kannababu, S., Syamasundar, B. and Subbaraju, G.V., 2007. Estimation of Andrographolide in *Andrographis paniculata* Herb, Extracts and Dosage forms. **International Journal of Applied Science and Engineering (India)** 5(1): 27-39.

[www.Gizi.net](http://www.Gizi.net) diakses pada bulan 20 Mei 2008.

[www.NationalCancerInstitute.gov](http://www.NationalCancerInstitute.gov) diakses pada bulan 10 Mei 2008.

[www.Pfizerpeduli.com](http://www.Pfizerpeduli.com) diakses pada bulan 30 Desember 2007.

[www.The Jakarta Post . com](http://www.TheJakartaPost.com) diakses pada bulan 20 Mei 2008.

[www.Curcumin.co.nz/PDF/curcumin the indian solid gold.pdf](http://www.Curcumin.co.nz/PDF/curcumin_the_indian_solid_gold.pdf). diakses pada bulan 25 agustus 2008

Yang, K.Y., Lin, L.C., Tseng, T.Y., Wang, S.C., Tsai, T.H., 2007. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B (Taiwan)* 853: 183-9.

Yulianti, F., 2004. Penentuan Parameter Bioavailabilitas Isolat Andrografolida pada Kelinci dengan Metode HPLC. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.