

**OPTIMASI EKSTRAKSI DAUN PEGAGAN(*Centella asiatica*
L.) DENGAN METODE MASERASI DINAMIK UNTUK
MENDAPATKAN KADAR ASIATICOSIDA TERTINGGI**

OPTIMIZATION OF EXTRACTION PEGAGAN LEAVES
(*Centella asiatica* L.) WITH DYNAMIC MACERATION
METHOD TO OBTAIN THE HIGHEST LEVEL OF
ASIATICOSIDE

SUJUD ZAINUR ROSYID



**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2023

**OPTIMASI EKSTRAKSI DAUN PEGAGAN(*Centella asiatica*
L.) DENGAN METODE MASERASI DINAMIK UNTUK
MENDAPATKAN KADAR ASIATICOSIDA TERTINGGI**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Magister Ilmu Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

SUJUD ZAINUR ROSYID

N012201014

Kepada

SEKOLAH PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

LEMBAR PENGESAHAN

**OPTIMASI EKSTRAKSI DAUN PEGAGAN(*Centella asiatica*
L.) DENGAN METODE MASERASI DINAMIK UNTUK
MENDAPATKAN KADAR ASIATICOSIDA TERTINGGI**

Disusun dan diajukan oleh
SUJUD ZAINUR ROSYID
N012201014

telah dipertahankan di hadapan panitia ujian yang dibentuk dalam rangka penyelesaian program studi magister farmasi sains fakultas farmasi Universitas Hasanuddin

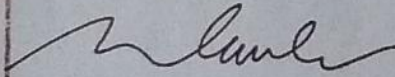
pada tanggal 24 Februari 2023

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

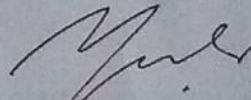
Menyetujui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

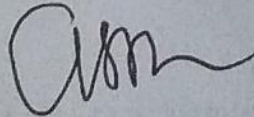


Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
NIP. 196412311990021 005



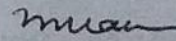
Yulia Yusrini Djabir, MBM.Sc., M.Si., Ph.D., Apt.
NIP. 197807282002122 003

Ketua Program Studi Magister
Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi,

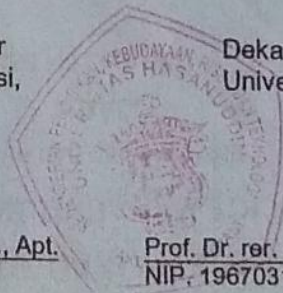


Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt.
NIP. 19800101 20031 2 1004

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin,



Prof. Dr. rer. nat. Marianti A Manggau, Apt.
NIP. 19670319 199203 2 002



PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Sujud Zainur Rosyid
NIM : N012201014
Program studi : Farmasi
Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

"Optimasi Ekstraksi Daun Pegagan(Centella Asiatica L.) Dengan Metode Maserasi Dinamik Untuk Mendapatkan Kadar Asiaticosida Tertinggi"

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pemikiran orang lain bahwa tesis yang saya tulis ini benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 2 Februari 2023

Yang Menyatakan


Sujud Zainur Rosyid

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, segala puji hanya milik Allah *swt*, yang telah memberikan limpahan nikmat disetiap harinya, mulai dari nikmat kesehatan dan waktu luang, hingga rasa iman dan motivasi yang masih membasahi hati penulis sehingga penelitian dan skripsi ini dapat terselesaikan. Shalawat dan salam kepada baginda Rasulullah *saw*, keluarga, sahabat dan para pengikutnya yang senantiasa istiqomah menjalankan syariat islam dan sunnahnya hingga akhir zaman.

Tesis dengan judul "*Optimasi Ekstraksi Daun Pegagan(Centella Asiatica L.) Dengan Metode Maserasi Dinamik Untuk Mendapatkan Kadar Asiaticosida Tertinggi*" ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister farmasi di fakultas farmasi Universitas Hasanudin, Makassar. Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini banyak kendala dalam tahap pencapaiannya, namun berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada

1. Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. selaku pembimbing utama dan Ibu Yulia Yusrini Djabir, MBM.Sc., M.Si., Ph.D., Apt.. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktunya untuk

memberikan bimbingan, arahan serta saran selama berjalannya penelitian dan penyelesaian tesis ini.

2. Ibu Prof. Dr. rer. nat. Marianti A Manggau, Apt. , Ibu Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt., dan Bapak Abdul Rahim, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. selaku tim komisi penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang sangat membangun dalam penyusunan tesis dan penelitian ini.
3. Dekan, wakil dekan I, wakil dekan II dan wakil dekan III yang telah memfasilitasi dan memberikan nasehatnya selama ini.
4. Seluruh Bapak/Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmunya selama masa studi S2.
5. Seluruh Bapak/Ibu dosen Fakultas Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar (STIFA) yang telah memberikan ilmunya selama masa studi S2.
6. Seluruh kepala Laboratorium dan laboran di fakultas farmasi Universitas Hasanuddin yang telah membantu dan memfasilitasi penulis selama penelitian.
7. Seluruh kepala Laboratorium dan laboran di fakultas farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar (STIFA) yang telah membantu dan memfasilitasi penulis selama penelitian.
8. Murobbi kami yang memberikan motivasi iman, saran, dan nasihat, semoga Allah Azza Wa Jalla menyatukan kita di suga-Nya kelak.

9. Mertua tercinta Ibu Dra. Aisyah Fatmawati M.Si., Bapak Drs. Sahibuddin A. Gani., dan istri tercinta dr. Aristianti Sp. BS., yang telah memberikan dukungan penuh selama masa studi.
10. Teman-teman magister farmasi Universitas Hasanuddin yang memberikan saran, candaan, diskusi, dan kebersamaannya selama pengerjaan penelitian.
11. Semua pihak lain yang telah membantu selama proses penyelesaian skripsi yang tidak penulis sebutkan satu persatu

Akhirnya, semua ini tiada artinya tanpa dukungan dari orang tua tercinta dan saudara-saudara penulis yang telah memberikan dukungan moril maupun materil dalam menyelesaikan tesis ini. Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, *aamiin*.

Makassar, 24 Desember 2022

Sujud Zainur Rosyid

ABSTRAK

SUJUD ZAINUR ROSYID. *Optimasi Ekstraksi Daun Pegagan(Centella Asiatica L.) Dengan Metode Maserasi Dinamik Untuk Mendapatkan Kadar Asiaticosida Tertinggi.* (dibimbing oleh Gemini Alam dan Yulia Yusrini Djabir)

Pegagan (*Centella asiatica*) adalah tumbuhan obat yang sangat populer di Sri Lanka, Madagaskar, India dan bagian lain di Asia seperti Indonesia. Tanaman ini digunakan untuk meningkatkan daya memori, pengobatan kelelahan mental, kecemasan, mengobati luka epidermis, eksim, kusta, asma, psoriasis, bisul dan penyakit gangguan sirkulasi darah. Tanaman ini banyak mengandung senyawa triterpen seperti asiaticosid. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode analisis senyawa asiaticosid menggunakan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) dan optimasi ekstraksi daun pegagan dengan menggunakan response surface methodology (RSM). Penelitian ini bersifat eksperimental meliputi validasi metode analisis senyawa asiaticosid dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 75 ppm. Menggunakan fase gerak isokratik asetonitril : asam fosfor 0.01% (70:30 v/v) dan pada panjang gelombang 254 nm. Hasil penelitian menunjukkan validasi metode analisis diperoleh linearitas antara 0.996-0.997, koefisien variasi 0.122-0.863, % recovery rata – rata 103.29%, %RSD 1.458%, LoD 4.714 ppm dan LoQ = 15.713 ppm, dengan kurva kalibrasi ($y = 348.36x + 16433$; $R^2=0.997$). Kemudian melakukan optimasi ekstraksi daun pegagan dengan membagi ekstraksi kedalam 9 kondisi (terkait waktu dan suhu), dilanjutkan penilaian kadar asiaticosida yang paling tinggi. Hasil validasi bersifat valid dan optimasi paling optimal yaitu pada variasi suhu 60 ° C dan waktu 135,7 menit, signifikan dengan $\alpha = 0.05$.

Kata kunci : Validasi, Triterpen, Asiaticosid, KCKT, response surface methodology (RSM).

ABSTRACT

SUJUD ZAINUR ROSYID. *Optimization Of Pegagan (Centella Asiatica L.) Leaves Extraction Using The Dynamic Maceration Method To Obtain The Highest Asiaticoside Content.* (supervised by Gemini Alam dan Yulia Yusrini Djabir)

Pegagan (*Centella asiatica*) is a well-known medicinal plant in Sri Lanka, Madagascar, India, and other parts of Asia, such as Indonesia. This plant was reported to improve memory, treats mental fatigue and anxiety, and treats epidermal wounds, eczema, leprosy, asthma, psoriasis, boils, and circulatory disorders. This plant contains various types of triterpenenoid compounds, such as asiaticoside. This study aims to validate the analysis method for asiaticoside compounds using HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) and optimize the extraction of pegagan leaves using the response surface methodology (RSM). This experimental research includes validation of the analytical method for asiaticoside compounds with concentrations of 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, and 75 ppm. Used acetonitrile isocratic mobile phase: 0.01% phosphoric acid (70:30 v/v) and at a wavelength of 254 nm. The results showed that the validation of the analytical method obtained linearity between 0.996-0.997, coefficient of variation 0.122-0.863, % recovery on average 103.29%, %RSD 1.458%, LoD 4.714 ppm, and LoQ = 15.713 ppm, with a calibration curve ($y = 348.36 x + 16433$; $R^2=0.997$), then optimized pegagan leaf extract by dividing it into 9 conditions (related to time and temperature), then assessed the highest asiaticoside content. The validation results are valid, and the optimal parameters is at a temperature variation of 60 ° C and a time of 135,7 minutes, significant with $\alpha = 0.05$.

Keywords: Validation, Triterpenes, Asiaticoside, HPLC, response surface methodology (RSM).

DAFTAR ISI

UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
ABSTRAK.....	xi
ABSTRACT.....	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I.....	1
PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	2
C. Tujuan Penulisan	3
D. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II.....	4
TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. Pegagan (<i>Centella asiatica</i> L.)	4
a. Morfologi Tanaman.....	5
b. Sistematika Tumbuhan.....	6
c. Kandungan dan Sifat Farmakologi <i>Centella asiatica</i> L.	6
d. Standardisasi Simplisia <i>Centella asiatica</i> L.....	7
e. Penggunaan Tradisional dan Aktivitas Farmakologinya.....	8
f. Penggunaan Klinis <i>Centella asiatica</i> L.....	10
B. Metode Ekstraksi.....	11
C. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	12
a. Komponen High Performance Liquid Chromatografi (HPLC)	13
b. Parameter Validasi Metode Analisis.....	15
BAB III.....	18
METODE PENELITIAN.....	18
A. Jenis Penelitian.....	18

B.	Waktu dan Tempat Penelitian	18
C.	Alat dan Bahan	18
a.	Alat	18
b.	Bahan	18
D.	Cara Kerja	19
a.	Penyiapan Sampel	19
b.	Ekstraksi Metode Maserasi Dinamik Dengan Variasi Waktu dan Suhu	19
c.	Validasi Metode HPLC	20
d.	Linieritas	20
e.	Detection Limit (DL) dan Quantitation Limit (QL)	21
f.	Akurasi	21
g.	Presisi	21
h.	Analisis Sampel Dengan Instrumen HPLC	21
i.	Penentuan Kurva Kalibrasi Standar Asiaticoside	22
j.	Analisis Data Nilai Asiaticosida Hasil HPLC Menggunakan Minitab®	22
BAB IV	23
HASIL DAN PEMBAHASAN	23
A.	Validasi Metode	23
B.	Spesifisitas	23
C.	Linieritas	24
D.	Presisi	26
E.	Akurasi	27
F.	Limit of Detection dan (LOD) Limit of Quantitation (LOQ)	28
G.	Penentuan Kurva Kalibrasi	28
H.	Perhitungan Konsentrasi Asiaticosida Ekstrak Dari Beberapa Variasi Ekstraksi	29
BAB V	36
PENUTUP	36
A.	Kesimpulan	36
B.	Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Penggunaan secara tradisional <i>Centella asiatica</i> di beberapa Negara	9
2. Penggunaan Klinis <i>Centella asiatica</i>	10
3. Variabel waktu dan suhu ekstraksi daun pegagan Rancangan Formula Sistem DMN	20
4. Luas area baku asiaticosida tiap konsentrasi masing-masing 3 kali repetisi menggunakan HPLC	26
5. Hasil perhitungan standar deviasi (SD) , koefisien variasi (KV) dan %RSD	
6. Persen Rendemen dari beberapa variasi ekstraksi suhu dan waktu	29
7. Konsentrasi Asiaticosida dari beberapa variasi ekstraksi suhu dan waktu	30

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Gambar dari <i>Centella asiatica</i>	5
2. Gambar rumus struktur asiaticosida	6
3. Linieritas dan koefisien korelasi (R^2) dari masing – masing seri konsentrasi (5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm dan 75 ppm)	25
4. Kurva kalibrasi baku asiaticosida konsentrasi 5, 10,25,50 dan 75 ppm yang dihitung dengan instrumen HPLC	28
5. Uji normalitas dan distribusi data. Garis merah merupakan garis normal probability	31
6. Uji Statistik Two Way Anova	32
7. Nilai optimasi kadar asiaticosid menggunakan RSM (Response Surface Method)	33
8. Contour plot kadar asiaticosid berdasarkan waktu dan suhu RSM (Response Surface Method)	34
9. Surface plot kadar asiaticosida berdasarkan waktu dan suhu RSM (Response Surface Method)	34

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Skema Kerja Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pegagan (<i>Centella asiatica</i> L.) Skema Kerja	41
2. Skema Kerja Penentuan Kurva Baku Standar Asiaticoside	42
3. Kromatogram Seri Konsentrasi Baku asiaticoside	43
4. Hasil Perhitungan Kromatogram Ekstrak Masing-Masing Variasi Ekstraksi	58
5. Berat Ekstrak Variasi Maserasi	85
6. Hasil Determinasi Tanaman	87
7. Cara Perhitungan Kadar Asiaticosida (ppm) dari AUC	89

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Daun pegagan (*Centella asiatica* L.) merupakan tanaman obat yang sudah digunakan sejak zaman prasejarah (Singh *et al.*, 2014). Di Indonesia telah ditetapkan sebagai tanaman obat sejak 1884 (Winarto, W.R., Surbakti, 2003). Secara empiris telah banyak digunakan sebagai salah satu tanaman untuk bahan obat tradisional dalam kehidupan masyarakat di Indonesia (Kriswiyanti *et al.*, 2011) seperti digunakan sebagai peluruh air seni, obat sariawan, penurun panas, dan penambah nafsu makan (Khusnawati *et al.*, 2016). Efek klinis dari senyawa aktif pegagan telah digunakan sebagai terapi pada kelainan pembuluh darah kronis, dalam kosmetologi dimanfaatkan untuk penyembuhan luka, mengurangi skar (Pointel *et al.*, 1987; Bylka *et al.*, 2013), meningkatkan fungsi kognitif, menurunkan ansietas, antibakteri, antiviral, antikanker (Brinkhaus *et al.*, 2000).

Kandungan utama dari pegagan yang memiliki aktivitas terapeutik adalah triterpen yakni : asiaticosida, asiatic acid, madecasosida dan madecasic acid (Leng *et al.*, 2013). Asiaticosida merupakan saponin triterpen pentasiklik, yang memiliki rumus molekul $C_{48}H_{78}O_{19}$ dan berat molekul 959.1 g/mol (Anukunwithaya, *et al.*, 2017).

Penetapan kadar asiaticosida pada daun pegagan dilakukan dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC), metode ini dipilih karena

memiliki sensitivitas yang tinggi. Metode ekstraksi merupakan tahapan yang penting untuk mendapatkan kadar senyawa zat aktif yang tinggi. Berdasarkan penelitian sebelumnya telah didapatkan pengaruh suhu dan waktu maserasi, karena itu peneliti tertarik untuk melakukan penelitian lanjutan pengaruh waktu dan suhu terhadap terhadap kadar Asiaticosida.

Maserasi dinamik merupakan teknik ekstraksi difusi antara pelarut dan senyawa sesuai dengan polaritasnya (Ferri, 1996). Penambahan perlakuan dalam maserasi dinamik seperti pemanasan dapat mengoptimalkan ekstraksi, menurut Monton dkk. (2019) kadar dari asiaticosida, asiatic acid, madecasosida dan madecasic acid tertinggi pada maserasi dengan penambahan suhu 60 ° C dan waktu 120 menit.

Metode ekstraksi merupakan hal penting untuk mendapatkan senyawa aktif terkait aktivitasnya (Monton, *et al.*, 2019). Dalam penelitian ini, menggunakan maserasi dinamik dengan penambahan suhu dan waktu kemudian dibandingkan kadar asiticosida antar perlakuan.

Metode untuk menganalisa hasil optimasi salah satunya menggunakan Response Surface Methodology. Metode ini dipilih karena mampu mengoptimalkan suatu proses produksi dengan memasukkan beberapa variabel sehingga menjadi lebih sederhana, metode ini mampu memberikan hasil reproduktifitas hasil yang lebih baik dan proses optimalisasi dengan perspektif yang bagus (Assagaf, 2012)

B. Rumusan Masalah

1. Apakah metode pengukuran kadar asiaticosida pada ekstrak daun

pegagan menggunakan HPLC memiliki validitas yang baik?.

2. Apakah terdapat perbedaan kadar asiaticosida dengan perbedaan suhu dan waktu maserasi?.
3. Pada suhu dan waktu maserasi berapakah kadar asiaticosida tertinggi?.

C. Tujuan Penulisan

1. Untuk menentukan validitas metode pengukuran kadar asiaticosida ekstrak daun pegagan menggunakan HPLC.
2. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar asiaticosida dengan perbedaan suhu dan waktu maserasi.
3. Untuk mengetahui suhu dan waktu maserasi berapakah kadar asiaticosida tertinggi.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi apakah terdapat perbedaan kadar asiaticosida dan pada suhu dan waktu berapakah kadar asiaticosida tertinggi pada metode maserasi dinamik, sehingga dapat dijadikan sebagai sebagai salah satu metode dalam optimalisasi ekstraksi .

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Pegagan (*Centella asiatica* L.)

Tanaman pegagan memiliki penyebaran yang luas terutama pada daerah tropis dan subtropis, seperti Indonesia, Malaysia, Srilanka, Madagaskar dan Afrika. Tumbuh dengan baik pada ketinggian 100-2500 m diatas permukaan laut, baik di daerah terbuka maupun tempat terlindung, seperti sawah, tegalan, dan di bawah pepohonan (Ridley, 1967).

Pada beberapa daerah di Indonesia pegagan memiliki beberapa nama, di Sumatra disebut Kaki Kuda, di Jawa memiliki banyak nama antara lain Kaki kuda, Pegagan, Antanan gede, Gagan-gagan, Gang-gagan, Kerok batok, Panegowan, Rendeng, Calingan rarnbar, Kos tekosan. Di Sulawesi orang menyebutnya Pagaga, Tungke-tungke (Brinkhaus *et al.*, 2000).

Di beberapa negara tanaman ini memiliki beberapa nama antara lain Luei Gong Gen dan Tungchian di China, Indian Pennywort di Inggris, Hydrocotyle asiaticque di Prancis, Asiatischer Wassernabel di Jerman, Idrocotile di Italia, Tsubo-kusa di Jepang, Blasteostimulina (asiaticoside) di Spanyol (Brinkhaus *et al.*, 2000).

Sinonim dari pegagan antara lain *Hydrocotyle asiatica* L., *Hydrocotyle lunata* Lam., *Centella coriacea*, *Centella cordifolia*, *Centella dusenii*, *Centella floridana*, *Centella repanda*, *Centella triflora*, *Centella uniflora* (Brinkhaus *et al.*, 2000).

a. Morfologi Tanaman

Pegagan adalah tanaman merambat yang berbunga antara bulan Agustus dan September, bunganya berwarna ungu muda. Tanaman yang berwarna abu-abu hingga hijau kecoklatan memiliki bau yang menyerupai daun tembakau, dan rasanya agak pahit (Brinkhaus *et al.*, 2000).

Daunnya tipis dan lembut, dengan pertulangan yang menjari (palmate nervers), tidak berbulu atau hanya dengan sedikit rambut, dan ukurannya sekitar 2 sampai 5 cm. Tepi daun bergerigi (crenate) atau agak melengkung. Tangkai daunnya berukuran antara 5 sampai 15 cm, ramping. Umbel bertangkai pendek berjumlah 2 sampai 5 buah dari setiap umbel, tertutup di dalam pericarp terdiri dari 1 sampai 2 bracts yang berbentuk elips. Dua skizokarpus disatukan berdekatan. Permukaannya menunjukkan pola retikulat yang jelas (Auscgabe, 1985).



Gambar 1. Gambar dari *Centella asiatica* L., 1. Umble merupakan pemunculan dari beberapa tangkai, 2. Tepi daun berbentuk crenate (bergerigi), 3. Pola reticulat , 4. Skizokarpus.

b. Sistematika Tumbuhan

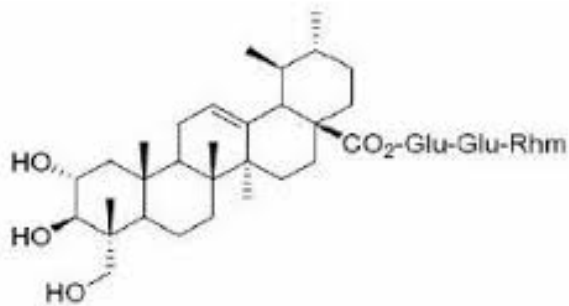
Kingdom	: Eukaryota
Subkingdom	: Embryophyta
Division	: Spermatophyta
Subdivision	: Angiospermae
Class	: Dicotyledoneae
Subclass	: Rosidae
Superorder	: Aralianae
Order	: Araliales (Umbelliflorae)
Family	: Apiaceae or Umbelliferae
Subfamily	: Hydrocotyle
Genus	: Centella
Species	: Centella asiatica (Brinkhaus <i>et al.</i> , 2000).

c. Kandungan dan Sifat Farmakologi *Centella asiatica* L.

Kandungan utama *Centella asiatica* L. yang memiliki efek farmakologi adalah triterpen terutama asiatikosida, asam asiatik, madekasosida dan asam madekasik (Pizzorno, J. Murray, M., 2012).

Madekasik merupakan saponin triterpen pentasiklik dengan rumus molekul $C_{48}H_{78}O_{20}$ dan berat molekul 975,1 g/mol . kadar maksimum 5-15 menit setelah pemberian oral dan didistribusikan luas , otak, hati, jantung, limpa, paru-paru, lambung , kulit, ginjal (Leng *et al.*, 2013).

Asiatikosida memiliki rumus molekul $C_{48}H_{78}O_{19}$ dengan berat molekul 959,1 g/mol, kadar maksimum dalam plasma setelah 5-15 menit pemberian peroral. Secara luas didistribusikan ke otak, lambung dan kulit setelah pemberian 1 jam per oral (Anukunwithaya *et al.*, 2017).



Gambar 2. Rumus Struktur Asiaticosida

Asam madekasik memiliki rumus molekul $C_{30}H_{48}O_6$ dengan berat molekul 504,7 g/mol, didistribusi di otak, jantung, hati, ginjal, usus besar dan buli-buli setelah pemberian peroral (Yuan *et al.*, 2015).

Asam asiatik memiliki rumus molekul $C_{30}H_{48}O_5$, tempat absorpsi utamanya pada jejunum (Yuan *et al.*, 2015), didistribusikan ke otak, jantung, hati, ginjal, usus besar, dan buli-buli (Yin *et al.*, 2012). Sulit larut dalam air, untuk distribusi berikatan dengan albumin dan memiliki bioavailabilitasnya sangat rendah (Lv *et al.*, 2018).

Zainol dkk. (2008) melakukan HPLC pada bagian-bagian tanaman, kandungan asiaticosida yang paling tinggi terdapat pada bagian daun, begitupun juga dengan senyawa madecassoside tertinggi terdapat pada daun, akan tetapi senyawa asiatic acid tertinggi terdapat pada akar.

d. Standardisasi Simplisia *Centella asiatica* L.

Menurut Farmakope herbal Indonesia Edisi I (2008) bahwa standar susut pengeringan $\leq 10\%$, kadar abu total tidak lebih 18,05% dan tidak ada cemaran mikroba, kadar abu tidak larut asam tidak boleh lebih dari 4,9%, batas maksimum susut pengeringan tidak lebih dari 11%, batas maksimal residu Pb tidak boleh melebihi 10 mg/kg ekstrak, residu As

tidak melebihi 5 µg/kg dan residu Hg tidak boleh lebih dari 1 mg/kg, kadar senyawa larut air ekstrak pegagan yaitu $\geq 28,3\%$, kadar senyawa senyawa yang larut dalam etanol ekstrak pegagan yaitu $\geq 2,1\%$, kadar asiaticosida tidak kurang dari 0,9%.

e. Penggunaan Tradisional dan Aktivitas Farmakologinya

Terdapat beberapa senyawa bioaktif dalam pegagan seperti asiaticosida yang banyak digunakan sebagai ramuan tradisional atau jamu, baik itu dalam campuran beberapa bahan atau sediaan tunggal (Brotosisworo, 1979). Daun pegagan dapat digunakan sebagai penambah nafsu makan, peluruh air seni, pembersih darah, obat disentri, lepra, sipilis, sakit perut, radang usus, batuk, sariawan, dan sebagai kompres luka. Getahnya dapat digunakan untuk mengobati borok, nyeri perut, dan cacingan. Ekstraknya digunakan untuk mengobati luka pada penderita lepra dan gangguan pembuluh darah vena. Di samping itu, semua bagian tumbuhan dapat digunakan sebagai obat batuk, masuk angin, mimisan, radang pada paru-paru, dan disentri (Sudarsono *et al.*, 2002).

Menurut Sutarjadi (1994) penggunaan pegagan secara tradisional meliputi pengobatan untuk penyakit infeksi (demam, sipilis, pertusis, bronkitis, gonorrhoe, lepra), beberapa kasus keracunan (manihot, *Parkia speciosa*), gangguan neurological, psikosomatik dan psikiatri (neurosis, epilepsi, insomnia), gangguan kulit, gangguan pencernaan (hemoroid), diabetes melitus, hipertensi, asma, infertilitas pada wanita, cuci darah.

Penggunaan pegagan secara tradisional juga telah dilakukan di

beberapa negara menurut review yang dilakukan oleh Brinkhaus dkk (2000), antara lain seperti yang ditunjukkan oleh tabel dibawah ini.

Tabel 1. Penggunaan secara tradisional *Centella asiatica* di beberapa Negara (Brinkhaus et al., 2000)

Kegunaan	Nama Negara	Peneliti
Bronkitis Diare	India Fiji India Philippines Thailand	Burkill (1966) Singh (1986) Saklani (1989) Velazco (1980) Anderson (1986)
Disentri	Bangladesh India	Alam (1992) Burkill (1966), Saklani (1989), Rao (1982), Pushpangadan (1984), Deka (1982), Boissya (1980)
Epilepsi	India Malaysia	Ramaswamy (1970) Burkill (1966)
Demam	Guam India Nepal Thailand	Haddock (1974) Shah (1971), Sahu(1984) Bhattarai (1989) Mokkhasmit (1971)
Gastritis	Nepal	Manandhar (1986)
Hepatitis	India taiwan	Pushpangadan(1984) Yanfg (1987), Lin (1990)
Inflammati ons	Guam India Thailand Tonga	Haddock (1974) Rastogi (1960) Panthong (1986) Singh (1984)
Lepra	China India Madagascar Nepal	Shishkin (1973) Singh (1980), Jain (1984), Sahu (1989), Ikram (1981), John (1984) Voigtlander (1984) Suwal (1970)
Leukoderm a	India	Ramaswamy (1970), Rastogi (1960)
Mental Disorders	India Fiji Nigeria	Chopra (1949), Tiwari (1979), Rastogi (1960) Singh (1986) Adesina (1982)
Tonus Saraf	India Nepal	Ramaswamy (1970), Rastogi (1960), John (1984), Singh (1980), Shah (1971), Sebastian (1984),

	Nigeria Thailand	Sahu (1989), Ikram (1981) Suwal (1970) Adesina (1982) Wasuwat (1967), Mokkhasmit (1971ab)
Nyeri	Nigeria Papua New Guinea	Adesina (1982) Holdsworth (1983)
Penyakit kulit	India	Jain (1984), Sebastian (1984)
Sipilis	India Nepal	Chopra (1949), Ikram (1981) Suwal (1970)
Tonus otot	Bangladesh China India Malaysia Nepal Thailand	Alam (1992) Shishkin (1973) Chopra (1949), Sebastian (1984), Ikram (1981) Burkill (1966) Suwal (1970) Anderson (1986), Mokkhasmit (1971)
Luka	Fiji India Madagascar Malaysia Papua New Guinea	Singh (1986) Holdsworth (1983), Jain (1984) Voigtlander (1984) Burkill (1966) Holdsworth (1983)

f. Penggunaan Klinis *Centella asiatica* L.

Penggunaan klinis dari *Centella asiatica* L. telah dilakukan sejak abad ke 19, dan ini telah dirangkum oleh Brinkhaus dkk. penggunaan antara lain untuk insufisiensi vena, stretch mark (striae), selulitis, lesi kulit yang sukar sembuh dan lesi akibat lepra.

Tabel 2. Penggunaan Klinis *Centella asiatica* (Brinkhaus *et al.*, 2000)

Peneliti	Indikasi	Jumlah pasien	Medikasi	Lama pengobatan
Montecchio et al. 1991	Postphlebotic syndrome	30	CATTF Centellase oral 3*30 mg/d	3 minggu
Monteverde et al. 1987	Venous insufficiency	40	ETCA 30 mg/d or O{b-	30 hari

	of the legs		hydroxy ethyl)-rutoside 500 mg/d	
Arpaia et al. 1990	Varicose veins	20	Centella asiatica extract 2*30mg/d	3 bulan
Pointel et al. 198	Venous insufficiency of the leg	94	TECA 2*30 mg/d or 2*60mg/d	2 bulan
Belcaro et al. 1990 a	Venous hypertension	62	TTFCA 30 mg/d or 60 mg/d	4 bulan
Belcaro et al. 1990 b	Venous hypertension	44	TTFCA 60 mg/d	10 minggu
Mallo! et al. 1991	Striae gravidarum	80	Trofolastin (Creme)	Selama kehamilan

TTFCA (total triterpenic fraction of *Centella asiatica*), ET-CA (extract of *Centella asiatica*), TECA ((titrated extract of *Centella asiatica*).

Terdapat beberapa merek obat yang terbuat dari ekstrak *Centella asiatica* L. dan digunakan secara klinis antara lain Trofolastin® sebagai profilaksis terhadap terjadinya striae gravidarum yang diberikan selama 12 minggu (Malolol *et al.*, 1991), Madecazol® untuk terapi selulitis dan lesi ulceratif (Wolfram, 1965).

B. Metode Ekstraksi

Proses ekstraksi merupakan hal penting dalam upaya meningkatkan konsentrasi senyawa aktif yang kita inginkan, metode ekstraksi yang memiliki ketahanan dan keterulangan tergantung dari material tanamannya (Smith, R.M., 2003). Kondisi dan metode ekstraksi yang berbeda akan menghasilkan kadar senyawa spesifik yang berbeda (Azmir *et al.*, 2013). Dalam penelitian ini menggunakan teknik ekstraksi yaitu maserasi dinamik (List P.,H., Schmidt P.,C., 1989), maserasi dengan penambahan perlakuan yaitu variasi pemanasan dan variasi lamanya waktu maserasi.

Maserasi dinamis adalah teknik di mana ekstraksi terjadi secara difusi, dimana pelarut organik digunakan sesuai dengan polaritasnya untuk mengekstraksi senyawa yang diinginkan. Maserasi dinamis, memiliki keuntungan dari pengadukan yang stabil, menghasilkan peningkatan kontak bahan tanaman dengan pelarut dan dengan demikian waktu proses yang lebih singkat (Tacon, L. A., Freitas, L. A. P., 2013).

C. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC merupakan kromatografi kolom dengan pompa sampel tekanan (analit) yang dilarutkan dalam pelarut (fase gerak) melalui kolom (fase diam). Sifat sampel dan pelarut, serta sifat fase diam, menentukan waktu retensi analit melewati kolom. Saat sampel melewati kolom, analit yang memiliki interaksi terkuat dengan fase diam keluar dari kolom paling lambat, yang menunjukkan waktu retensi terpanjang. Sebaliknya, sampel yang menunjukkan sedikit interaksi dengan bahan kolom terelusi dengan cepat dan dengan demikian waktu retensi yang singkat. Pemisahan senyawa dalam sampel dapat dilakukan melalui elusi isokratik, di mana komposisi fase gerak tetap konstan, atau melalui elusi gradien, di mana komposisi fase gerak berubah selama pemisahan menuju kondisi yang mendukung disosiasi analit dari fase diam. Setelah keluar dari kolom, fase gerak melewati modul deteksi, seperti fluorometer atau detektor serapan UV. Pemilihan detektor yang tepat dan panjang gelombang pemantauan sangat penting untuk mengoptimalkan sensitivitas deteksi HPLC. Detektor menghasilkan sinyal yang berhubungan dengan jumlah analit yang muncul dari kolom, yang kemudian ditransfer ke dan direkam oleh program komputer kontrol HPLC (Olga E., P., Karin S., 2017).

a. Komponen High Performance Liquid Chromatografi (HPLC)

Komponen-komponen utama pada HPLC yakni wadah fase gerak, pompa untuk mengalirkan fase gerak, injektor (alat untuk memasukan sampel), kolom, detektor dan pengolah data.

1. Wadah fase gerak

Wadah fase gerak merupakan wadah untuk menampung fase gerak yang akan digunakan selama proses analisis dengan HPLC (Gandjar *et al.*, 2017). Wadah fase gerak harus bersih dan inert. Wadah fase gerak biasanya dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter (Rohman A., 2009).

2. Pompa

Pompa yang cocok digunakan pada HPLC yakni pompa yang memenuhi syarat sebagaimana syarat wadah pelarut yaitu: pompa harus 11 inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Untuk tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/menit (Dachriyanur M., 2014)

Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fase gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan dan bebas dari gangguan. Ada 2 jenis pompa pada HPLC yakni pompa dengan tekanan konstan dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan.

Tipe pompa dengan aliran fase gerak yang konstan sejauh ini lebih umum dibandingkan dengan tipe pompa dengan tekanan konstan (Rohman, 2009).

3. Injektor

Injeksi sampel untuk dianalisis dengan metode HPLC merupakan tahap yang penting, karena meskipun kolom telah memadai hasil kromatogram yang ditampilkan tidak akan memadai kalau injeksi sampel tidak dilakukan dengan tepat. Keadaan ini akan menjadi suatu keharusan jika yang dituju adalah analisis kuantitatif dengan HPLC (Dachriyanur, 2014).

4. Kolom

Kolom pada HPLC merupakan bagian yang sangat penting, sebab pemisahan komponen-komponen sampel akan terjadi di dalam kolom. 12 Kolom HPLC dibuat dalam bentuk lurus yang dimaksudkan untuk efisiensi kolom, sehingga didapatkan harga H minimal (Dachriyanur, 2014). Ada 2 jenis kolom pada HPLC yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor (Gandjar *et al.*, 2017).

5. Detektor

Detektor pada HPLC dapat dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu detektor universal yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometer massa. Dan detektor yang spesifik yang hanya mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi dan elektrokimia (Gandjar *et al.*, 2017). Suatu detektor dibutuhkan pada HPLC untuk mendeteksi adanya

komponen analit yang berhasil dielusi dari kolom dan menentukan kadarnya (Dachriyanur, 2014).

6. Pengolah data

Alat pengumpul data seperti komputer, integrator atau recorder dihubungkan dengan detektor. Alat ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu memplotkannya sebagai suatu kromatogram yang selanjutnya dapat dievaluasi oleh seorang analis (Gandjar *et al.*, 2017).

b. Parameter Validasi Metode Analisis

Validasi merupakan konfirmasi bahwa metode analisis yang akan digunakan sesuai dengan tujuan yang diinginkan. Suatu metode harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi persoalan analisis. Tujuan utama dari validasi metode ini adalah untuk mendapatkan hasil analisis yang baik (Dachriyanur, 2014). Validasi yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan ICH , yaitu linearitas, LOD dan LOQ, spesifisitas, presisi, akurasi.

Parameter yang dievaluasi untuk melakukan validasi metode analisis adalah sebagai berikut :

1. Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif (relative standard deviation). Nilai RSD juga disebut dengan koefisien variasi atau KV dari sejumlah pengukuran sampel (Rohman, 2019), sebagaimana dengan rumus berikut:

$$RSD = \frac{100 \times SD}{\bar{y}} \quad SD = \sqrt{\frac{\sum(X-\bar{y})^2}{(N-1)}}$$

RSD = Standar Deviasi Relative

SD = Standar Deviasi

\bar{y} = rata-rata dari pengukuran

X = nilai dari masing-masing pengukuran

Syarat hasil uji presisi yang dapat diterima yaitu %RSD \leq 2%

2. Akurasi

Akurasi merupakan kedekatan antara nilai terukur dengan nilai sebenarnya yang diterima, baik nilai konversi, nilai sebenarnya maupun nilai rujukan (Rohman, 2019). Kriteria keberterimaan pada uji akurasi antara 98%-102%.

3. Batas deteksi dan Batas kuantifikasi

Batas deteksi (limit of detection) didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Sedangkan batas kuantifikasi (limit of quantification) didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan (Rohman, 2019). LOD dan LOQ dapat dianalisis melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi, dengan rumus, (Monton et al., 2018) : $LOD = 3,3 \times SD/Slop$, $LOQ = 10 \times SD/Slop$.

4. Spesifisitas

Spesifitas merupakan kemampuan suatu metode analisis untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks. Untuk tujuan uji kemurnian dan penetapan kadar, spesifitas ditunjukkan oleh daya pisah dua senyawa yang berdekatan (sebagaimana dalam kromatografi). Semua senyawa yang dipisahkan dari puncak analit harus mempunyai resolusi (R_s) ≥ 2 (Rohman, 2019).

5. Linieritas

Linearitas merupakan kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linearitas diperoleh berdasarkan persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi (Harmita H., 2004).