

RISET PROFIL KROMATOGRAM HERBA PEGAGAN SECARA HIGH PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (HPTLC)

Tina Wikara*, Sri Murhandini, Herlina B.Setijanti, Tepy Usia

Research Center for Drug and Food

National Agency of Drug and Food Control – The Republic of Indonesia

Email: riset.om@pom.go.id

ABSTRACT

Research on Fingerprint of *Centella asiatica* (L.) Urb. herbs was aimed to produce a chromatogram profile of the *C. Asiatica* herbs. The chromatogram can be used for quality control and standardization of herbal medicine containing *C. Asiatica* herbs. The chromatogram can be used for quality control and standardization of herbal medicine containing *C. asiatica* herbs. Samples were collected from Bogor, Solo and Yogyakarta. The stationary phase was HPTLC plates of silica gel 60 F254 and mobile phase was dicloromethane-methanol-water (14:6:1) and sulfuric acid reagent as coloring agent. TLC Photo Documentary System was used at λ 366 nm and TLC Scanner at λ 506 nm to see the spektrum of asiaticoside as a reference. Validation was done using specificity and precision parameters. The result showed that the asiaticoside spektrum of the standard solution and test solution had appropriate acceptance criteria of specificity, as well as for precision. In conculusion, the method was valid for the quality control of product based on the *C. asiatica* herbs.

Keywords : *Centella asiatica* herbs, fingerprint, chromatogram profile, HPTLC

ABSTRAK

Telah dilakukan riset Profil Kromatogram/*Fingerprint Centella asiatica* (L.) Urb. (herba pegagan) yang bertujuan untuk menghasilkan profil kromatogram herba pegagan secara *HPTLC* dalam menjamin mutu dan standardisasi obat bahan alam. Pembuatan *fingerprint* dilakukan secara *HPTLC* dan sebagai sampel digunakan simplisia yang berasal dari 3 (tiga) daerah yang berasal dari Bogor, Solo and Yogyakarta. Fase diam menggunakan plat *HPTLC* silika gel 60 F₂₅₄ sedangkan fase gerak menggunakan diklorometan-metanol-air (14:6:1) dan penampak bercak reagen asam sulfat. Untuk melihat spektrum dari asiatikosid sebagai senyawa marker dilakukan deteksi dengan *TLC Photo Documentary System* pada λ 366 nm serta *TLC Scanner* pada λ 506 nm. Validasi metode dilakukan menggunakan parameter spesifisitas dan presisi. Hasil uji spesifisitas dan presisi menunjukkan bahwa spektrum asiatikosid dari larutan baku dan larutan uji sesuai kriteria keberterimaan. Disimpulkan bahwa metode ini valid untuk pengujian standardisasi produk yang mengandung herba pegagan.

Kata kunci : Herba pegagan, *Centella asiatica*, fingerprint, profil kromatogram, *HPTLC*

PENDAHULUAN

Centella asiatica atau herba pegagan merupakan suku Apiaceae yang telah digunakan secara luas dalam pengobatan tradisional selama ratusan tahun untuk mengobati berbagai macam penyakit [1]. Tanaman ini tersebar secara luas di berbagai negara Asia

tenggara termasuk Indonesia. Pegagan mengandung senyawa kimia diantaranya asiatikosid, tankuninsid, isotankunisid, madekasosid, brahmosid, asam brahmik, asam madasiatik, hidrokotilin, mesoinositol, sentelose, karetonoid, garam mineral (seperti aram kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi). Diduga senyawa glikosida triterpenoida yang disebut asiatikosid berperan dalam berbagai aktifitas penyembuhan penyakit. Asiatikosid dan senyawa sejenis juga berkhasiat anti lepra (kusta). Secara umum, pegagan berkhasiat sebagai hepatoprotektor yaitu melindungi sel hati dari berbagai kerusakan akibat racun dan zat berbahaya [2].

Faktor yang mempengaruhi perbedaan kandungan kimia diantaranya adalah perbedaan tempat tumbuh tanaman, umur, musim panen, proses pengeringan dan faktor lainnya. Faktor-faktor tersebut perlu diperhatikan karena dapat mempengaruhi kualitas, keamanan, manfaat dari obat tradisional. Efisiensi terapi obat sangat tergantung pada penggunaan yang tepat dan keaslian bahan baku yang digunakan. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan kontrol kualitas dari bahan baku agar mutu dari bahan baku terjamin dan dihasilkan produk yang berkualitas. Kontrol kualitas merupakan proses yang terlibat dalam mempertahankan kualitas dan validitas produk yang dihasilkan [3].

Oleh karena itu, jaminan keamanan, kualitas dan khasiat tanaman obat dan produk herbal kini telah menjadi isu utama dan penting sehingga bahan tanaman yang digunakan perlu standardisasi. Dalam beberapa tahun terakhir, kemajuan dalam sidik jari kromatografi dan spektral telah berperan penting terutama dalam pengendalian kualitas obat-obatan herbal yang kompleks [4]. Analisis *fingerprint* dengan menggunakan *high performance thin layer chromatography* (HPTLC) merupakan suatu metode yang efektif dan alat yang ampuh untuk memperkirakan senyawa kimia dan biokimia yang menjadi suatu penanda [5]. HPTLC menjadi teknik analisa rutin karena beberapa keuntungan termasuk jumlah fase gerak yang digunakan hanya sedikit, kecepatan metode dan analisis sampel dapat dilakukan secara bersamaan (di plat yang sama), tidak seperti kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Hal tersebut dapat mengurangi waktu dan biaya analisis sampel. Sampel yang keruh dan dalam bentuk suspensi dapat di analisis langsung dengan menggunakan HPTLC. Aplikasi sampel dapat dilakukan dan diulang secara otomatis pada plat yang sama, kondisi scanning dapat diubah. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh profil sidik jari/kromatogram dari herba pegagan yang digunakan sebagai standardisasi untuk menjamin keamanan maupun manfaat tanaman pegagan.

METODE PENELITIAN

Bahan

Herba pegagan dikumpulkan dari 3 (tiga) daerah yang berbeda yaitu Bogor (Pusat Studi Biofarmaka-IPB), Solo (B2P2TOOT Tawangmangu) dan Yogyakarta (Agro Industri). Determinasi dilakukan di Pusat Penelitian Biologi – LIPI, Bogor, Indonesia. Baku pembanding yang digunakan adalah asiatikosid (Sigma-Aldrich; pelarut diklorometan p.a (Merck), metanol p.a (Merck), asam sulfat 98% (Merck), air. Sedangkan untuk analisa profil kromatogram menggunakan fase diam HPTLC silica gel plat F254 ukuran 20 x 10 cm (Merck).

Peralatan

Profil kromatogram dilakukan dengan menggunakan Linomat 5 TLC Spotter (Camag), *twin trough glass chamber* 20x10 cm, TLC Scanner 3 (Camag), TLC dokumentasi sistem reprostar 3 (Camag).

Prosedur

Pengembangan Metode

Larutan Standar

Larutan standar dibuat dengan melarutkan asiaticosid (1 mg) dalam 1 mL metanol.

Larutan Uji

Serbuk simplisia (sampel) herba pegagan diekstraksi menggunakan metanol. Tidak kurang dari 0,1 g serbuk simplisia pegagan (Bogor, Solo dan Yogyakarta) dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 2 mL, ditambahkan dengan 1 mL metanol, disonikasi pada suhu 60 °C selama 5 menit, disentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Supernatan digunakan sebagai larutan uji. Prosedur ini diulangi sampai 6 kali ulangan.

Analisis *Fingerprint* HPTLC

Larutan baku dan larutan uji di totolkan menggunakan Linomat 5 TLC Spotter. Masing-masing larutan uji ditotolkan pada fase diam Plat HPTLC silika gel F₂₅₄, sebanyak 5 µL dalam bentuk pita selebar 7 mm dengan jarak antar pita selebar 9,7 mm berturut-turut dari larutan uji herba pegagan Bogor, Solo, larutan baku, dan larutan uji herba pegagan Yogyakarta. Plat HPTLC di eluasi menggunakan fase gerak diklorometan-metanol-air (14:6:1). Pengembangan menggunakan *twin trough glass chamber* (CAMAG), volume fase gerak (20 mL sisi belakang dan 10 mL sisi depan), penjuhan dengan menggunakan kertas saring. Setelah di eluasi, plat dikeringkan menggunakan pengering udara di semprot dengan pereaksi asam sulfat serta dipanaskan pada suhu 100°C selama 3 menit.

Deteksi

Plat yang telah di semprot dengan penampak bercak diamati di bawah UV pada panjang gelombang 366 nm untuk melihat posisi bercak yang telah terpisah dan didokumentasikan dengan *Photo Documentary System* (Camag) di bawah UV pada panjang gelombang 366 nm. *Scan* plat menggunakan TLC Scanner (Camag) pada panjang gelombang 506 nm.

Parameter Validasi

Uji Kesesuaian Sistem

Prosedur:

- Pembuatan larutan baku dan larutan uji seperti 1.a dan 1.b
- Penotolan larutan baku dan larutan uji sesuai dengan cara seperti pada prosedur 1.c
- Pengembangan dan deteksi sesuai dengan prosedur 1.d
- Hitung Faktor retensi (Rf) dan Rf rata-rata bercak asiaticosid
- Hitung standar deviasi relatif (RSD) dari 6 bercak dengan kriteria keberterimaan $RSD \leq 2\%$

Spesifisitas

Prosedur:

- Pembuatan larutan baku dan larutan uji seperti 1.a dan 1.b
 - Penotolan larutan baku dan larutan uji sesuai dengan cara seperti pada prosedur 1.c
 - Pengembangan dan deteksi sesuai dengan prosedur 1.d
 - Spektrum asiaticosid pada larutan baku dan larutan uji di amati
- Kriteria keberterimaan:

Spektrum bercak asiatikosid larutan baku dan larutan uji sama.

Presisi (Keberulangan dan Presisi Antara)

Prosedur:

- Pembuatan larutan baku dan larutan uji seperti 1.a dan 1.b
- Penotolan larutan baku dan larutan uji sesuai dengan cara seperti pada prosedur 1.c
- Pengembangan dan deteksi sesuai dengan prosedur 1.d
- Ulangi langkah pada uji kesesuaian sistem pada hari yang berbeda untuk menguji keberulangan dan presisi antara
- Hitung Rf, Rf rata-rata dan RSD
- Kriteria keberterimaan: Keberulangan : $RSD \leq 2\%$ dan Presisi Antara $RSD \leq 5\%$.

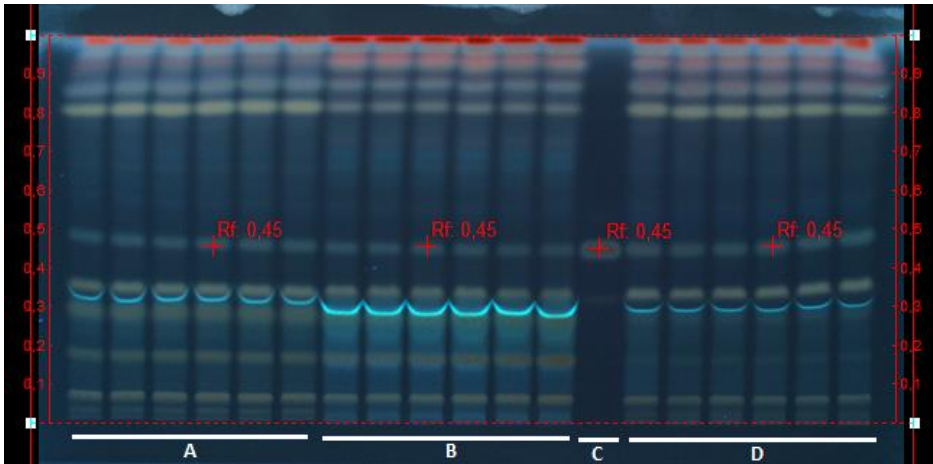
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisa profil kromatogram menggunakan metode HPTLC merupakan salah satu teknik yang sering digunakan dalam evaluasi kontrol kualitas obat bahan alam. Profil kromatogram herba pegagan dibuat dengan menggunakan simplisia dari 3 daerah, yaitu Bogor, Solo dan Yogyakarta. Identifikasi/determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, hasil menunjukkan bahwa tumbuhan yang digunakan adalah *Centella asiatica* (L.) Urb. Baku pembanding yang digunakan adalah asiatikosid yang merupakan marker dari herba pegagan [6]. Pengembangan awal penelitian ini adalah ekstraksi herba pegagan dengan berbagai kondisi hingga diperoleh kondisi optimal, yang meliputi optimasi jenis pelarut, suhu ekstraksi, jumlah pelarut, waktu ekstraksi.

Hasil optimasi ekstraksi diperoleh kondisi optimal menggunakan metanol. Metanol merupakan pelarut yang bersifat polar sehingga dapat menarik senyawa asiatikosid dan senyawa-senyawa lain yang bersifat polar yang terkandung dalam herba pegagan. Eluasi/pengembangan dilakukan dengan menggunakan fase gerak diklorometan-metanol-air (14:6:1) dan di semprot dengan pereaksi asam sulfat serta dipanaskan pada suhu 100°C selama 3 menit. Sistem kromatografi yang digunakan pada penelitian ini adalah fase normal, yaitu menggunakan fase diam yang bersifat polar (Silika Gel F254) dan fase gerak yang terdiri dari komposisi yang mengandung metanol dan/atau air yang bersifat polar sehingga meningkatkan kepolaran dari fase gerak. Perbedaan kepolaran digunakan untuk melihat perbedaan bercak-bercak yang tampak pada profil kromatogram tersebut. Pada kondisi fase gerak yang lebih polar maka senyawa polar yang tereluasi terlebih dahulu, sedangkan senyawa non polar akan terikat lebih lama di fase diam (non polar) sehingga lebih lama tereluasi (Rf lebih kecil).

Deteksi plat HPTLC yang sudah di eluasi dan disemprot dengan penampak bercak dilakukan dengan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm (Gambar 1). Deteksi dengan penampak bercak asam sulfat dilakukan berdasarkan kemampuan asam sulfat yang bersifat reduktor dalam merusak gugus kromofor dari zat aktif simplisia sehingga panjang gelombangnya akan bergeser kearah yang lebih panjang dan bercak tampak oleh mata. Intensitas warna yang terbentuk dilakukan dengan secara KLT-densitometri (TLC scanner) pada panjang gelombang 506 nm.

Profil kromatogram dari herba pegagan menunjukkan bercak dengan Rf antara 0,22-0,89. Nilai Rf bercak baku asiatikosid dan yang terkandung pada herba pegagan dari ketiga daerah adalah 0,45, nilai Rf ini menunjukkan bahwa masing-masing simplisia tersebut mengandung asiatikosid.

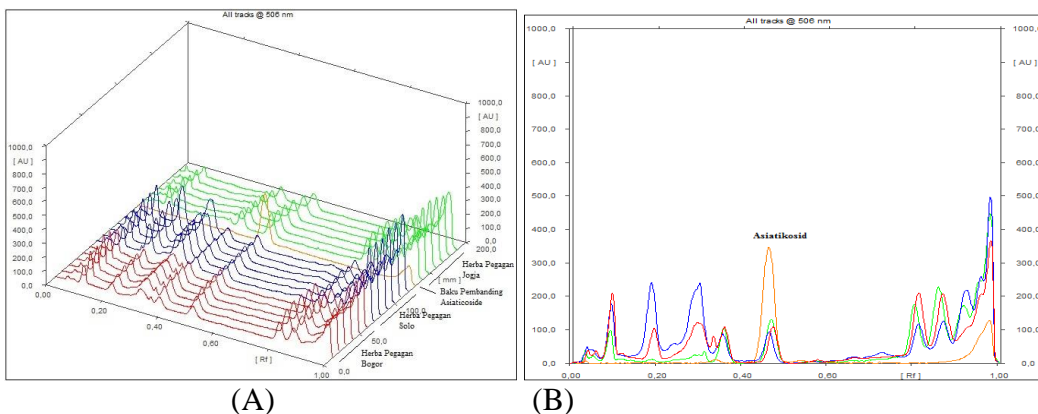


Gambar 1. Profil kromatogram KLT ekstrak metanol herba pegagan Bogor, Solo dan Jogja pada panjang gelombang 366 nm setelah derivatisasi dengan penampak bercak asam sulfat.

Keterangan:

- A : Profil kromatogram KLT herba pegagan Bogor
- B : Profil kromatogram KLT herba pegagan Solo
- C : Profil kromatogram KLT Asiatikosid
- D : Profil kromatogram KLT herba Yogyakarta

Dari *TLC photo documentary System* pada panjang gelombang 366 nm setelah derivatisasi dengan penampak bercak asam sulfat dan TLC scanner pada panjang gelombang 506 nm (gambar 2), pemilihan panjang gelombang ini merupakan panjang gelombang maksimum untuk senyawa asiatikosid sesuai farmakope herbal Indonesia [6].



Gambar 2. Profil kromatogram KLT ekstrak metanol herba pegagan Bogor, Solo dan Yogyakarta pada panjang gelombang 506 nm pada 3 dimensi (A) dan 2 dimensi (B)

Dari hasil deteksi dengan TLC scanner, terdapat puncak yang sama antara baku asiatikosid dengan puncak yang terdapat pada ketiga sampel simplisia. Hal ini menunjukkan bahwa sampel yang berasal dari Bogor, Solo dan Yogyakarta mengandung senyawa asiatikosid. Jika dibandingkan intensitasnya, terlihat intensitas bercak asiatikosid yang paling nyata dan paling besar adalah simplisia yang berasal dari Yogyakarta,

persentase luas area yang diperoleh dari asiaticosid yang terkandung dari simplisia yang berasal dari Yogyakarta adalah yang paling besar (tabel 1).

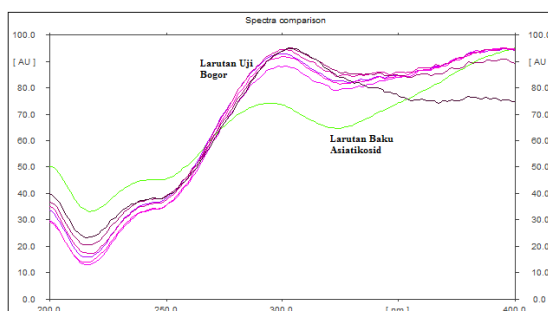
Tabel 1. Perbandingan Luas Area Asiaticosid Herba pegagan Bogor, Solo, Yogyakarta

No.	Sampel	Persentase Luas Area Rata-rata Asiaticosid
1	Herba pegagan Bogor	6,49 %
2	Herba Pegagan Solo	3,89 %
3	Herba pegagan Jogja	8,39 %

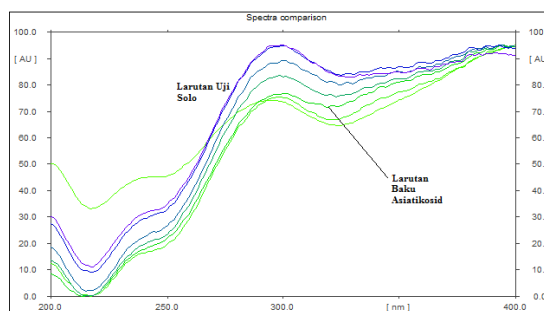
Hal ini berarti kandungan asiaticosid tertinggi dari adalah simplisia herba pegagan yang berasal dari daerah Yogyakarta. Sedangkan profil kromatogram ketiga daerah tersebut hampir sama, namun ada sedikit perbedaan dalam jumlah bercak dan intensitas warna bercak. Jumlah bercak dan intensitas warna bercak pada profil kromatogram simplisia yang berasal dari daerah Solo lebih banyak dan lebih jelas warnanya. Keragaman senyawa dan konsentrasi dari simplisia ini dapat dipengaruhi oleh beberapa hal, diantaranya adalah lingkungan tempat tumbuh, waktu panen, jenis tanah, tinggi tempat, curah hujan, intensitas cahaya dan pengolahan pasca panen [3]. Pada penelitian ini belum dianalisa data dari aspek budidaya dan lingkungan tumbuh simplisia yang digunakan.

Uji kesesuaian sistem dilakukan sebelum pelaksanaan validasi metode yang bertujuan untuk mengetahui apakah sistem/kondisi analisis yang digunakan sudah sesuai atau memenuhi persyaratan. Dari uji kesesuaian sistem yang dilakukan terhadap ketiga simplisia menunjukkan hasil untuk ketiga simplisia memenuhi kriteria keberterimaan, yaitu nilai RSD dari 6 ulangan sampel kurang dari 2%. Oleh karena hasil uji kesesuaian sistem memenuhi persyaratan, selanjutnya dilakukan validasi metode yang terdiri dari spesifisitas dan presisi.

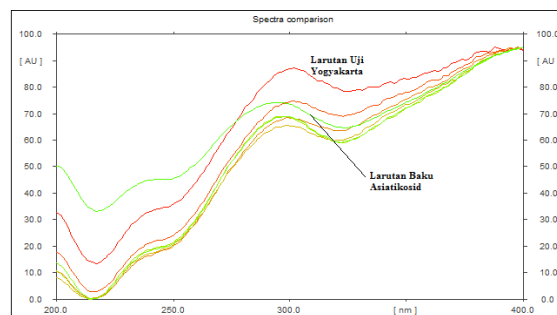
Hasil uji spesifisitas menunjukkan bahwa spektrum baku asiaticosid dan spektrum bercak yang di duga asiaticosid dari larutan uji untuk simplisia dari daerah Bogor, Solo dan Yogyakarta adalah sama (Gambar 3). Sehingga dapat disimpulkan bahwa bercak tersebut adalah benar asiaticosid dan memenuhi kriteria keberterimaan uji spesifisitas. Pengukuran spektrum dilakukan dengan menggunakan TLC scanner (Camag) pada panjang gelombang 506 nm, yaitu panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum untuk senyawa asiaticosid. Spektrum asiaticosid pada larutan baku dan larutan uji dapat dilihat pada gambar 3.



(A)



(B)



(C)

Gambar 3. Spektrum Larutan Baku Asiatikosid dan Larutan Uji (A) Bogor, (B) Solo, (C) Yogyakarta

Presisi antara dilakukan dengan melakukan pengujian pada 6 pengulangan sampel pada 2 plat yang berbeda. Kriteria keberterimaan adalah RSD dari 6 totalan dalam 1 plat $\leq 2\%$ serta RSD antar plat $\leq 5\%$. Hasil pengujian presisi/RSD untuk 6 totalan dalam 1 plat yang diuji memenuhi kriteria keberterimaan, yaitu RSD $\leq 2\%$. Sedangkan hasil uji presisi antara untuk plat yang berbeda juga memenuhi kriteria keberterimaan dengan nilai RSD $\leq 5\%$. Dari keseluruhan parameter validasi yang diuji pada penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa metode penentuan profil kromatogram/*fingerprint* herba pegagan valid.

KESIMPULAN

Herba pegagan tumbuh pada daerah yang berbeda di seluruh Indonesia dengan kandungan asiatikosid yang beragam sesuai daerah tumbuh. Selanjutnya, untuk membuktikan bahwa kandungan asiatikosid dari daerah Yogyakarta lebih tinggi dari daerah lainnya, disarankan perlu melakukan penelitian lebih lanjut dengan memperhatikan pengendalian kondisi faktor-faktor yang dapat mempengaruhi.

Berdasarkan hasil penelitian, validasi metode analisis untuk menentukan profil kromatogram dari herba pegagan adalah valid. Hasil menunjukkan bahwa spektrum asiatikosid pada larutan baku dan larutan uji memenuhi kriteria keberterimaan uji spesifisitas, begitu juga dengan uji presisi dan presisi antara. Metode ini dapat digunakan sebagai pedoman untuk menilai kebenaran dan kontrol kualitas dari bahan baku herba pegagan dalam sediaan obat tradisional.

DAFTAR PUSTAKA

1. James J and Dubery I. Identification and Quantification of Triterpenoid Centelloids in *Centella asiatica* (L.) Urban by Densitometric TLC. *Journal of Planar Chromatography* 24 (2011) 1, 82–87
2. Orhan, EI. *Centella asiatica* (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential. Article in Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Pubmed. Mei 2012
3. Pramono, S dan D. Ajiastuti. Standardisasi ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica*) (L.) Urban) berdasarkan kadar asiatikosida secara KLT-Densitometri. *Majalah Farmasi Indonesia* 15(3), 118-123, 2004
4. Yamunadevi M, Wesely EG, Johnson MA. A chromatographic study on the glycosides of *Aerva lanata* L. *Chinese J Natural Med.* 2011; 9: 210-214

5. Ali J, Ali Y, Sultana S, Baboota S, Faiyaz S. Development and validation of a stability-induced HPTLC method for analysis of antitubercular drugs. *Acta Chromatographica*. 2007;18:168e179
6. Menteri Kesehatan Republik Indonesia Farmakope Herbal Indonesia Edisi Pertama, Lampiran Keputusan Menteri Kesehatan No 261/Menkes/SK/IV/2009, 2009.