Artikel Penelitian

Isolasi dan Karakterisasi Asam Asiatat dari Ekstrak Etanol Herba Pegagan *(Centella Asiatica*. (L.) Urban)

Ida Musfiroh[1,2], Tresna Nursyamsiah[3], Entris Sutrisna[3], Ahmad Muhtadi[4], Rahmana E. Kartasasmita[1] dan Slamet Ibrahim[1]

ABSTRACT: *Asiatic acid is a pentacyclic triterpene groups found in gotu kola (Centella asiatica (L.) Urban). This study was aimed to isolate asiatic acid compound from gotu kola herb ethanol extract. Extraction was performed by maceration and chromatography, and characterization by UV-Vis spectrophotometry, Infra Red, MS and LC/MS-MS. The compound isolated was a solid white, and showing of maximum wavelength (λmax) at 206 nm, the functional groups consist of stretching of OH (3433 cm^{-1}), aliphatic C-H (2929 cm^{-1}), carbonil (1709 cm^{-1}), bending of C-H (1462-1380 cm^{-1}), C-O (1242-1147 cm^{-1}). The compound has molecular weight of 489.4982. It was concluded that the isolated compound was asiatic acid that has molecular formula $C_{30}H_{48}O_5$.*

Keywords: *Gotu kola, isolation, asiatic acid, ethanolic extract*

ABSTRAK: Asam asiatat merupakan senyawa golongan triterpenoid pentasiklik yang terdapat dalam tanaman pegagan (*Centella Asiatica*. (L.) Urban). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa asam asiatat dari ekstrak etanol herba pegagan. Isolasi dilakukan dengan metode maserasi dan teknik kromatografi, dan karakterisasi dilakukan dengan spektrofotometri UV Vis, IR, MS dan LC/MS-MS. Hasil isolasi berupa serbuk berwarna putih, dan memberikan serapan pada panjang gelombang maksimum (λmax) 206 nm, mempunyai gugus fungsi yang terdiri dari regang –OH (3433 cm^{-1}), regang C-H alifatik (2929 cm^{-1}), regang C=O (1709,82) dan ulur C-H (1462-1380 cm^{-1}) serta ulur C-O (1242-1147 cm^{-1}). Senyawa mempunyai massa molekul sebesar 489,4982. Isolat adalah asam asiatat yang mempunyai rumus molekul $C_{30}H_{48}O_5$.

Kata kunci: Pegagan, isolasi, asam asiatat, ekstrak etanol

[1] Kelompok Keilmuan Farmakokimia, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung
[2] Departemen Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran
[3] Sekolah Tinggi Farmasi Bandung
[4] Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

Korespondensi:
Ida Musfiroh
Email: ida.musfiroh@unpad.ac.id

PENDAHULUAN

Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) mengandung sejumlah besar senyawa golongan saponin triterpenoid pentasiklik. Pegagan diketahui mempunyai aktivitas farmakologi yang luas yaitu untuk penyembuhan luka terbuka, untuk pengobatan berbagai kondisi kulit seperti kusta, lupus, varises, bisul, eksim, psoriasis, diare, demam, amenore, suatu penyakit pada saluran genitourinari perempuan dan juga untuk menghilangkan kecemasan dan meningkatkan daya ingat (1), antibakteri, antioksidan, antifungi, hemoroid (2, 3) serta antiinflamasi (4).

Berbagai aktivitas farmakologi tersebut dilaporkan berkaitan dengan senyawa triterpenoid yang terkandung dalam tanaman pegagan diantaranya yaitu asiatikosida, madekassosida, asam asiatat, dan asam madekasat. Senyawa golongan triterpenoid adalah metabolit sekunder suatu tanaman yang disintesis melalui jalur isoprenoid, menghasilkan struktur triterpenoid yang bersifat hidrofobik (aglikon) dan gugus gula yang bersifat hidrofilik (5). Ekstrak pegagan telah tersedia secara komersil sebagai TECA (*titrated extract of C. Asiatica*), dan TTFCA (*total triterpenoid fraction of C. Asiatica*), serta TTF (total triterpenoid fraction). TECA dan TTFCA merupakan campuran asam asiatat (30%), asam madekasat (30%) dan asiatikosida (40%), sedangkan TTF mengandung asam asiatat dan madekasat (60%) dalam campuran dengan asiatikosida (40%) (6). Diantara senyawa tersebut, asiatikosida merupakan komponen utama dalam ekstrak pagagan (*Centella asiatica*) (7). Asiatikosida merupakan senyawa glikosida yang dapat terhidrolisis menjadi asam asiatat.

Aktivitas farmakologi asam asiatat telah banyak dijelaskan pada penelitian sebelumnya diantaranya yaitu sebagai antiinflamasi dengan aktivitas antiinflamasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan asiatikosida (8), berperan dalam penyembuhan luka terbuka (9), dan hepatoprotektor (10). Dalam penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa asam asiatat mempunyai sifat farmakokinetik lebih baik dari pada asiatikosida, karena sifat hidrofobisitas asam asiatat yang lebih besar, serta sifat absorbsi asam asiatat di dalam usus yang lebih baik dari pada asiatikosida (11,12). Oleh karena itu asam asiatat merupakan senyawa yang berperan penting dalam aktivitas farmakologi ekstrak pegagan (*Centella asiatica*).

Isolasi asam asiatat dan asiatikosida telah dilaporkan pada beberapa penelitian sebelumnya yaitu dengan menggunakan metode ekstraksi superkritis dengan pelarut air pada 40 MPa dan 250°C, ekstraksi cair dengan pelarut metanol atau etanol pada suhu titik didihnya, dan ekstraksi dengan pelarut air subkritis. Hasil isolasi dengan metode tersebut sebagai berikut, bahwa ektraksi superkritis dinyatakan mempunyai randemen yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode ekstraksi cair cair pada suhu titik didihnya, sedangkan hasil ekstraksi dengan pelarut air subkritis lebih rendah dari hasil ekstraksi dengan metanol atau etanol pada suhu titik didihnya (13). Isolasi asam asiatat juga dilaporkan oleh Soegiharjo dkk (14) dengan ekstraksi cair cair untuk penetapan asiatikosida dan senyawa sekerabat dari ekstrak etanol kultur suspensi pegagan, namun karakterisasinya hanya menggunakan teknik densitometri (14). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi asam asiatat menggunakan metode ekstraksi cair cair metode Soegiharjo dkk. (14) dengan modifikasi, namun karakterisasi dilakukan dengan metode yang lebih komprehensif yaitu menggunakan spektrofotometri dan kromatografi, meliputi kromatografi lapis tipis (KLT), spektrofotometri UV, IR, Spektroskopi Massa dan konfirmasi kemurnian dengan LC/MS-MS.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan kimia digunakan untuk penelitian adalah baku pembanding asam asiatat 98% (Sigma Aldrich), etanol 70%, butanol, etil asetat, air, kloroform, metanol, asam sulfat, plat silika GF_{254}, silica Gel 60.

Alat

Alat-alat yang digunakan adalah gelas kimia, neraca analitik, evaporator, alat refluks, kolom, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), spektrofotometer IR (Prestige), spektroskopi massa, serta alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

Cara kerja

Ekstraksi dan Isolasi

Herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) yang digunakan diperoleh dari perkebunan Manoko, kecamatan Lembang, Bandung. Sampel dikeringanginkan kemudian dihaluskan hingga menjadi serbuk kering. Sebanyak 1183,5 gram dimaserasi dengan metanol sebanyak 2,5 L x 3. Maserat dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental etanol dengan berat yang konstan (352,6 g). Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan fraksinasi, sebanyak 20 gram ekstrak kental difraksinasi berturut turut dengan pelarut n heksan, etil asetat, dan butanol. Fraksi butanol kemudian dihidrolisis dengan cara refluks selama 60 menit dalam HCl 6%. Hasil hidrolisis diekstraksi dengan eter untuk memperoleh fraksi asam asiatat, karakterisasi dilakukan dengan KLT.

Pemisahan selanjutnya dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan silika gel G60 sebagai fasa diam dan eluen kloroform-metanol (7:3 v/v). Pemisahan ini menghasilkan 8 fraksi, pada fraksi ke 3-8 menunjukkan noda asam asiatat dan beberapa senyawa lain. Oleh karena itu dilakukan pemisahan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom dengan silika gel G60 sebagai fasa diam, dan eluen kloroform-metanol (9:1 v/v). Pemisahan ini menghasilkan 28 fraksi. Fraksi yang menunjukkan nilai R_f yang sama dengan standar kemudian dimurnikan kembali dengan kromatografi preparatif, fasa diam silica GF_{254} dan pengembang kloroform-metanol (9:1 v/v).

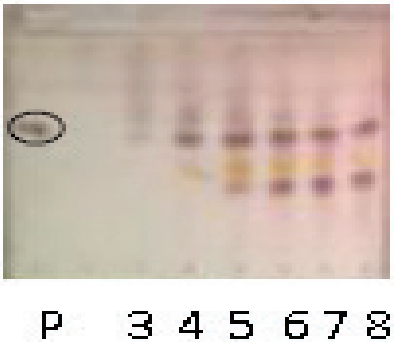
Karakterisasi senyawa hasil isolasi

Senyawa hasil isolasi dikarakterisasi dengan spektrofotometri UV, infra merah (IR) dan MS menggunakan pembanding asam asiatat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi asam asiatat

Rendemen ekstrak etanol dari herba pegagan diperoleh sebesar 29,79 %. Fraksi eter yang telah dipisahkan setelah proses refluks kemudian dilakukan pemisahan dengan kolom kromatogasi menghasilkan 18 fraksi, dan hasil identifikasi menggunakan KLT menunjukkan asam asiatat terdapat pada fraksi 3-8 (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil KLT dari fraksi kromatografi kolom (pengembang kloroform metanol (17:3) dengan penampak bercak asam sulfat (10%) dalam metanol %
Keterangan : P = pembanding asam asiatat
2-8 = fraksi ke 3-8 hasil kromatografi kolom

Hasil KLT tersebut menunjukkan bahwa asam asiatat hasil pemisahan dengan kromatografi kolom terdapat pada fraksi ke 3-8, yang ditunjukkan dengan adanya noda dengan nilai Rf yang sama dengan standar asam asiatat yaitu 0,42. Fraksi 3-8 masih mengandung campuran senyawa lain sehingga dilakukan pemisahan selanjutnya menggunakan kolom kromatografi. Pemisahan dengan kromatografi kolom kedua diperoleh asam asiatat pada fraksi ke 15-21, dan hasil KLT menunjukkan fraksi tersebut mengandung dua senyawa dengan nilai Rf masing masing 0,42 dan 0,63. Pemurnian selanjutnya dilakukan dengan KLT preparatif menghasilkan isolat berupa serbuk berwarna putih sebanyak 10 mg. Hasil isolasi diidentifikasi menggunakan spektrofotometri UV, IR dan Massa.

Identifikasi isolat dengan teknik spektroskopi

Hasil analisis dengan spektrofotometri UV menunjukkan bahwa isolat merupakan senyawa yang tidak mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi (Tabel 1).

Berdasarkan hasil identifikasi isolat dengan spektrofotometri UV tersebut, senyawa mempunyai serapan maksimum pada λmax 206,2 nm (metanol). Hal ini menunjukkan bahwa isolat merupakan senyawa dengan struktur yang tidak mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi. Senyawa asam asiatat merupakan golongan triterpenoid yang secara struktur tidak mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi, tetapi terdiri dari cincin pentasiklik dan gugus olefin serta gugus alkohol.

Data serapan pada spektrofotometri UV tersebut, sejalan dengan hasil identifikasi gugus fungsi dengan spektrofotometri IR. Hasil analisis gugus fungsi menunjukkan bahwa isolat memberikan puncak serapan gugus hidroksil pada bilangan gelombang 3433 cm^{-1}. Gugus hidroksil ini merupakan regang-OH terikat yang membentuk pita lebar dengan intensitas kuat yang terlihat pada bilangan gelombang 3450-3200. Adanya gugus hidroksil ini juga didukung dengan munculnya ulur C-O pada daerah 1242–1147 cm^{-1}. Selanjutnya, pita serapan pada bilangan gelombang 2929 cm^{-1} menunjukkan adanya regang C-H alifatik dan diperkuat dengan munculnya serapan pada 1462-1380 cm^{-1} menunjukkan adanya ulur C-H. Regang karbonil (C=O) juga ditunjukkan oleh serapan bilangan gelombang 1709 cm^{-1}. Data spektrum IR isolat ditunjukkan pada Tabel 2, sedangkan gambar spektrum IR antara isolat dan pembanding asam asiatat ditunjukkan pada Gambar 2.

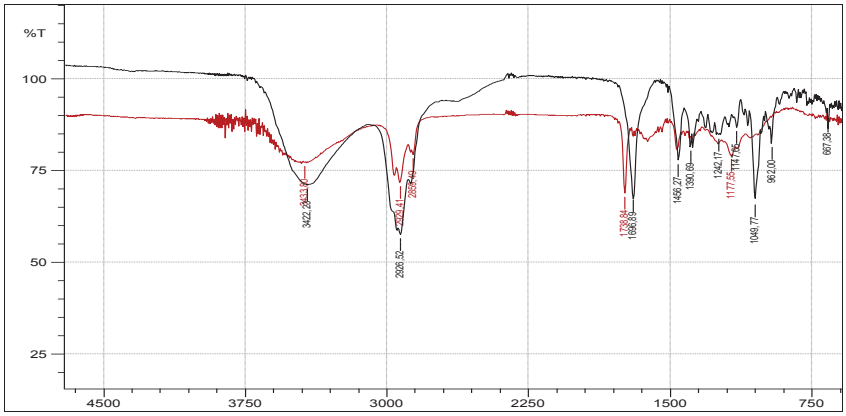
Data-data tersebut didukung pula oleh hasil analisis menggunakan spektroskopi massa (MS) untuk mengetahui berat molekul senyawa isolat. Isolat menunjukkan nilai rasio massa terhadap muatan (m/z)+ yaitu 489,4982. Berat molekul asam asiatat adalah 488,7 ($C_{30}H_{48}O_5$). Spektrum senyawa hasil isolasi dan pembanding asam asiatat ditunjukkan pada Gambar 3.

Tabel 1. Hasil Pengukuran absorbansi terhadap panjang gelombang

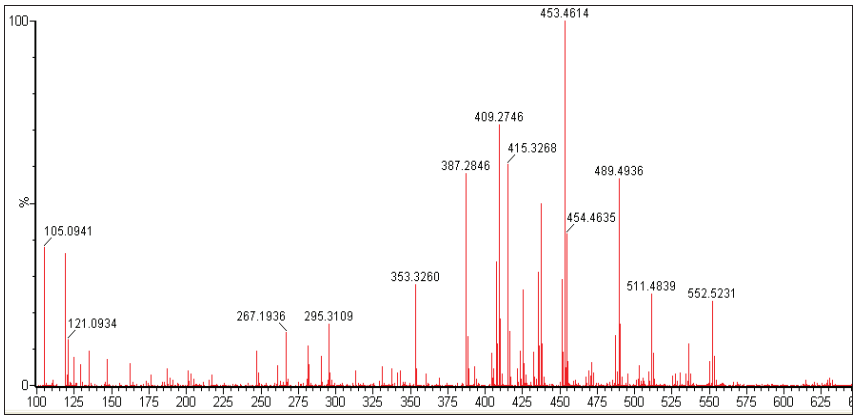
No	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
1	268,60	0,235
2	261,80	0,265
3	253,60	0,284
4	248,20	0,290
5	206,20	2,382
6	267,00	0,209
7	261,00	0,262
8	251,60	0,284
9	245,60	0,276
10	200,00	1,428

Tabel 2. Karakteristik gugus fungsi dari spektrum IR senyawa hasil isolasi

k (cm^{-1})	Pita	Intensitas	Gugus fungsi
3433	Lebar	Kuat	Regang O-H
2929	Tajam	Sedang	Regang C-H alifatik
1709	Tajam	Kuat	Regang C=O
1462-1380	Tajam	Sedang	Ulur C-H
1242-1147	Tajam	Sedang	Ulur C-O



Gambar 2. Spektrum IR dari isolat (A) dan pembanding asam asiatat (B)



Gambar 3. Spektrum massa isolat dengan teknik MS

Data spektroskopi mass tersebut juga didukung dengan hasil analisis menggunakan LC-MS/MS. Identifikasi isolat menggunakan metode LC-MS/MS dilakukan untuk mengetahui pola kromatogram dan fragmentasi. Pola kromatogram hasil analisis menggunakan LC-MS/MS menunjukkan bahwa terdapat beberapa puncak pada waktu retensi 2,38 ; 2,22 ; 1,65 ; 0,72 dan 0,59 menit (Gambar 4). Pola tersebut juga diberikan oleh pembanding asam asiatat yaitu pada waktu retensi 2,38 ; 2,19 ; 1,64 ; 1,27 ; dan 0,79 menit (Gambar 5).

Salah satu keuntungan teknik analisis dengan LC-MS/MS adalah dapat mengidentifikasi massa

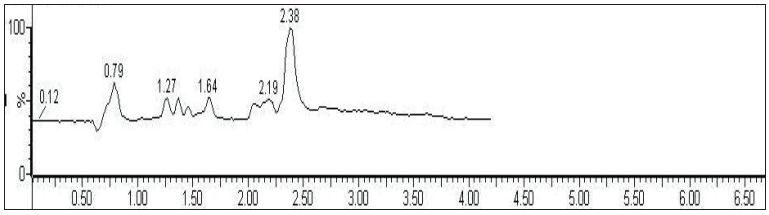
molekul pada puncak serapan yang dihasilkan dari suatu proses pemisahan sampel, serta mengkonfirmasi kemurnian senyawa. Oleh karena untuk mendukung data data spektrofotometri UV, IR dan MS maka dilakukan analisis massa molekul pada waktu retensi 2,19 menit (pembanding) dan 2,22 menit (isolat). Hasil analisis dengan LC MS/MS menunjukkan nilai (M+1) berturut turut yaitu 489,4982 dan 489,5019. Perbedaan waktu retensi hasil analisis dengan LC/MS-MS antara isolat dan pembanding dapat disebabkan karena perbedaan kemurnian isolat. Spektrum massa isolat dan pembanding asam asiatat ditunjukkan pada Gambar 6 dan 7.

KESIMPULAN

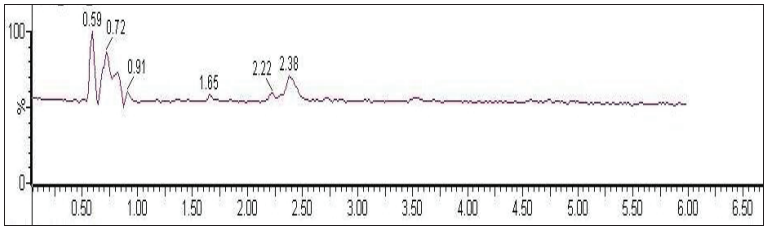
Dari ekstrak etanol herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) telah berhasil diisolasi pada fraksi butanol, serbuk putih yang berdasarkan analisis spektroskopi merupakan asam asiatat dengan rumus molekul $C_{30}H_{48}O_5$.

UCAPAN TERIMA KASIH

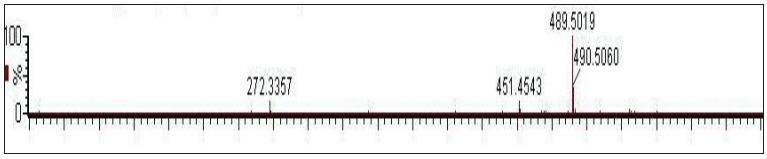
Terima kasih kepada Suci Cintari sebagai analis dalam Laboratorium Penelitian Fakultas Farmasi UNPAD yang telah membantu dalam persiapan sampel pada penelitian ini.



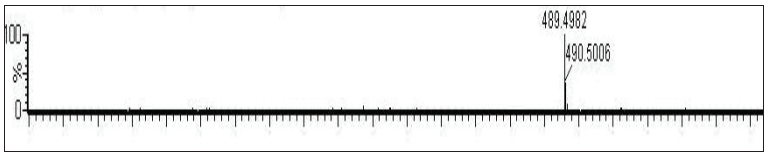
Gambar 4. Kromatogram hasil LC/MS senyawa asam asiatat (pembanding)



Gambar 5. Kromatogram hasil LC/MS isolat



Gambar 6. Spektrum massa isolat dengan teknik MS/MS



Gambar 7. Spektrum massa asam asiatat (pembanding) dengan teknik MS/MS

DAFTAR PUSTAKA

1. Gohil KJ, Patel JA and Gajjar AK. Pharmacological review on Centella asiatica: A potential herbal cure-all. Indian J Pharm Sci 2010; 72(5): 546-556.
2. Chong NJ and Aziz Z. A Systematic review of the efficacy of Centella asiatica for improvement of the signs and symptoms of chronic venous insufficiency. Evidence-Based Comp Alter Med 2013. Article ID 627182, 10 pages.
3. Nurlaily A, Noor Baitee Ar, Musalmah M. Comparative Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Different Extracts of Centella asiatica (L.) Urban and Its Active Compounds, Asiaticoside and Madecassoside. Med & Health 2012; 7(2): 62-72.
4. Ramesh BN, Girish TK Raghavendra RH, Naidu KA, Rao UJ, Rao KS. Comparative study on anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Caesalpinia crista and Centella asiatica leaf extracts. J Pharm Bioallied Sci 2014; 6(2): 86-91.
5. Jacinda T, James JT and Dubery IA., Review: Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb Centella asiatica (L.) Urban. Molecules 2009; 14(10), 3922-3941.
6. Hausen BM. Centella asiatica (Indian pennywort), an effective therapeutic but a weak sensitizer. Contact Dermatitis 1993; 29(4):175-179.
7. Brinkhaus B, Linder M, Schuppan D, Hahn EG. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East African medicinal plant Centella asiatica. Phytomedicine 2000; 7: 427-448.
8. Yun KJ, Kim JY, Kim JB, Lee KW, Jeong SY, Park HJ, Jung HJ, Cho YW, Yun K, Lee KT. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-κB inactivation in RAW 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. International Immunopharmacology 2008; 8: 431-441.
9. Jeong SB. Asiatic Acid Derivatives for New Wound Healing Agent. Archives of Pharmacol Research 2006; 29(7): 556-562.
10. Zhao LX, Park HG, Jew SS, Lee MK, Kim YC, Thapa P, Karki R, Jahng Y, Jeong BS, Lee ES. Modification of C11, C28, C2,3,23 or C2, 23, 28 Functional Groups on Asiatic Acid and Evaluation of Hepatoprotective Effects. Bull Korean Chem Soc 2007; 28(6): 970-976.
11. Yuan Y, Zhang H, Sun F, Sun S, Zhu Z, Chai Y. Biopharmaceutical and pharmacokinetic characterization of asiatic acid in Centella asiatica as determined by a sensitive and robust HPLC-MS method. J Ethnopharmacol 2015; 163: 31-38.
12. Kartasasmita RE, Musfiroh I, Muhtadi A, Ibrahim S. Binding affinity of asiatic acid derivatives design against inducible nitric oxide synthase and ADMET Prediction. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2014, 4(02): 75-80.
13. Kim W, Kim J, Veriansyah B, Kim J, Lee Y, Oh S, Tjandrawinata RR. Extraction of bioactive components from Centella asiatica using subcritical water. J Supercritical Fluids 2009; 48: 211-216.
14. Soegihardjo CJ dan Koensoemardiyah. Produksi Asiatikosida Dan Senyawa Sekerabat Dengan Kultur Suspensi Sel Centella asiatica (L.) Urban. Diakses dari http://mot.farmasi.ugm.ac.id. pada tanggal 20 November 2013.