

PENGARUH WAKTU PERENDAMAN SEBELUM SONIKASI TERHADAP KADAR ASIATIKOSIDA PADA EKSTRAK DAUN PEGAGAN AIR (*HYDROCOTYLE VULGARIS* L.) SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

ARMON FERNANDO¹, FADHILATUN KHOIRIYAH²

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru,^{1,2}
armonfernando@stifar-riau.ac.id¹

Abstract: Pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) is one of the plants used as medicine, one of the contents of pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) is asiaticosida. Asiaticosides are known having antioxidant and neuroprotective activities. This research aims at finding out the effect of immersion time before sonication of pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) toward the leaf extract on asiaticoside levels. Extractions parameters used are immersion time and sonication time. The asiaticoside level was analyzed using high performance liquid chromatography by column C-18, the mobile phase of methanol : water (70:30), flow rate of 1 ml/min and detected at wavelength 206 nm. Calibration curves were made by using a series of concentrations of 2-14 ppm with a regression equation $y = 11656x + 142673$. Optimum asiaticoside levels in pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) leaf extract were obtained at the time of immersion for two hours with sonication time for 15 minutes. The asiaticoside level obtained in the extract of pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) leaf was 0,1699 mg/10 mg extract with a percentage of 1.6842%.

Keywords: Pegagan air, Asiaticoside, Immersion, Sonication, HPLC.

Abstrak: Pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) merupakan salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat, salah satu kandungan senyawa pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) adalah asiaticosida. Asiaticosida diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan neuroprotektif. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh waktu perendaman sebelum sonikasi ekstrak daun pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) terhadap kadar asiaticosida. Parameter ekstraksi yang digunakan adalah waktu perendaman dan waktu sonikasi. Kadar asiaticosida dianalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan menggunakan kolom C-18, fase gerak metanol:air (70:30), laju alir 1 ml/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 206 nm. Pembuatan kurva kalibrasi dilakukan dengan menggunakan seri konsentrasi 2-14 ppm dengan persamaan regresi $y = 11656x + 142673$. Kadar asiaticosida yang optimum pada ekstrak daun pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) diperoleh pada waktu perendaman selama 2 jam dengan waktu sonikasi selama 15 menit. Kadar asiaticosida yang diperoleh pada ekstrak daun pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) ialah 0,1699 mg/10 mg ekstrak dengan persentase sebesar 1,6842%.

Kata kunci : Pegagan air, Asiaticosida, Perendaman, Sonikasi, HPLC

A. Pendahuluan

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman liar yang tumbuh di berbagai tempat seperti di daerah-daerah lembab, rawa dan pinggiran sawah. Tanaman ini banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai tanaman obat karena memiliki beberapa khasiat, diantaranya sebagai antioksidan, antipiretik, antidiuretik, penyembuh luka, rematik, penambah nafsu makan, melancarkan peredaran darah, hepatoprotektor dan meningkatkan daya ingat (Widowati *et al.*, 1992). Tumbuhan pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) secara umum dijelaskan memiliki kandungan senyawa yang tidak jauh berbeda dengan tumbuhan pegagan secara umum (*Centella asiatica* (L) Urban). Tumbuhan pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) mengandung senyawa berupa triterpenoid, saponin, flavonoid, tanin, steroid dan glikosida, sedangkan pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) mengandung senyawa metabolit berupa flavonoid, fenolik dan terpenoid (Endah, 2003).

Asiaticosida merupakan salah satu senyawa aktif yang terkandung dalam pegagan, disamping masih banyak senyawa-senyawa lain. Senyawa asiaticosida bersifat polar karena adanya ikatan glikosida antara molekul gula dengan gugus benzene (Pramono, 1992).

Berdasarkan penelitian sebelumnya telah dilakukan uji kandungan pemeriksaan penapisan fitokimia dari tumbuhan segar pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) yang menunjukkan hasil adanya senyawa metabolit sekunder pada bagian akar dan batang hanya diperoleh flavonoid. Sedangkan pada bagian daun diperoleh flavonoid, fenolik dan terpenoid (Arhas, 2017). Selain itu hasil yang didapatkan secara spesifik terhadap kandungan metabolit sekunder pada golongan triterpenoid dari perhitungan kadar asiatikosida pada herba pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) yaitu dengan kadar sebesar 2,63% (Arredha, 2016). Bagian pegagan yang mengandung asiatikosida terdapat pada daun (82,6%), batang (15,9%) dan pada akar (1,5%) (Kim *et al.*, 2004).

Metode ekstraksi perendaman adalah metode ekstraksi yang dapat menjaga kandungan senyawa tanaman yang tidak tahan panas (Handa *et al.*, 2008). Menurut Kim *et al.* (2009) menyatakan bahwa asiatikosida dapat diekstraksi menggunakan pelarut air, metanol dan etanol pada parameter suhu yang berbeda-beda, kadar asiatikosida tertinggi terdapat dalam ekstrak etanol pada suhu 78°C yaitu 17,7 mg/g yang di maserasi selama 5 jam, sedangkan dalam ekstrak metanol yaitu 8,2 mg/g yang di maserasi selama 24 jam. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstraksi asiatikosida yang dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan ditetapkan kadar dengan LC-MS diperoleh kadar sebesar 0,232% (Zulkarnaen *et al.*, 2016). Metode ekstraksi maserasi ini membutuhkan waktu yang relatif lebih lama agar sampel dapat diekstraksi secara optimum.

Metode ekstraksi sonikasi merupakan metode ekstraksi yang memanfaatkan gelombang ultrasonik yang dapat mempercepat waktu kontak antara sampel dan pelarut. Ada tiga parameter utama pada metode ultrasonikasi yaitu intensitas, waktu dan frekuensi gelombang ultrasonik (Sondari, 2016). Ekstraksi pegagan dengan pelarut etanol yang di sonikasi selama 30 menit didapatkan kadar sebesar 3,14 mg/g dengan pengukuran KCKT (Kwon *et al.*, 2011). Sedangkan pada penelitian lain didapatkan kadar asiatikosida dengan menggunakan sonikasi sebesar 7,43% dengan menggunakan pelarut etanol 70% dan waktu sonikasi selama 15 menit (Febriyanti *et al.*, 2016). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu perendaman sebelum sonikasi terhadap kadar asiatikosida pada ekstrak daun pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) yang tumbuh didaerah Taman Karya Kecamatan Tampandengan menggunakan metode KCKT.

B. Metodologi Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beker gelas (pyrex), erlemeyer, gelas ukur, pipet tetes, tabung reaksi, plat tetes, timbangan analitik (Shimadzu®), batang pengaduk, spatel, perkamen, aluminium foil, *thermometer*, botol gelap, corong, seperangkat alat destilasi (Eyela OBS-2100 R), pipet mikro (Nesco®), *rotary evaporator* (Bunchi®), sonikator (Krisbow®), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu®), penyaring sampel PTFE 0,2 µm, seperangkat alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Shimadzu®). Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.), etanol, karbon aktif, kloroform amoniak, kloroform, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, asam klorida pekat, besi (III) klorida, pereaksi mayer, logam Mg, metanol pro analisis, metanol *for liquid chromatography*, aquabidestillata.

C. Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi pegagan air dilakukan dengan menggunakan metode perendaman dan sonikasi menggunakan pelarut etanol. Asiatikosida memiliki ketahanan yang rendah terhadap panas (Alupului *et al.*, 2009). Pemilihan metode ekstraksi perendaman karena dianggap sebagai metode yang cocok untuk zat-zat yang tidak tahan pemanasan maupun yang tahan pemanasan, sedangkan metode sonikasi dipilih karena menggunakan panas yang rendah pada proses ekstraksi yaitu pada suhu 40°C sehingga kemungkinan senyawa asiatikosida rusak bisa dihindari. Pada sonikasi juga menggunakan gelombang ultrasonik yang akan menggetarkan serbuk simplisia saat proses ekstraksi yang dapat membantu difusi pelarut kedalam dinding sel tumbuhan (Ashley *et al.*, 2011).

Sebanyak 3,3 kg sampel segar daun pegagan air dikeringkan, dihaluskan dan diperoleh simplisia kering sebanyak 220 gram dengan persen rendemen 6,667%. Sampel yang telah dihaluskan diambil sebanyak 10 gram dan di rendam dengan pelarut etanol sebanyak 50 ml dengan variasi waktu selama 1 jam, 2 jam dan 3 jam perendaman, kemudian masing-masing disonikasi dengan variasi waktu 15 menit dan 30 menit, kemudian filtrat yang di peroleh dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* dan diperoleh % rendemen ekstrak etanol daun pegagan air pada variasi waktu 1 jam 15 menit (11,542%), 1 jam 30 menit (15,080%), 2 jam 15 menit (11,793%), 2 jam 30 menit (9,363%), 3 jam 15 menit (10,453%) dan 3 jam 30 menit (15,304%).

Tabel 1. Rata-rata Rendemen Ekstrak Pegagan Air (*Hydrocotyle vulgaris* L.)

Lama perendaman	Waktu sonikasi	Ulangan	Bobot sampel (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)	Rerata (%)
1 jam	15 menit	1	10,0040	1,3434	13,428	11,542
		2	10,0010	1,0139	10,137	
		3	10,0015	1,1063	11,061	
	30 menit	1	10,0051	1,2746	12,739	15,080
		2	10,0033	1,6602	16,596	
		3	10,0028	1,5911	15,906	
2 jam	15 menit	1	10,0010	1,1293	11,291	11,793
		2	10,0008	1,0485	10,484	
		3	10,0055	1,3613	13,605	
	30 menit	1	10,0029	0,8248	8,245	9,369
		2	10,0000	0,8919	8,919	
		3	10,0008	1,0944	10,943	
3 jam	15 menit	1	10,0038	1,0181	10,177	10,453
		2	10,0044	1,1349	11,344	
		3	10,0018	0,9839	9,837	
	30 menit	1	10,0022	1,3036	13,033	15,304
		2	10,0039	1,4736	14,730	
		3	10,0019	1,8154	18,150	

Setelah didapatkan ekstrak kental daun pegagan air, selanjutnya dilakukan skrining fitokimia. Skrining fitokimia dilakukan untuk menganalisis kandungan metabolit sekunder dari tumbuhan. Hasil yang diperoleh pada ekstrak daun pegagan air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) positif mengandung senyawa flavonoid, fenolik dan terpenoid.

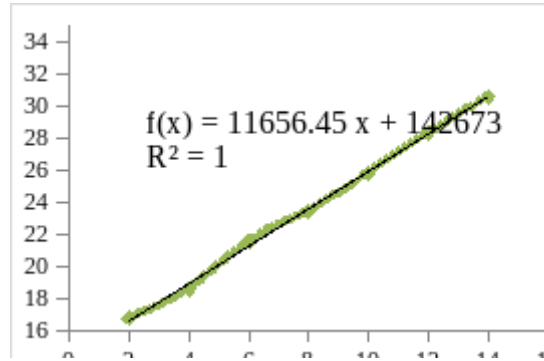
Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Pegagan Air (*Hydrocotyle vulgaris* L.)

No	Kandungan kimia	Pereaksi	Hasil Pengamatan
1	Alkaloid	Mayer	Tidak bereaksi (-)
2	Flavonoid	Logam Mg + HCl _(p)	Bereaksi (+)
3	Fenolik	FeCl ₃ 1%	Bereaksi (+)
4	Steroid	Lieberman-Bouchard	Tidak bereaksi (-)
5	Terpenoid	Lieberman-Bouchard	Bereaksi (+)
6	Saponin	Air	Tidak bereaksi (-)

Analisis dilakukan menggunakan alat KCKT dengan kolom C18 fase terbalik, menggunakan detektor UV dengan panjang gelombang 206 nm. Fase gerak yang digunakan ialah campuran metanol:air dengan perbandingan 70:30 dengan laju alir 1 ml/menit, fase gerak ini dipilih karena terdapat satu puncak yang dominan dan parameter-parameter yang telah memenuhi persyaratan. Sedangkan laju alir 1 ml/menit dipilih karena waktu retensi yang lebih cepat sehingga dapat mengefisiensi waktu analisis. Dalam penelitian ini dibuat larutan standar asiaticosida dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm dan 14 ppm dan diperoleh persamaan regresi linear $y = 11656x + 142673$ dengan koefisien korelasi (r) = 0,9982. Dari data tersebut uji linearitas memberikan nilai hubungan yang baik antara

konsentrasi dan respon, sehingga kurva yang diperoleh dapat memenuhi persyaratan. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan standar dalam mendeteksi analit (Chan, 2004).

Gambar 1. Kurva Kalibrasi Standar Asiatikosida



Tabel 3. Data Hasil Kalibrasi Standar Asiatikosida

Konsentrasi (ppm)	Luas Area
2	167617
4	185896
6	215685
8	234619
10	258284
12	283308
14	306063

Analisis kualitatif dilakukan dengan menggunakan alat KCKT. Tahap ini dilakukan untuk memastikan ada atau tidaknya senyawa asiatikosida yang terkandung dalam ekstrak daun pegagan air, dengan membandingkan waktu retensi antara standar asiatikosida dengan sampel. Hasil yang diperoleh untuk waktu retensi sampel ialah 4,702, sedangkan waktu retensi untuk standar asiatikosida ditambah sampel ialah 4,909. Selanjutnya untuk uji kuantitatif dilakukan pada masing-masing ekstrak berdasarkan lama perendaman dan waktu sonikasinya, masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 10 mg dan di larutkan dengan metanol sebanyak 10 ml dan diinjeksikan kedalam sistem KCKT. Diperoleh luas area untuk masing-masing ekstrak, kemudian luas area tersebut di rata-ratakan dan dihitung kadar terukur dari hasil persamaan regresi linear yang diperoleh. Hasil yang diperoleh melebihi rentang luas area yang terdapat pada persamaan regresi, sehingga dilakukan pengenceran untuk memperkecil luas area tersebut. Dilakukan dengan mengencerkan konsentrasi awal yaitu 1000 ppm menjadi 500 ppm, sehingga didapatkan hasil untuk lama perendaman 1 jam dengan waktu sonikasi 15 menit adalah 1,5196% dan 30 menit 1,4621%, sedangkan lama perendaman 2 jam dengan waktu sonikasi 15 menit 1,6842% dan 30 menit 1,4839% dan lama perendaman 3 jam dengan waktu sonikasi 15 menit adalah 1,5969% dan 30 menit 1,3868%, seperti yang tertera pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Kadar Asiatikosida Tumbuhan Pegagan Air (*Hydrocotyle vulgaris* L.)

Lama perendaman	Waktu sonikasi	Ulangan	Luas area	Kadar terukur (µg/ml)	Kadar asiatikosida (%)
1 jam	15	1	241391	153,38	1,5196
		2	241943		
		3	212860		
		Rata-rata	232064		

	30	1	218956	147,5 66	1,4621
		2	225373		
		3	241697		
		Rata-rata	228675		
2 jam	15	1	253042	169,9 41	1,6842
		2	239546		
		3	232557		
		Rata-rata	241715		
	30	1	219969	149,7 54	1,4839
		2	250027		
		3	219856		
		Rata-rata	229950		
3 jam	15	1	217768	161,1 71	1,5969
		2	244912		
		3	247132		
		Rata-rata	236604		
	30	1	233933	139,9 91	1,3868
		2	224288		
		3	214561		
		Rata-rata	224260		

Dari hasil pengamatan dilakukan analisis ANOVA satu arah. Hasil suatu pengujian dikatakan memberikan efek jika pada analisis statistik yang digunakan terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Pengujian ANOVA dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya pengaruh perendaman dan sonikasi terhadap kadar asiatikosida. Pada pengaruh lama perendaman dengan waktu sonikasi terhadap kadar asiatikosida diperoleh nilai F sebesar 0,191 dengan nilai p sebesar 0,829, karena nilai $p > 0,05$ maka dapat diartikan bahwa tidak terdapat pengaruh lama perendaman dengan waktu sonikasi terhadap kadar asiatikosida.

D. Penutup

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstraksi yang optimum adalah pada 2 jam perendaman dengan waktu sonikasi selama 15 menit, didapatkan kadar sebesar 0,1699 mg/10 mg ekstrak dengan persentase sebesar 1,6842%. Dilakukan uji statistik menggunakan ANOVA satu arah dan didapatkan hasil $0,829 > 0,05$, maka dapat diartikan bahwa tidak terdapat pengaruh secara signifikan pada lama perendaman sebelum sonikasi terhadap kadar asiatikosida.

Daftar Pustaka

- Alupului, A., Calinescu, I., Lavric, V., 2009, *Ultrasonics vs Microwave Extraction Intensification of Active Principles from Medicinal Plants*. AIDIC Conference Series 09, 1-8 DOI: 103303/ ACOS0909001.
- Arhas, R., 2017, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun, Batang, dan Akar Herbal Pegagan Air (*Hydrocotyl vulgaris* L.), Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru
- Arredha, M, P., 2016, Penentuan Kadar Asiatikosida Herba Pegagan Air (*Hydrocotyle vulgaris* L.) Asal Riau Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), *Skripsi*, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru.
- Ashley, K., Andrews, R.N., Cavazosa, L., & Demange, M., 2001, Ultrasonic xtraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16:1147-1153.

- Chan, C.C., Lee Y.C., Zhang, X.M, Lam, H., 2004, Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification., Wiley Interscience A., John Wiley and Sons, Inc., Publication.
- Djamal, R., 1998, *Prinsip-Prinsip Dasar Isolasi dan Identifikasi*, Universitas baiturrahmah, Padang.
- Endah L., M. M. Herminati, Y. Hety I., 2003, *Pegagan Meningkatkan Daya Ingat, Membuat Awet Muda, Menurunkan Gejala Stress, Meningkatkan Stamina*, Jakarta: Penebar Swya.
- Febriyanti, A. P., Iswarin, S. J., dan Digjayanti, T., 2016, Perbandingan Kadar Asiatikosida Dalam Ekstrak Etanol 70% Pegagan (*Centella asiatica* (L)Urban) Dengan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sonikasi Secara LC-MS, *JF FIK UINAM*, 4 (2) : 54-57.
- Handa, S.W., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D., 2008, *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, Trieste : International Centre For Science and High Technology.
- Kim, W.J., Kim, J.D., Veriansyah, B., Kim, J., Oh, S.G., Tjandrawinata, R.R., 2004, Extraction of Asiaticoside from *Centella asiatica* : Effects of Solvents and Extraction Methods, *Korea : Institute of Science and Technology*, Supercritical Fluid Lab.
- Kim, W.J., Kim, J., Veriansyah, B., Kim, J.D., Lee, Y.W., Oh, S.G., Tjandrawinata, R.R., 2009, Extraction of Bioactive Components from *Centella asiatica* Using Subcritical Water, *Journal of supercritical Fluid*.48: 211-216.
- Kwon, H.J., Park, J.H., Kim, G.T., Park, Y.D., 2011, Determination of Madecassoside and Asiaticoside Content of *C.asiatica* Leaf and *C. Asiatica*-Containing Ointment and Dentifrice by HPLC-Couple Pulsed Amperometric Detection, *Microchemical Journal*.
- Pramono, S., 1992., Profil Kromatogram Ekstrak Herba Pegagan yang Berefek Anti Hipertensi, *Warta Tumbuhan Obat Indonesia I* (2) : 37-39.
- Sondari, D., 2016, Studi Awal Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen dan Kadar Asiatikosida dari *Centella Asiatica* (L) URB, *Jurnal Sains Materi Indonesia*, 17,
- Widowati, L., Pudjiastuti, P., Indrari, D., Sundari, D., 1992, Beberapa Informasi Khasiat Keamanan dan Fitokimia Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban), *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, I (2) : 39-42.