

PERBANDINGAN KADAR ASIATIKOSIDA DALAM EKSTRAK ETANOL 70% PEGAGAN (*Centella asiatica* (L)Urban) DENGAN METODE EKSTRAKSI MASERASI DAN SONIKASI SECARA LC-MS/MS

Alifia Putri Febriyanti*, Siti Jazimah Iswarin**, Tristy Digjayanti**

* Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

** Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran Univeritas Brawijaya

ABSTRACT

Currently, among the many new types of modern medicine in the market there is a global tendency for going back to nature. In Indonesia, for generations plants that have medicinal properties have been used based on the ancestors experience. One of the plants oftenly used as a medicine is pennywort (*Centella asiatica* (L) Urban). One of the major component of pennywort is asiatikoside which has activity to accelerate wound healing. The objective of this study was to compare the extraction method that produce the highest levels of asiatikoside in 70% ethanol extract of pennywort. The extraction method were maceration and sonication in ethanol 70%. Qualitative analysis of asiatikoside was performed by thin layer chromatography (TLC) producing purplish stains after being soaked in anisaldehyd sulfuric acid solution and observed under UV lamp at 366 nm. The results showed at the Rf values 0.45 in maceration and 0.43 in sonication. Quantitative analysis for assay asiatikosida using LC-MS/MS. Before quantitative analysis, validation method needs to be done. Results of the validation are: the linearity have correlation coefficient (R²) of 0.9989, LOD and LOQ at 0.06 ppm and 0.19 ppm, accuracy value (% recovery) between 98.02%-107.49%, precision value (% Coefficient of Variation) between 0.32%-3.31%, and selectivity (Retention Time) between 3.44-3.49. Asiatikoside assay results in maceration extract at 7.19% and sonication at 7.43%. The results of the validation are eligible, so that asiatikoside level were obtained by LC-MS/MS declared accurate, specific, and precise.

Keywords: pennywort (*Centella asiatica* (L) Urban), asiaticoside, maceration-sonication, TLC, LC-MS/MS.

PENDAHULUAN

Belakangan ini di tengah banyaknya jenis obat modern yang baru di pasaran terdapat kecenderungan global untuk kembali ke alam (*back to nature*). Faktor yang mendorong masyarakat untuk mendayagunakan obat bahan alam antara lain mahalnya harga obat modern/sintetis dan banyaknya efek samping. Oleh karena itu obat bahan alam menjadi semakin populer dan penggunaannya meningkat tidak saja di negara yang sedang

berkembang seperti Indonesia, tetapi juga pada negara maju misalnya Jerman dan Amerika Serikat⁷. Salah satu tanaman yang memiliki khasiat sebagai obat adalah pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) (Hasyim, Puziah, et al. : 2011).

Pegagan merupakan salah satu tanaman ternak tahunan yang memiliki daerah penyebaran sangat luas terutama di daerah tropis dan sub tropis. Pegagan oleh masyarakat Indonesia sudah dimanfaatkan secara tradisional. Bagian

dari tanaman untuk tujuan pengobatan umumnya adalah seluruh bagian tanaman atau biasa disebut herba pegagan. Herba pegagan digunakan untuk mengobati sakit perut, batuk, batuk berdarah dan disentri penyembuh luka, radang, pegal linu, asma wasir, tuberkulosis, lepra, demam, dan penambah selera makan (BPOM. : 2010)

Kandungan kimia herba pegagan memiliki peran penting dalam aplikasi obat dan nutrasetikal karena komponennya biologis aktif glikosida triterpenoid. Pada glikosida triterpenoid, senyawa biologis aktif yang penting adalah asam asiatic, asam madecasic, asiaticosida, dan madecacosida (Jamil S.S, et al. : 2006).

Kandungan terbesar dari glikosida triterpen yaitu asiaticosida, asiaticosida termasuk derivat alfa kumarin dengan molekul gula, yang terdiri dari 1 rhamnosa dan 2 glukosa. Aglikon triterpenya disebut asam asiatic yang mempunyai gugus alkohol primer, dan sebuah karboksilat teresterifikasi dengan gugus gula. Asiaticosida bergugus polar karena ikatan glikosida antara molekul gula dan gugus benzene (Pramono S : 2004)

Asiaticosida memiliki peran sebagai *wound healing* dengan mensintesis kolagen yang dapat mengurangi *skin firmness*, elastisitas dan memperbaiki *skin appearance* dengan cara memicu fibroblast. Fibroblast berperan penting dengan membuat luka tertutup, fibroblast akan berproliferasi dan bermigrasi ke jaringan granulosit yang diikuti dengan

deposisi bertahap dari komponen spesifik matriks ekstrasel dan remodeling. Pada faktanya, fibroblast memicu neo-angiogenesis, mensekresikan komponen matriks ekstrasel (glikosaminoglikan, proteoglikan, glikoprotein, kolagen) dan memproduksi beberapa sitokin dan faktor pertumbuhan.

Metode ekstraksi yang dipilih untuk mendapatkan asiaticosida pada pegagan adalah maserasi dan sonikasi. karena senyawa asiaticosida yang memiliki ketahanan yang rendah terhadap panas. Penetapan kadar asiaticosida hasil ekstraksi menggunakan LC-MS/MS karena lebih spesifik dengan mengukur senyawa sesuai berat molekul, memiliki spesifitas dan sensitivitas yang tinggi (Alupului A., et. Al. : 2009).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kadar asiaticosida di dalam ekstrak etanol 70% pegagan, selain itu juga membandingkan jumlah kadar asiaticosida yang terbesar dengan menggunakan dua metode ekstraksi yang berbeda yaitu maserasi dan sonikasi. Metode ekstraksi dan kadar yang diperoleh dapat digunakan pada penelitian selanjutnya.

METODE PENELITIAN

1. Desain Penelitian. Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) yang dilakukan di laboratorium. Pegagan diekstraksi secara maserasi dan sonikasi. Maserasi

yang dilakukan disertai tiga kali remaserasi, dan masing-masing perendaman dilakukan 24 jam. Sedangkan sonikasi dilakukan pada suhu 40°C selama 15 menit, disertai tiga kali resonikasi. Pelarut yang digunakan yaitu etanol 70% teknis, kemudian ekstrak kental yang didapat dianalisis kuantitatif dengan LC-MS/MS untuk mengetahui kadar asiatikosida.

2. Sampel Penelitian.

Pada penelitian ini menggunakan sampel serbuk simplisia pegagan yang diperoleh dari UPT Materia Medica yang berada di Jalan Lahor Nomor 87, Kota Batu, Jawa Timur. Standar asiatikosida dari Sigma-Aldrich.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi pegagan dilakukan dengan metode maserasi dan sonikasi menggunakan pelarut etanol 70% teknis. Asiatikosida memiliki ketahanan yang rendah terhadap panas. Pemilihan ekstraksi maserasi merupakan metode yang tepat karena maserasi merupakan golongan ekstraksi dingin yang dalam prosesnya tidak menggunakan panas.

Pemilihan ekstraksi kedua yaitu sonikasi juga tepat, walaupun menggunakan proses pemanasan saat ekstraksi, panas yang digunakan rendah yaitu pada suhu 40°C sehingga kemungkinan senyawa asiatikosida untuk rusak bisa dihindari. Pada sonikasi juga digunakan gelombang ultrasonik, yang

akan menggetarkan serbuk simplisia saat proses ekstraksi yang membuat penetrasi pelarut lebih cepat masuk ke dalam sel simplisia pegagan.

Optimasi Maserasi dan Sonikasi

Sebelum dilakukan proses ekstraksi, dilakukan optimasi pada maserasi dan sonikasi. Optimasi dilakukan untuk memaksimalkan proses ekstraksi sehingga mendapatkan hasil ekstrak yang maksimal. Optimasi dilakukan menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) untuk mengetahui ada/tidaknya senyawa glikosida triterpen (asiatikosida) di dalam ekstrak etanol 70% pegagan yang dibandingkan dengan standar. Optimasi pada maserasi dilakukan proses maserasi satu kali dan tiga kali resonikasi, dengan masing-masing proses perendaman selama 24 jam. Serbuk simplisia yang digunakan sebanyak 100 g dan pelarut etanol 70% sebanyak 500 mL. Setelah didapatkan ekstrak kental,

Optimasi pada sonikasi dilakukan untuk memilih waktu ekstraksi sonikasi terbaik antara 5, 10, dan 15 menit. Serbuk simplisia pegagan yang digunakan sebanyak 10 g dengan pelarut etanol 70% sebanyak 50 mL dengan waktu ekstraksi selama 5 menit. Pada waktu ekstraksi 10 dan 15 menit, dilakukan proses ekstraksi yang sama sampai didapatkan ekstrak kental.

Pada proses KLT untuk optimasi maserasi dan sonikasi, prosedur analisis KLT diawali dengan pembuatan larutan standar asiatikosida 1mg/mL metanol dan

ekstrak pegagan masing-masing untuk maserasi dan sonikasi 10 mg/mL metanol, menggunakan eluen dengan perbandingan kloroform:metanol:asamasetat glasial (22:8:4). Pada penelitian ini pada senyawa asiatikosida pada ekstrak setelah dipanaskan, disemprot anisaldehyd asam sulfat menghasilkan warna ungu yang sejajarseperti pada Gambar 1., kemudiandiikuti noda senyawa asiatikosidadi bawah lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm berwarna ungu yang ditunjukkan Gambar 2. hasil yang didapat, pada Rf standar asiatikosida terletak pada 0.23. Rf optimasi maserasi terdapat pada 0.23 Rf optimasi sonikasi 5 menit Rf = 0.21, 10 menit Rf = 0.21, dan Rf 15 menit = 0.23.



Gambar 1. Optimasi Maserasi dan sonikasi (5, 10, dan 15) Secara Visual



Gambar 2. Optimasi Maserasi dan sonikasi (5, 10, dan 15) Pada Lampu UV 366 nm

Ekstraksi Maserasi

Setelah proses optimasi, dilanjutkan dengan proses ekstraksi. Pada maserasi digunakan serbuk simplisia herba pegagan 100 g yang dimasukkan ke dalam toples kaca dan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 500 mL, kemudian diaduk dengan *overhead stirrer* lalu ditutup dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, toples dibuka kemudian larutan ekstraksi disaring dengan kain flanel untuk memisahkan ampas dan filtrat. Ampas yang didapatkan dimasukkan kembali dan ditambahkan pelarut etanol 70% baru sebanyak 500 mL untuk proses remaseri. Proses remaserasi dilakukan sebanyak tiga kali dengan tahap yang sama saat maserasi.

Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan rotavapor pada suhu 40°C dengan kecepatan 70 rpm kemudian dioven pada suhu 40°C sampai mengental. Pada proses ini dihasilkan ekstrak kental dan kemudian dilakukan penimbangan pada neraca analitik. Ekstrak kental yang dihasilkan sebanyak 29.28 g dan diperoleh persentase rendemen 29.28%.

Ekstraksi Sonikasi

Pada sonikasi, digunakan waktu 15 menit karena sesuai dengan hasil optimasi yang menunjukkan nilai Rf asiatikosida sama dengan Rf sonikasi 15 menit yaitu 0.23. Proses ekstraksi sonikasi digunakan serbuk simplisia herba pegagan sebanyak 100 g yang dibagi dua sama banyak

masing-masing 50 g. Masing-masing direndam pelarut etanol 70% sebanyak 250 mL dalam erlenmeyer 500 mL, kemudian ditempatkan pada keranjang dalam bak sonikator yang telah berisi air. Suhu diatur pada 40 °C, dengan waktu ekstraksi 15 menit. Dilanjutkan dengan menyaring untuk memisahkan filtrat dan ampas, setelah tersaring filtrat dimasukkan ke beaker glass, sedangkan ampas digunakan untuk proses resonikasi. Proses resonikasi yang dilakukan sebanyak tiga kali dengan tahapan yang sama seperti sonikasi.

Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan rotavapor pada suhu 40°C dengan kecepatan 70 rpm kemudian dioven pada suhu 40°C sampai mengental. Pada proses ini dihasilkan ekstrak kental dan kemudian dilakukan penimbangan pada neraca analitik. Ekstrak kental yang dihasilkan sebanyak 35.63 g dan diperoleh persentase rendemen 35.63%.

KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Proses yang dilakukan sama dengan proses KLT pada optimasi maserasi dan sonikasi. Warna yang dihasilkan saat disemprot anisaldehyd asam sulfat dan saat dilihat di bawah lampu UV yaitu keunguan seperti pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Optimasi Maserasi dan Sonikasi (5, 10, dan 15) Secara Visual



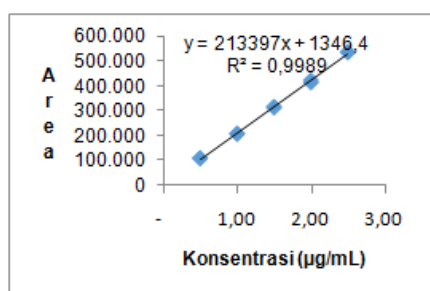
Gambar 4. Optimasi Maserasi dan Sonikasi (5, 10, dan 15) pada Lampu UV 366 nm

Nilai Rf yang dihasilkan yaitu standar asiatikosida 0.5, Rf maserasi = 0.45, dan Rf sonikasi = 0.43. Perbedaan nilai Rf bisa diakibatkan karena faktor teknis perlakuan saat KLT.

Penetapan kadar asiatikosida dengan LC-MS/MS diperlukan proses validasi metode terlebih dahulu untuk memastikan metode tersebut akurat, sehingga kadar yang dihasilkan konsisten dan dapat dipercaya (Gandjar : 2007). Parameter-parameter yang perlu divalidasi, antara lain: linieritas, batas deteksi (LOD)

dan batas kuantisasi (LOQ), selektivitas (USP 32.: 2009)

Analisis ini dilakukan pada seri larutan standar asiatikosida dengan konsentrasi 0.50 ppm, 1.00 ppm, 1.50 ppm, 2.00 ppm, 2.50 ppm dari analisis didapatkan persamaan regresi linier $y = 213397x + 1346,4$ dengan koefisien korelasi (R^2) = 0.9989. Syarat minimum untuk linieritas adalah 0.996, jadi data ini sudah linier²⁶. Kurva linieritas dari persamaan garis tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 6. Kurva Linieritas Asiatikosida

LOD dan LOQ

Penetapan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ). Batas deteksi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon bermakna dibanding dengan blangko. Batas kuantitasi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi persyaratan akurasi dan presisi. Nilai limit deteksi yang diperoleh dari kurva linier sebesar 0.06ppm dan limit kuantitasi sebesar 0.19 ppm.

Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan untuk mengukur senyawa yang diinginkan secara tepat dan seksama dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti pengotor dan produk degradasi. Selektivitas ditunjukkan dengan adanya daya pisah antara senyawa yang diinginkan dengan senyawa lain. Cara memperoleh selektivitas bisa dengan menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama.

Pada penelitian ini asiatikosida dapat terpisah dengan baik dari senyawa-senyawa lainnya dengan menggunakan detektor *mass spectrum* (MS) yang ditunjukkan dengan nilai waktu retensi (tR) 3.44, sehingga metode dapat mengukur senyawa marker yang diinginkan dengan tepat dan seksama.

Akurasi

Analisis akurasi dilakukan untuk mengetahui kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Nilai akurasi dihitung dari nilai perolehan kembali (% recovery) dengan cara konsentrasi terhitung dibagi dengan konsentrasi larutan baku standar dan dikalikan dengan 100%. Analisis akurasi dilakukan pada lima konsentrasi dengan pengulangan tiga kali pada masing-masing konsentrasi. Hal ini dilakukan untuk membuktikan apakah detektor dapat mengukur analit dengan baik antara nilai terukur dengan nilai sebenarnya pada

konsentrasi yang berbeda beda. Penambahan larutan baku 0.5 ppm rata-rata %R = 107.49%, penambahan larutan baku 1.00 ppm rata-rata %R = 98.69%, penambahan larutan baku 1.50 ppm rata-rata %R = 98.02%, penambahan larutan baku 2.00 ppm rata-rata %R = 98.18% dan penambahan larutan baku 2.50 ppm rata-rata %R = 102.59%. Persyaratan prosentase perolehan kembali konsentrasi 1.00 ppm–2.50 ppm adalah 80%–110%, sehingga hasil untuk analisis akurasi telah memenuhi persyaratan analisis.

Presisi

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil analisis individual. Pengukuran analisis ini melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata konsentrasi yang prosedurnya diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi atau keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi)⁸. Rata-rata konsentrasi 0.50 ppm sebesar 3.31, rata-rata konsentrasi 1.00 ppm sebesar 0.32, rata-rata konsentrasi 1.50 ppm sebesar 2.29, rata-rata konsentrasi 2.00 ppm sebesar 1.49, dan rata-rata konsentrasi 2.50 ppm sebesar 2.58. Kriteria presisi diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi antara $\leq 11\%$. Sehingga hasil ini menunjukkan bahwa analisis presisi sudah memenuhi

persyaratan analisis (Gonzalez, A.G.:2007).

Penetapan Kadar Asiatikosida

Setelah melakukan validasi metode penetapan kadar asiatikosida dan persyaratan setiap parameter terpenuhi, maka dapat menentukan kadar asiatikosida. Penentuan kadar asiatikosida dilakukan dengan penganalisan sampel ekstrak yang diulangi sebanyak tiga kali, kemudian dihitung rata-rata kadar yang diperoleh. Kadar asiatikosida ekstrak etanol 70% pegagan pada ekstraksi maserasi sebesar 7.19% dan pada sonikasi 7.43%.

Uji Statistik

Uji statistik yang digunakan yaitu uji-t independen. Uji-t independen digunakan untuk menguji sampel yang saling tidak berkaitan atau independen, yaitu kadar asiatikosida pada maserasi dan sonikasi. Kadar maserasi sonikasi kemudian akan dibandingkan, apakah berbeda bermakna atau berbeda tidak bermakna (sama). Syarat penggunaan uji-t yaitu data harus berdistribusi normal dan homogen. Dari perhitungan nilai normal didapatkan, sampel yang diteliti kurang dari 50, maka digunakan adalah nilai signifikansi *Shapiro Wilk*. Nilai signifikansi maserasi didapatkan $1.000 > 0.05$ dan nilai signifikansi sonikasi $0.637 > 0.05$. Kedua data berdistribusi normal, Kemudian dilakukan uji homogenitas dengan tes F (Tes Levenes), didapatkan P value 0.148.

Uji homogenitas diterima karena P value > 0,05.

Setelah syarat uji-t terpenuhi, dilanjutkan dengan uji-t independen. dilihat pada kolom sig. (2-tailed) didapatkan nilai 0.000 dan 0.003. Dapat diambil kesimpulan bahwa kedua nilai < 0.05, terdapat perbedaan secara bermakna kadar asiatikosida ekstrak etanol 70% herba pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) pada metode ekstraksi maserasi dan sonikasi.

KESIMPULAN

Metode validasi yang dihasilkan, antara lain: persamaan linieritas $Y = 213397x + 1346,4$ dengan $R^2 = 0.9989$, nilai LOD 0.06 ppm dan LOQ 0.19 ppm, selektivitas (tR) 3.44, akurasi (% recovery) 98.02%–107.49%, presisi (% KV) 0.32-3.31%.

Ekstrak etanol 70% herba pegagan mengandung senyawa asiatikosida, pada metode ekstraksi maserasi dengan kadar sebesar 7.19% dan sonikasi sebesar 7.43% dengan metode LC–MS/MS. Hasil kadar pada metode ekstraksi maserasi dan sonikasi menunjukkan adanya perbedaan secara bermakna kadar asiatikosida ekstrak etanol 70% herba pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban).

KEPUSTAKAAN

Alupului A., et. Al. 2009. *Ultrasonics vs Microwave Extraction Intensification of Active Principles from Medicinal Plants*. AIDIC Conference Series 09, 1-8 DOI: 103303/ ACOS0909001).

BPOM. 2010. *Pegagan Centella asiatica (L) Urban*. Serial Data Ilmiah Terkini Tumbuhan Obat. Badan Pengawas obat dan Makanan, Jakarta, hal. 2-10.

Gandjar I. dan Rohman A.. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.

Gonzalez, A.G. and Herrador, M. A. 2007. *A Practical Guide to Analytical Method Validation, Including Measurement Uncertainty and Accuracy Profile*. *Trend in Analytical Chemistry* 26: 227-228.

Hasyim, Puziah, et al. 2011. *Triterpene Composition and Bioactivities of Centella asiatica*. *Molecules*; 16:1311-1319.

Jamil S.S, et al. 2006. *Centella Asiatica (Linn.) Urban A Review*. *Natural Product Radiant*: 158-165.

Pramono S dan Ajiastuti D. 2004. *Standardisasi Ekstrak Herba Pegagan (Centella asiatica (L.) Urban) berdasarkan Kadar Asiatikosida secara KLT-Densitometri*. *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol. 15 (3): 118-123.

USP 32. 2009. *United States Pharmacopeia and The National Formulary*. Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention