

# Isolasi dan Identifikasi Andrografolida dari Herba *Andrographis paniculata* Ness

Suharmiati, Lestari Handayani\*

## Abstract

Andrographolide is the main constituent of *Andrographis paniculata* Ness (AP) which was poorly soluble in water and bitter taste. As diterpenoid lactone andrographolide has many biological activities, some of them are immunostimulant, anti malaria, hepatoprotector and anti mutagenic.

The objective of this study were isolation and identification andrographolide from AP. In this study AP metanol extracted by percolation. Filtrate was collected and congealed ad viscous and was shaken by ethylacetate - water (1:1). Ethylacetate fraction was congealed until crystal formed. Recrystallization with hot metanol repeatedly until pure andrographolide isolate. Identification of andrographolide isolate by thin layer chromatography (TLC), UV spectrophotometer, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Fourier Transform Infra Red.

Result of this study showed that from one kilogram AP herbs dried is produced 0,43% andrographolide isolate as identic as andrographolide standard (Sigma). The continued research to develop phytopharmaca product that consist andrographolide or AP herbs is needed to minimize taste bitter or to increase solubility is water so that its useful in health services.

## Pendahuluan

Herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) merupakan salah satu tanaman obat yang banyak dimanfaatkan sebagai bahan obat tradisional. Data pustaka menyebutkan kandungan kimia berupa diterpen lakton dan flavonoid. Dari kandungan kimia tersebut andrografolida merupakan kandungan utama dari herba ini. Andrografolida mempunyai sifat sukar larut dalam air, rasa sangat pahit serta berbentuk lempeng segi empat.

Dari berbagai penelitian diketahui bahwa andrografolida mempunyai berbagai efek farmakologi antara lain sebagai imunostimulan pada tikus (Puri *et al*, 1993), mempunyai aktifitas hepatoprotektif terhadap metabolit galaktosamin, parasetamol dan karbon tetraklorida yang bersifat toksik pada hepar tikus secara *in vitro* (Handa & Sharma, 1990 ; Visen *et al* , 1993), anti malaria (Rahman *et al*, 1999) dan sebagai anti kanker yaitu aktivitas menginduksi deferensiasi sel myeloid leukemia (Matsuda *et al* , 1994).

Mengingat pemerintah menggalakkan obat tradisional berbentuk fitofarmaka maka identifikasi suatu jenis tanaman obat perlu lebih mendalam sampai diketahui zat berkhasiat yang terkandung di dalamnya. Terkait hal tersebut, maka isolasi dan identifikasi herba sambiloto sangat penting untuk disampaikan mengingat pemanfaatannya sebagai obat tradisional bentuk jamu sudah sangat luas. Dengan isolasi dan identifikasi tersebut diharapkan herba sambiloto dapat dikembangkan menjadi fitofarmaka yang mampu melayani kebutuhan obat dalam pelayanan kesehatan formal.

## Bahan dan Cara

Digunakan herba sambiloto yang ditanam dari daerah Kediri, andrografolida baku (Sigma) serta reagen kimia berupa metanol dan etilasetat (redistilasi dari derajat teknis), khloroform p.a (E Merck) dan metanol p.a (E Merck).

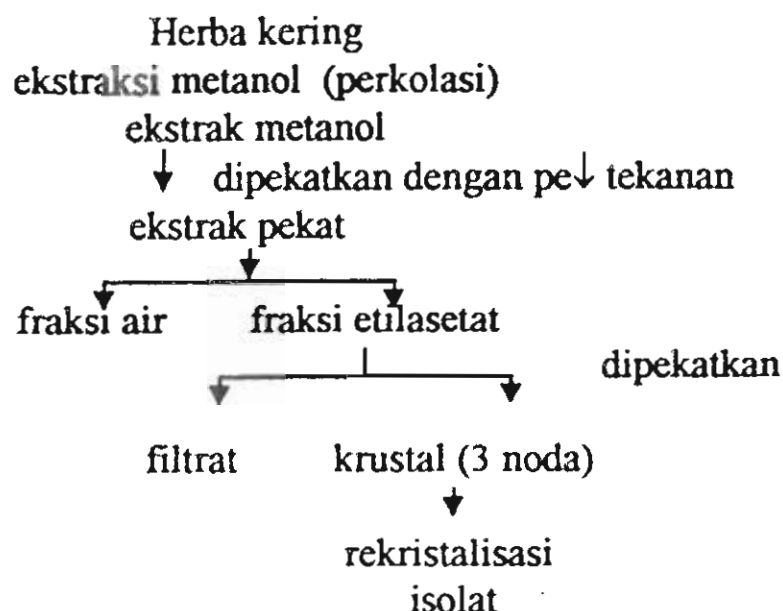
\*) Pusat Penelitian dan Pengembangan Pelayanan Teknologi Kesehatan

Alat penelitian yang digunakan adalah alat-alat gelas, rotavapor, pompa vakum, KLT (Plate silika gel 254 GF), FTIR (Jasco FTIR-5300), X-Ray Diffractometer System (Jeol, JDX-3530) dan NMR (Hitachi R-1900).

Untuk mengisolasi andrografolida dilakukan beberapa tahapan kegiatan. Serbuk kering herba sambiloto (pengeringan tidak dengan matahari langsung) sebanyak 1 kg

diperkolasi menggunakan metanol. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan, kemudian dikocok dengan pelarut campuran etilasetat-air (1:1). Fraksi etilasetat yang diperoleh dipekatkan, kemudian didiamkan hingga terbentuk kristal dan disaring. Dilakukan rekristalisasi berulang dengan metanol panas hingga diperoleh andrografolida isolat, dimana jika diuji dengan KLT menunjukkan satu noda.

Secara skematis dapat digambarkan sebagai berikut:



Untuk mengidentifikasi andrografolida, maka perlu dilakukan karakterisasi, kemudian dibandingkan dengan karakter standart. Karakterisasi menggunakan KLT, spektrum IR, UV pada panjang gelombang 200-300 nm serta karakterisasi Resonansi Magnet Inti.

### 3. Hasil dan Pembahasan

#### a. Isolasi andrografolida dari herba *Andrographis paniculata* Ness

Dari hasil ekstraksi 1 kilogram serbuk herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) diperoleh ekstrak metanol sebanyak 4580 gram, setelah dipekatkan didapatkan ekstrak kental sebanyak 200 gram. Setelah dilakukan fraksinasi dan rekristalisasi berulang diperoleh andrografolida isolat sebanyak 4,3245 gram, sehingga kadar yang diperoleh  $4,3245/1000 \times 100\% = 0,43\%$ .

Pemilihan metode perkolasi dalam isolasi andrografolida dipertimbangkan karena dapat mengekstraksi zat aktif secara sempurna. Hal tersebut disebabkan karena proses reaksi yang terjadi berjalan ke kanan artinya setelah zat aktif mengadakan keseimbangan dengan solven, maka zat aktif tidak akan berdifusi kembali ke

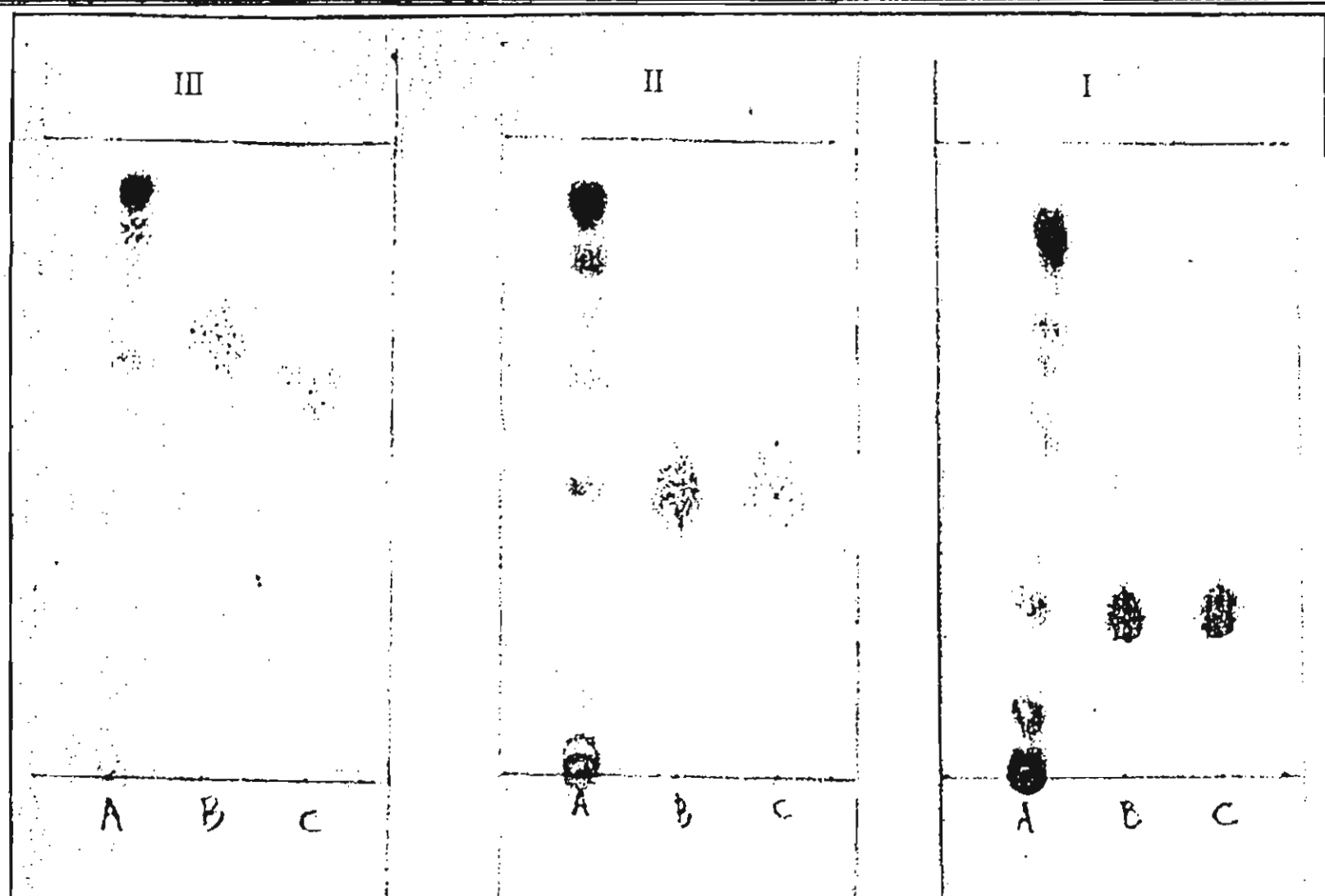
sel, karena adanya proses pengaliran dari miscella. Oleh karena itu dengan perkolasi sebagian besar zat aktif akan terekstraksi. Disamping itu metode perkolasi dapat digunakan untuk sampel dalam jumlah besar.

Pengocokan ekstrak metanol dengan etilasetat - air harus dilakukan dengan pelan agar tidak terbentuk emulsi sehingga mengakibatkan pemisahan tidak terjadi. Hal ini disebabkan karena adanya kandungan saponin pada herba sambiloto.

#### Identifikasi andrografolida

##### Identifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT)

Sebelum dilakukan identifikasi andrografolida dengan KLT, terlebih dahulu dilakukan pemilihan pelarut pengembang khlroform : metanol masing-masing dengan perbandingan 9:1 ; 8:2 dan 7:3. Hasil KLT dari bermacam-macam sistem pelarut pengembang adalah sebagai berikut:



Gambar 1 Kromatogram simplisia herba sambiloto (A), andrografolida baku (Sigma) (B) dan andrografolida isolat (C) yang dilarutkan dalam metanol dengan bermacam-macam sistem pelarut pengembang pada lempeng silika gel GF 254 dan penampak noda anisaldehida asam sulfat.

Keterangan:

- I : Khloroform:Metanol = 9 : 1
- II : Khloroform:Metanol = 8 : 2
- III : Khloroform:Metanol = 7 : 3

Pada gambar 1 dapat diketahui bahwa meskipun ketiga sistem pelarut pengembang dapat memisahkan komponen dari herba sambiloto ( $A_I$ ,  $A_{II}$  dan  $A_{III}$ ), tetapi noda yang lebih jelas (sensitivitas yang lebih baik) terlihat pada penggunaan sistem pelarut pengembang khloroform : metanol = 9 : 1.

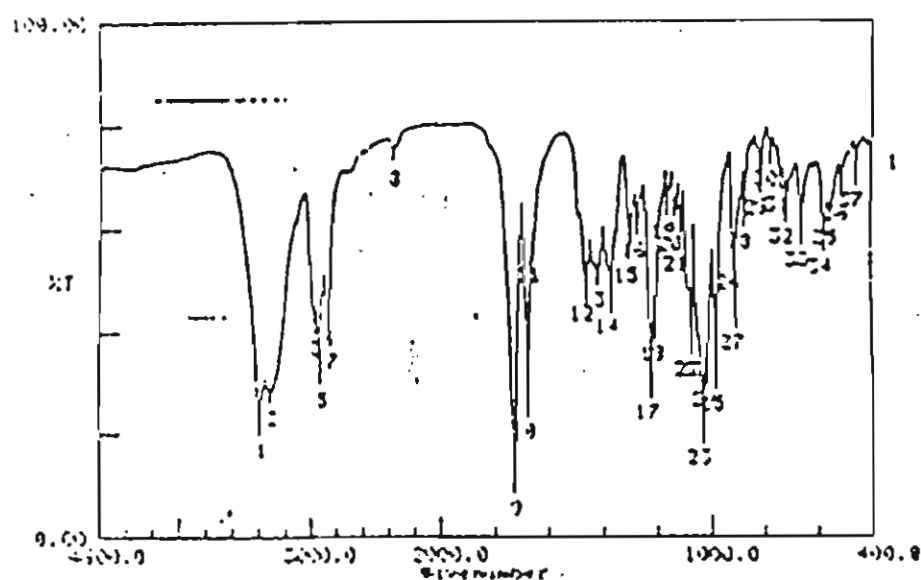
Setelah dilakukan pemilihan pelarut pengembang kemudian dilakukan perhitungan  $R_f$  pada andrografolida baku maupun isolat pada fase gerak khloroform : metanol (9 : 1) seperti terlihat pada gambar 3.1 I. Dari gambar tersebut diperoleh harga  $R_f$  yang sama antara andrografolida isolat dan andrografolida baku yaitu 0,25, sehingga disimpulkan bahwa andrografolida isolat identik dengan andrografolida baku.

Identifikasi secara KLT terhadap andrografolida isolat dan baku dengan fase gerak khloroform : metanol (9 : 1) dan fase diam silika gel serta penampak noda anisaldehida asam sulfat memberikan satu bercak warna ungu dan tidak menunjukkan perbedaan harga  $R_f$  yaitu 0,25. Adanya bercak berwarna ungu dengan penampak noda anisaldehida asam sulfat dapat memberikan petunjuk bahwa isolat mempunyai senyawa golongan terpenoid.

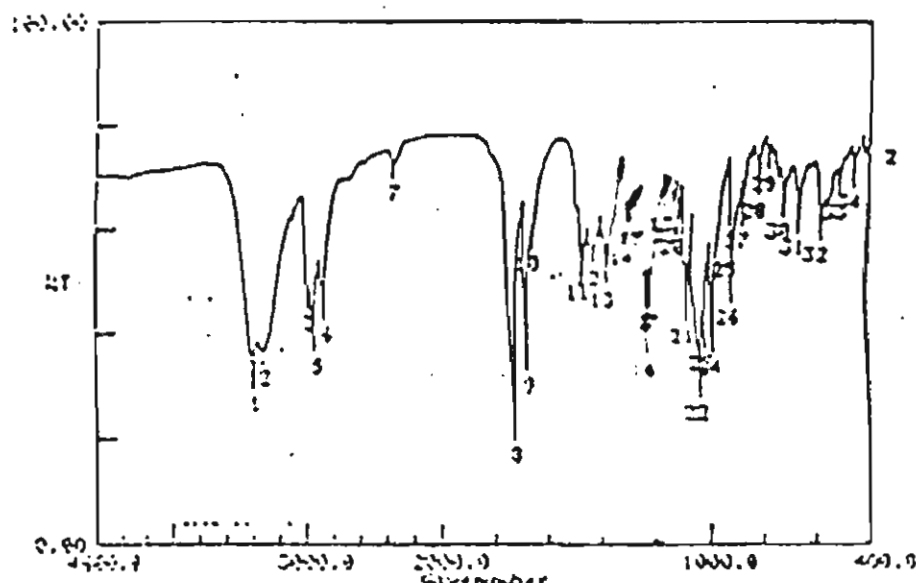
## 2. Identifikasi menggunakan spektrofotometer infra merah (FTIR)

Spektrum infra merah andrografolida isolat dan andrografolida baku ditunjukkan oleh gambar 3.2 dan 3.3 dengan nilai bilangan gelombangnya terlihat sebagai berikut:

**Gambar 2**  
**Spektrum Infra Merah Andrografolida Isolat**  
**pada Pellet KBr Menggunakan**  
**Jasco FTIR-5300**



**Gambar 3**  
**Spektrum Infra Merah Andrografolida Baku-**  
**pada Pellet KBr Menggunakan**  
**Jasco FTIR-5300**



**Tabel 1**  
**Bilangan Gelombang Dari Andrografolida Isolat Dan Baku (Sigma) Diamati Dengan Jasco FTIR-5300 Dikomparasikan Dengan Andrografolida Pustaka (Matsuda *Et Al*, 1994)**

| Isolat | Anrografolida Baku | Andrografolida Pustaka | Keterangan                              |
|--------|--------------------|------------------------|-----------------------------------------|
| 3399   | 3399               | 3414                   | gugus hidroksil dengan ikatan hidrogen  |
| 1728   | 1728               | 1724                   | gugus fungsi $\gamma$ -lakton           |
| 1674   | 1647               | 1673                   | gugus fungsi $\alpha,\beta$ tidak jenuh |
| 906,6  | 906,6              | 905                    | gugus ikatan rangkap eksometilena       |

Dari bilangan gelombang yang terbaca pada kedua spektra tersebut menunjukkan adanya gugus hidroksil dengan ikatan hidrogen, gugus dari  $\gamma$ -lakton, gugus  $\alpha,\beta$  tidak jenuh serta gugus ikatan rangkap eksometilena. Terdapat kesesuaian bilangan gelombang andrografolida isolat, andrografolida baku dan pustaka (Tabel 3.1), sehingga dapat disimpulkan bahwa andrografolida isolat dan baku memiliki karakteristik yang identik dengan struktur kimia andrografolida pustaka.

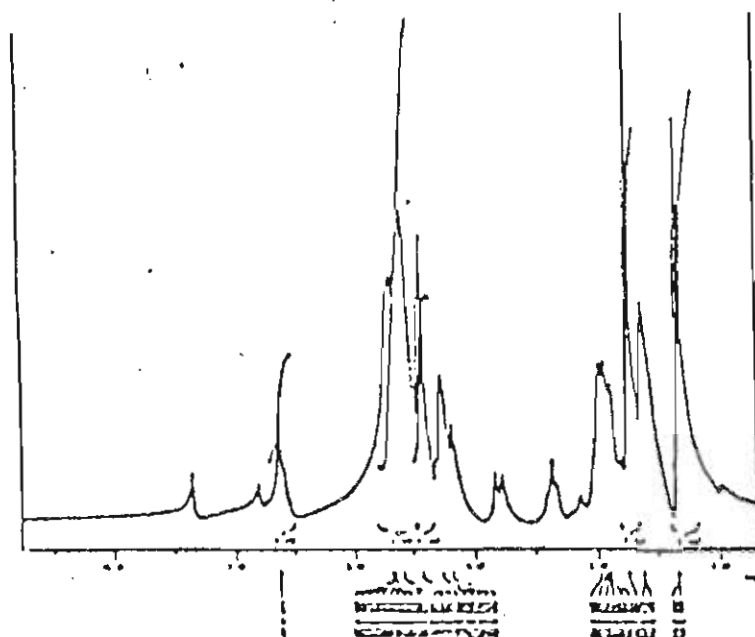
Hasil identifikasi dengan infra merah terhadap isolat menunjukkan puncak serapan pada bilangan gelombang 3399, 1728, 1674 dan 906,6  $\text{cm}^{-1}$ . Serapan pada bilangan gelombang 3398  $\text{cm}^{-1}$  merupakan ciri khas vibrasi ulur gugus hidroksil dengan ikatan hidrogen. Bilangan gelombang 1728  $\text{cm}^{-1}$  dan 1674  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan gugus fungsi dari  $\gamma$  lakton- $\alpha,\beta$  tidak jenuh, sedangkan bilangan gelombang

906,6  $\text{cm}^{-1}$  memberikan informasi adanya gugus ikatan rangkap ekso-metilena. Gugus-gugus fungsi tersebut merupakan ciri spesifik dari senyawa diterpen lakton pada *Andrographis paniculata*. Spektrum IR (KBr) dari isolat identik dengan spektrum IR dari andrografolida standar (Sigma) (Gambar 2 dan 3). Menurut pustaka (Matsuda *et al*, 1994) spektrum IR dari senyawa andrografolida menunjukkan adanya serapan pada bilangan gelombang 3414, 1724, 1673 dan 905  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3. Identifikasi menggunakan resonansi magnet inti (RMI)

Spektrum RMI proton  $^1\text{H}$  (90 Mhz, piridina-d5) dari andrografolida isolat dan baku ditunjukkan oleh gambar 4 dan 5.

**Gambar 4**  
Spektrum RMI<sup>1</sup>H Andrografolida Isolat  
Diamati dengan NMR (Hitachi R-1900  
90 Mhz, piridin d5)



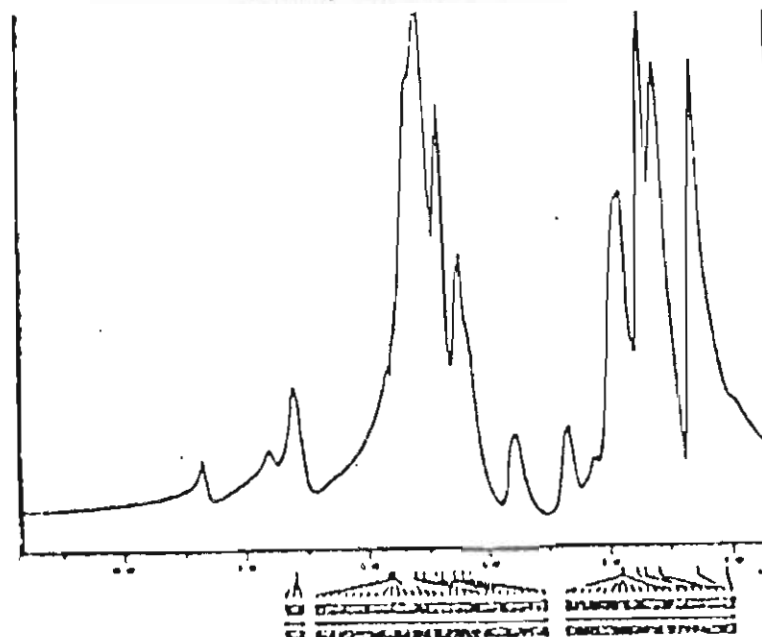
Berdasarkan spektra RMI<sup>1</sup>H dari andrografolida isolat dan baku terdapat kesesuaian interpretasi kimia andrografolida isolat dan baku, sehingga diperoleh kesimpulan andrografolida isolat identik dengan andrografolida baku.

Spektrum isolat andrografolida yang diperoleh dengan spektrometri RMI<sup>1</sup>H (90 Mhz, piridin-d5) dikomparasikan dengan spektrum RMI<sup>1</sup>H senyawa andrografolida pada pustaka (500 Mhz, piridina-d5) seperti tertera pada tabel 5.2. Menurut Matsuda *et al* (1994), posisi proton pada  $\delta$  ppm : 2,71 (t) merupakan posisi proton H-11, tetapi bila melihat puncak resonansi proton triplet pada daerah ini seharusnya merupakan posisi proton H-9 karena munculnya puncak triplet diakibatkan oleh 1 proton pada H-9 yang diapit oleh 2 proton pada H-11.

Posisi proton H-12 pada spektrum RMI<sup>1</sup>H dari isolat A menunjukkan puncak resonansi triplet, sesuai dengan struktur molekul andrografolida dan spektrum RMI<sup>1</sup>H pada pustaka, karena 1 proton pada H-12 diapit oleh 2 proton pada H-11.

Pada pustaka, posisi proton H-18 terletak pada  $\delta$  (ppm) : 1,51 dengan integrasi = 2H. Bila diperhatikan atom C18 pada struktur senyawa andrografolida memiliki gugus metil (-CH<sub>3</sub>), dengan demikian seharusnya posisi proton H-18 terletak pada  $\delta$  (ppm) = 1,27. Posisi proton dan gugus metil pada H-18 kurang terperisai dibandingkan proton dari gugus metil pada H-20 ( $\delta$  = 0,69) karena proton pada H-18 dipengaruhi oleh gugus OH dari C-3 dan C-19.

**Gambar 5**  
Spektrum RMI<sup>1</sup>H Andrografolida Baku  
Diamati dengan NMR (Hitachi R-1900  
90 Mhz, piridin d5)

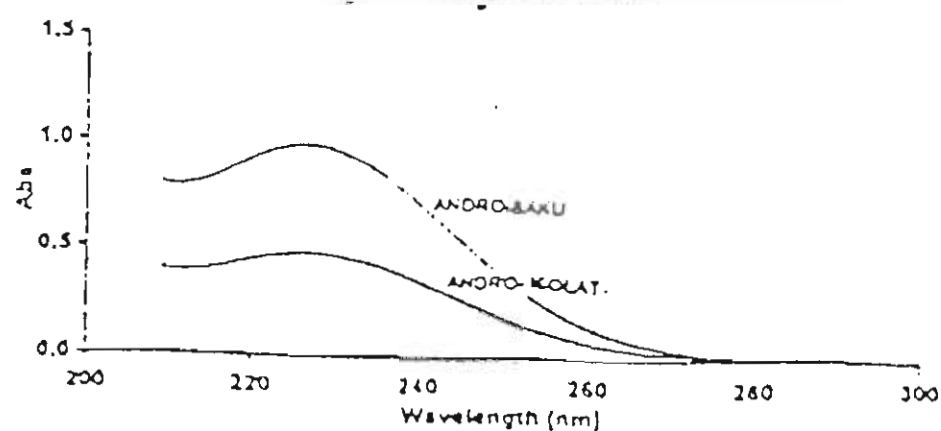


Hasil penelitian dari posisi proton H-14, H-15, H-17 dan H-19 terletak pada  $\delta$  (ppm) : 4,2 - 5,8, tidak seperti yang diperlihatkan pada pustaka dimana pada masing-masing posisi proton terletak pada  $\delta$  (ppm) yang berbeda. Hal ini dapat terjadi karena perbedaan resolusi alat yang digunakan, dimana pada analisis RMI<sup>1</sup>H isolat, alat yang digunakan mempunyai daya resolusi yang rendah (90 MHz), sedangkan analisis RMI<sup>1</sup>H andrografolida pustaka menggunakan alat dengan daya resolusi yang tinggi (500 MHz). Perbedaan daya resolusi suatu alat berpengaruh terhadap pemisahan puncak-puncak resonansi, semakin tinggi daya resolusi alat maka pemisahan semakin baik.

#### 4. Identifikasi menggunakan spektrofotometer ultra violet

Spektrum ultra violet andrografolida isolat dan baku ditunjukkan oleh gambar 3.6 dengan nilai panjang gelombang maksimum sebagai berikut:

**Gambar 6**  
Spektra Androfolida Isolat dan Baku  
Dalam Air Diamati pada Panjang Gelombang  
200–300 nm, menggunakan Spektrofotometer  
UV-Cary 50 Conc





Dari spektra gambar : 6 diperoleh panjang gelombang maksimum yang sama antara andrografolida isolat dan baku yaitu pada 226 nm, sehingga dapat disimpulkan bahwa andrografolida isolat identik dengan andrografolida baku.

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisa di atas dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Ekstraksi dan isolasi satu kilogram herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) kering diperoleh andrografolida isolat sebanyak 4,3245 gram (0,43%).
2. Hasil identifikasi andrografolida isolat engan KLT, FTIR, RMI serta spektrofotometer UV diperoleh hasil yang identik dengan andrografolida baku (sigma).

### Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan dalam rangka pengembangan produk fitofarmaka yang mengandung andrografolida antau herba *Andrographis paniculata* Ness untuk mengurangi rasa pahit dan atau meningkatkan kelarutannya, sehingga dapat digunakan dalam pelayanan kesehatan.

### Daftar Pustaka

1. Chang HM, Bur PPH, (1965). *Pharmacology and Applicatins of Chinese Materia Medica*, Vol. 2, World Scientific, Hongkong, pp. 918-924.
2. Handa SS & Sharma A, (1990). Hepatoprotective Activity of Andrographolide from *Andrographis paniculata* Againts Carbon Tetrachloride. *Indian J. Med. Res* 928 : 276-283.
3. Handa SS & Sharma A, (1990). Hepatoprotective Activity of Andrographolide Againts Galactosamine and paracetamol Intoxication in Rats. *Indian J. Med. Res* 928: 284-292.
4. Kuroyanagi M, Sato M, Veno A, and Nishi K, (1987). Flavonoids from *Andrographis paniculata*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 35 (11) : 4429-4434.
5. Matsuda T, Kuroyanagi M, Sugiyama S, Umehara K, Ueno A, Nishi K, (1994). Cell Differentiation-Inducing Diterpens from *Andrographis paniculata* Ness, in: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Pharmaceutical Society of Japan* 42 (6): 1216-1225.
6. Puri A, Saxena R, Saxena RP, Saxena KC, Srivastava V, Tandon JS, (1993). Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata* . *Journal of Natural Product* 56 (7) : 995-999.
7. Rahman N, Futura T, Kojima S, (1999). Antimalaria Activity of extracts of Malaysian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 64 (3) : 149-254.
8. Sjamsuhidayat SS, dan Hutapea JR, (1991). *Inventarisasi Tanaman Obat Indonesia* Jilid I. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan . Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal. 54-55.
9. The Merck Index, (1989). *An Encyclopedia of Chemical Drugs and Biological*, ed. 8, Published by Merck & Co. Inc. Rahway, New York USA, p 85-86.
10. Visen PK, Shukla B, Patnaik GK, Dhawan BN, (1993). Andrographolide protects rat hepatocytes againts paracetamol-induced damage. *Journal Ethno-pharmacol* 40 (2) : 131-136.
11. Wijayakusuma HHM, Dalimartha S, Wiriam AS, dkk, (1993). *Tanaman Berkhasiat Obat Indonesia*, jilid II, hal. 117-119