



Pemisahan, Isolasi, dan Identifikasi Senyawa Saponin dari Herba Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban)

Dewi, N. L. A.¹, Adnyani, L. P. S.¹, Pratama, R. B. R.¹, Yanti, N. N. D.¹, Manibuy, J. I.¹, Warditiani N. K.¹

¹Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana,
Bukit Jimbaran, Badung, 80361

Email: arysintadevi1@gmail.com

ABSTRAK

Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder seperti triterpenoid, steroid, dan saponin. Herba pegagan dimaserasi dengan etanol:akuades (70:30 v/v) menghasilkan rendemen sebesar 21,346%. Skrining fitokimia ekstrak menunjukkan hasil positif mengandung saponin. Fraksinasi dilakukan dengan kromatografi kolom lambat dan diperoleh 39 fraksi. KLT subfraksinasi dilakukan pada fraksi no. 4, 5, 8, 10 dengan nilai Rf sebesar 0,45; 0,45; 0,5; dan 0,5375. Dilanjutkan dengan KLT preparatif dengan eluen kloroform: metanol: air (65:25:4 v/v) menunjukkan adanya pita biru yang menunjukkan adanya kandungan saponin. KLT hasil subfraksinasi dilakukan dengan menggunakan eluen kloroform:metanol:akuades (65:25:4 v/v) didapatkan spot berwarna biru dengan nilai Rf sebesar 0,46. KLT Dua Dimensi dilakukan dengan menggunakan dua jenis eluen yaitu 6,9 mL kloroform, 2,7 mL metanol, 0,4 air mL dan 5,3 mL kloroform, 2,8 mL asam asetat glasial, 1,1 mL metanol dan 0,7 mL air. Spot hasil KLT dua dimensi berwarna biru dengan Rf 0,5 dan 0,71. Herba pegagan mengandung *asiatic acid* dan *madecassic acid*.

Kata kunci: *Centella asiatica* L. Urban, saponin, triterpenoid

ABSTRACT

Centella asiatica L. Urban contains triterpenoids, steroids, and saponins. *C. asiatica* L. Urban was macerated with ethanol: water (70:30 v/v) yield produced at 21,346%. Phytochemical screening tests showed that *C. asiatica* L. Urban extract contains saponins and triterpenoid. Fractionation was carried out by column chromatography and 39 fractions were obtained. TLC subfractionation was carried out only in fraction number 4, 5, 8, 10 there was a blue-purple fluorescence which Rf value were 0,45; 0,45; 0,5; 0,5375. Preparative TLC was then done carried out (chloroform: methanol: water (65: 25: 4 v/v/v)) the presence of a blue band showed saponins contents. The process then continued with TLC (chloroform: methanol: water (65: 25: 4 v/v/v)) showed blue spot which its Rf value was 0.46. Lastly, Two-dimensional TLC was carried out using two types of mobile phases which were 6,9 mL chloroform, 2,7 mL methanol, 0,4 mL aquadest and 5,3 mL chloroform, 2,8 mL glacial acetic acid, 1,1 mL methanol and 0,7 mL aquadest and gave blue-colored fluorescences spots which its Rf value were 0,5 and 0,71 respectively. *C. asiatica* L. Urban contains *asiatic acid* and *madecassic acid*.

Keywords: *Centella asiatica* L. Urban, saponin, triterpenoid



1. PENDAHULUAN

Pengembangan obat herbal terus dilakukan melalui pemanfaatan metabolit sekunder yang memiliki potensi besar untuk dikembangkan menjadi obat. Hal ini didukung juga dengan masyarakat yang lebih memilih mengonsumsi obat dari bahan alam karena efek samping yang ditimbulkan lebih rendah dibanding dengan obat sintesis (Sari, 2006). Salah satu tanaman Indonesia yang digunakan sebagai obat adalah pegagan.

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman yang sejak dulu digunakan sebagai obat kulit, meningkatkan ketahanan tubuh (panjang umur), membersihkan darah, dan memperbaiki gangguan pencernaan. Efek farmakologis dari pegagan diantaranya sebagai anti infeksi, anti racun, penurunan panas, peluruh air seni, anti lepra, anti sipilis, anti pikun, untuk membantu mengatasi stress serta dapat sebagai revitalitas tubuh dan otak otak yang lelah, untuk kesuburan wanita, serta sebagai anti pikun (Kristina dkk., 2009).

Pegagan mempunyai rasa manis dan bersifat sejuk. Kandungan bahan kimia pegagan yaitu asiaticosida, madecosida, brahmosida, tannin, resin, pektin, gula, vitamin B, garam mineral seperti kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi, fosfor, minyak atsiri, pektin dan asam amino. Konstituen utama yang terkandung di dalam daun pegagan adalah saponin asiaticosida (Kristina dkk., 2009).

Saponin merupakan kelompok senyawa glikosida dari triterpena dan sterol (Harborne, 1998). Karakteristik kelompok senyawa saponin adalah adanya aglikon steroid ataupun aglikon triterpenoid dan satu atau lebih gugus gula (Üstündağ and Mazza, 2007). Unsur utama dalam saponin triterpen dalam pegagan (*Centella asiatica*) adalah asiaticosida dan madecassosida. unsur saponin triterpen lain dalam pegagan (*Centella asiatica*) yaitu *asiaticoside*, *thankuniside*, *isothankuniside*, *madecassoside*, *brahmoside*, *brahmic acid*, *madasiatic acid*, *centelloside* (Soenanto, 2009).

Penelitian Rafamantanana *et.al.* (2009) menggunakan metode untuk mengidentifikasi

asiaticosida dengan HPLC-UV namun metode tersebut membutuhkan biaya yang besar dan menggunakan peralatan yang rumit. Maka dari itu dilakukan pemisahan, isolasi serta identifikasi untuk mendapatkan senyawa asiaticosida pada *Centella asiatica* dengan menggunakan metode maserasi pada tahap ekstraksi, fraksinasi dan subfraksinasi menggunakan metode Kromatografi Kolom Lambat dan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif, identifikasi dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis dengan pereaksi Liebermann-Burchard.

1. BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah herba pegagan diperoleh dari daerah Padangsambian Denpasar Barat Bali, methanol (Bratachem[®]), ethanol 96 % (Bratachem[®]), n-heksan (Bratachem[®]), asam asetat glasial, asam asetat anhidrat, akuades, anisaldehyd, H₂SO₄, HCl 2N, plat silika gel GF₂₅₄ (Merck[®]), bubuk silika gel 60 (Merck[®]), kloroform (Bratachem[®]).

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, alat penggiling (*blender*), toples kaca, cawan porselin, timbangan analitik (Adam AFP-360 L), oven, *chamber* (Camag), pipet kapiler, pinset, *cutter*, penangas air, termometer, lampu UV 254 nm dan 366 nm (CAMAG), dan kolom kromatografi.

Metode

Preparasi Sampel

Sebanyak 320 gram simpilisa pegagan yang dibeli dari Supermarket Tiara Dewata Denpasar Bali, dibersihkan dari pengotornya terlebih dahulu kemudian diserbukan dengan menggunakan *blender*. Ditimbang serbuk daun pegagan sebanyak 300 g.

Ekstraksi

Dilakukan deffating 250,014 g dengan menggunakan pelarut n-heksan sebanyak 850 ml kemudian dikeringkan hingga tidak tercium bau dari pelarut n-heksan. Selanjutnya dimaserasi pelarut etanol 96% : air (70 : 30) sebanyak 1500 mL selama



tiga hari terlindung dari cahaya dan wadah tertutup dengan sesekali pengadukan. Setelah tiga hari, ampas dan endapan dipisah dari filtratnya. Ampas dan endapan diremaserasi selama dua hari dengan pelarut etanol 96% : air 1100 mL. Filtrat yang didapat dipekatkan pada suhu 40°C. Ekstrak kental yang diperoleh ditentukan rendemennya (Biradar and Rachetti, 2013).

Skrining Fitokimia

a. Uji untuk saponin

Ditimbang ekstrak kental sebanyak 15 mg lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan akuades sebanyak 10 mL kemudian tabung reaksi dikocok vertikal selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 detik. Pembentukan busa setinggi 1–10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit, menunjukkan adanya saponin. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N, busa tidak hilang menunjukkan positif saponin.

b. Uji Liebermann-Burchard

Ditimbang ekstrak kental sebanyak 15 mg lalu dilarutkan dengan kloroform. Ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat kemudian ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding. Hasil positif ditunjukkan apabila terbentuk cincin berwarna merah-keunguan pada batas lapisan untuk triterpenoid dan hijau untuk steroid.

Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Lambat

Dibuat bubuk *silica gel* (fase diam) dengan menimbang 50 g *silica gel* dan ditambahkan dengan eluen

(kloroform:metanol:air dengan perbandingan 30:10:1 v/v/v) secukupnya sambil diaduk hingga menjadi bubuk. Bubur *silica gel* yang telah dibuat dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang telah dialasi dengan *glass wool* melalui dinding kolom agar tidak terbentuk gelembung. Bubur *silica gel* dimasukkan hingga ketinggian kurang lebih 25 cm dan selanjutnya didiamkan selama kurang lebih 24 jam untuk memadatkan fase diam. Ekstrak kemudian dielusi dengan menggunakan fase gerak

kloroform:metanol:air dengan perbandingan 30:10:1 v/v/v sebanyak 50 ml. Fraksi yang diperoleh kemudian disimpan dalam vial dan dibungkus dengan aluminium foil dan plastik ikan. Penentuan fraksi yang mengandung saponin ditentukan dengan menggunakan metode KLT.

KLT Hasil Fraksinasi

Analisis KLT dilakukan terhadap fraksi hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom lambat. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak adalah kloroform : methanol : air (65:25:4 v/v/v) (Harwoko *et al*, 2014). Deteksi spot dilakukan dengan UV 366 nm yang sebelumnya disemprot dengan reagen anisaldehyd asam sulfat. Plat Silika Gel GF₂₅₄ dipotong dengan ukuran 10 x 10 cm. kemudian diaktivasi pada suhu 110°C selama 30 menit. Fase gerak dibuat sebanyak 10 mL. Penyiapan pereaksi anisaldehyd asam sulfat.

Setiap fraksi ditotolkan pada plat sebanyak 4 µL. Plat dielusi sampai jarak 1 cm dari batas atas plat. Selanjutnya dilakukan penyemprotan dengan menggunakan anisaldehyd asam sulfat dan dipanaskan pada suhu 110°C selama 10 menit. Anisaldehyd asam sulfat akan memberikan warna ungu pada sinar tampak. Glikosida saponin tanpa perlakuan kimia (pereaksi semprot) di bawah sinar UV₂₅₄ nm tidak terjadi pemataman bercak dan di bawah sinar UV₃₆₅ nm bercak tidak berfluorosensi (Wardhani dan Sulistyani, 2012). Rf Asiatikosida, *Madecassoside*, *Asiatic acid*, dan *Madecassic acid* sebesar 0,24; 0,16; 0,7; dan 0,8 secara berturut-turut (Harwoko *et al*, 2014).

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Subfraksi kromatografi kolom yang telah diuapkan dilarutkan dengan 0,5 mL metanol sehingga diperoleh ekstrak yang tidak terlalu pekat. Fase Diam yang digunakan plat Silika Gel GF₂₅₄ dengan ukuran 10 cm x 10 cm dan fase gerak adalah kloroform : metanol : air (65:25:4 v/v).

Pembuatan pereaksi Liebermann-Burchard untuk penyemprot, Larutan penyemprot ini harus dibuat baru (Harborne, 1998).



Larutan sampel ditorehkan pada masing-masing plat dalam bentuk pita dengan bantuan pipet. Selanjutnya dieluasi dengan 10 mL fase gerak yaitu kloroform : metanol : air (65:25:4 v/v) (Harwoko et al, 2014). Plat diamati dibawah sinar UV₂₅₄ nm dan UV₃₆₆ nm, kemudian bagian pinggir kiri dan kanan plat KLT preparatif disemprot dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang terbuat dari 50 bagian kloroform dicampur dengan 20 bagian asam asetat anhidrat dan 1 bagian asam sulfat pekat. Plat yang telah disemprot dipanaskan pada suhu 85-90°C selama 15 menit. Tandai areal yang akan dikerok pada plat yang tidak terkena pereaksi Liebermann-Burchard. Plat KLTP dikerok menggunakan spatula dan hasil kerokan kemudian diekstraksi dengan metanol, kemudian disaring. Rf Asiatikosida, *Madecassoside*, *Asiatic acid*, dan *Madecassic acid* sebesar 0,24; 0,16; 0,7; dan 0,8 secara berturut-turut (Harwoko et al, 2014).

KLT Hasil Subfraksinasi

Dipilih subfraksi yang memberikan warna ungu pada KLTP, ekstrak etanol dan fraksi saponin triterpenoid hasil kromatografi kolom lambat. Masing-masing ekstrak tersebut dilarutkan dengan 0,5 mL metanol sehingga diperoleh ekstrak yang tidak terlalu pekat. Plat Al Silika Gel GF₂₅₄ dipotong dengan ukuran 2 cm x 10 cm, kemudian diaktivasi pada suhu 110°C selama 15 menit.

Fase gerak fase gerak yaitu kloroform : metanol : air (65:25:4 v/v) dibuat sebanyak 10 mL.

Larutan uji ditotolkan pada plat sebanyak 6 µL. Plat diletakkan pada *chamber* yang telah dijenuhkan sebelumnya. Plat dieluasi sampai jarak 1 cm dari batas atas plat. Plat diangin-anginkan selama 10 menit untuk menguapkan fase gerak pada yang masih tersisa plat. Dilihat di bawah sinar UV 366 dan dicatat nilai Rf. Hasil positif mengandung saponin adalah terdapat spot warna ungu. Subfraksi yang memiliki bercak yang sama digabungkan, dan yang positif mengandung saponin dipilih untuk dilakukan proses pemisahan

selanjutnya. Rf Asiatikosida, *Madecassoside*, *Asiatic acid*, dan *Madecassic acid* sebesar 0,24; 0,16; 0,7; dan 0,8 secara berturut-turut (Harwoko et al, 2014).

Identifikasi Isolat dengan KLT Dua Dimensi

Disiapkan plat KLT silika gel 60 F254 dengan ukuran 10 x 10 cm, plat dicuci dengan metanol dan di aktivasi dalam oven pada suhu 110°C Selama 30 menit.

Fase gerak pertama dibuat sebanyak 10 mL. dipipet sebanyak 6,9 mL kloroform, 2,7 mL metanol, dan 0,4 mL air. Pelarut dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian digojog hingga homogen (Harwoko et al., 2014). Fase gerak kedua dibuat sebanyak 10 mL. dipipet sebanyak 5,3 mL kloroform, 2,8 mL asam asetat glasial, 1,1 mL metanol, dan 0,7 mL air. Pelarut dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian digojog hingga homogen (James and Dubery, 2011).

Isolat hasil KLTP dilarutkan dengan metanol. Diambil sebanyak 10 µL kemudian ditotolkan pada plat KLT. Plat dieluasi dengan eluen dengan tingkat kepolaran dan arah yang berbeda. Setelah dieluasi plat diangin anginkan selama 10 menit untuk menguapkan fase gerak yang masih tersisa pada plat. Kemudian hasil elusi diamati menggunakan penampak noda sinar ultra violet 254nm. Hasil pengamatan yang menunjukkan satu bercak atau satu spot tunggal menandakan senyawa isolat yang diperoleh merupakan senyawa kimia tunggal atau murni (Harborne, 1984). Rf Asiatikosida, *Madecassoside*, *Asiatic acid*, dan *Madecassic acid* sebesar 0,24; 0,16; 0,7; dan 0,8 secara berturut-turut untuk fase gerak pertama dan 0,55; 0,45; 0,94; dan 0,97 secara berturut-turut untuk fase gerak kedua (Harwoko et al, 2014; James and Dubery, 2011).

2. HASIL Preparasi Ekstrak

Rendemen ekstrak etanol:air herba pegagan (*Centella asiatica* L. Urban.) yang didapat sebesar 21,346%.



Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban.)

Ekstrak etanol:air herba pegagan (*Centella asiatica* L. Urban.) mengandung senyawa golongan triterpenoid dan saponin.

Fraksinasi Ekstrak

Fraksinasi ekstrak dilakukan dengan kromatografi kolom lambat dengan menggunakan fase gerak kloroform : metanol : akuades (30:10:1) v/v/v dan diperoleh 39 fraksi.

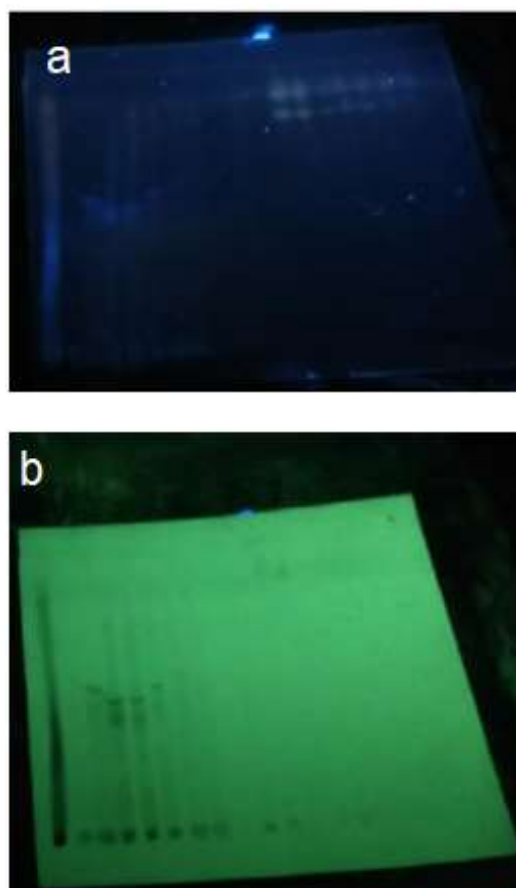
KLT Hasil Fraksinasi

Tabel 1. Pemilihan 19 fraksi dari 39 fraksi yang diperoleh dan 1 ekstrak pada plat KLT.

Totolan	Ekstrak/Fraksi
1	Ekstrak
2	Fraksi 1
3	Fraksi 4
4	Fraksi 5
5	Fraksi 8
6	Fraksi 10
7	Fraksi 11
8	Fraksi 12
9	Fraksi 13
10	Fraksi 15
11	Fraksi 17
12	Fraksi 23
13	Fraksi 26
14	Fraksi 27
15	Fraksi 29
16	Fraksi 33
17	Fraksi 34
18	Fraksi 36
19	Fraksi 37
20	Fraksi 38

Tabel 2. Nilai Rf masing-masing spot setelah disemprot dengan Pereaksi Semprot Anisaldehyd-Asam Sulfat dan diamati dibawah UV 254nm.

Fraksi/Spot	Rf	Warna Spot	
4	0,45	Pemadaman bercak	
5	0,45	Pemadaman bercak	
8	0,5	Pemadaman bercak	
10	0,5375	Pemadaman bercak	
23	I	0,79375	Pemadaman bercak
	II	0,875	Pemadaman bercak



Gambar 1. a. Plat KLT dibawah UV 366nm; b. Plat KLT dibawah UV 254nm setelah disemprot dengan Pereaksi Semprot Anisaldehyd-Asam Sulfat. Fluoresensi berwarna biru-ungu menunjukkan adanya kandungan saponin.



KLT Preparatif



Gambar 2. Hasil KLTP. Pita biru menunjukkan adanya kandungan saponin yang selanjutnya akan dikerok untuk proses identifikasi selanjutnya.

KLT Hasil Subfraksinasi



Gambar 3. Plat KLT Hasil Subfraksinasi. Fluoresensi berwarna biru-ungu menunjukkan adanya kandungan saponin.

Tabel 3. Nilai Rf dari spot KLT Hasil Subfraksinasi setelah disemprot Pereaksi Semprot Anisaldehyd-Asam Sulfat.

Fraksi/Spot	Rf	Warna Spot
I	0,46	Biru

KLT Dua Dimensi

Tabel 4. Nilai Rf dari masing-masing spot dalam dua fase gerak yang berbeda pada KLT Dua Dimensi.

Elusi	Rf	Warna Spot
I	0,5	Biru
II	0,71	Biru

3. PEMBAHASAN

Proses ekstraksi diawali dengan proses *defatting* dengan menggunakan pelarut n-heksan. *Defatting* bertujuan untuk meng-hilangkan senyawa-senyawa pengganggu seperti klorofil dan lipid dari sampel. Sampel diekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi merupakan proses ekstraksi yang dilakukan dengan pelarut pada suhu kamar dengan sesekali pengadukan di tempat yang terlindung sinar matahari (Sutrisna,2016).

Skrining fitokimia adalah uji konfirmasi awal yang bertujuan untuk membuktikan ada tidaknya senyawa kimia tertentu dalam tumbuhan tersebut yang dapat dikaitkan dengan aktivitas biologinya (Kristanti dkk, 2008). Skrining fitokimia yang dilakukan untuk golongan senyawa saponin adalah Uji Liebermann-Burchard dan Uji Pembentukan Busa. Uji Liebermann-Burchard dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat kandungan triterpenoid atau steroid di dalam ekstrak. Kondensasi atau pelepasan H₂O dan penggabungan dengan karbokation merupakan prinsip dari Uji Liebermann-Burchard. Reaksi ini diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan asam asetat anhidrida. Gugus asetil yang merupakan gugus pergi yang baik akan lepas, sehingga terbentuk ikatan rangkap. Selanjutnya terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya, mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa



ini mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik, diikuti pelepasan hidrogen. Kemudian gugus hidrogen beserta elektronnya dilepas, akibatnya senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan munculnya warna merah-ungu (Siadi, 2012).

Uji Pembentukan Busa menunjukkan hasil yang positif apabila terbentuk busa yang stabil setelah pengocokan dan penambahan HCl 2N. Penambahan HCl 2N bertujuan untuk menambah kepolaran sehingga gugus hidrofil akan berikatan lebih stabil dan buih yang terbentuk menjadi stabil (Simaremare, 2014).

Fraksinasi adalah proses pemisahan untuk memisahkan senyawa - senyawa target ke dalam fraksi yang lebih sederhana. Pemastian keberadaan saponin dalam masing-masing fraksi, dilakukan identifikasi dengan menggunakan KLT. Sebelum penotolan fraksi, plat dicuci terlebih dahulu. Pencucian plat dilakukan dengan menggunakan metanol dan selanjutnya diaktivasi dengan menggunakan oven pada suhu 110°C selama 30 menit. Aktivasi plat bertujuan untuk menghilangkan pelarut sisa pencucian dan mengaktifkan gugus silanol dan siloksan dari plat.

Selama proses aktivasi plat, dilakukan penjenjutan *chamber* menggunakan fase gerak. Penjenjutan *chamber* bertujuan untuk menyamaratakan tekanan uap dari fase gerak yang digunakan sehingga pemisahan dapat berjalan dengan baik (Kusmardiyani dan Nawawi, 1992). Fraksi yang didapatkan dipilih sejumlah 19 fraksi yang dapat mewakili fraksi lainnya dengan melihat kemiripan warna.

Deteksi spot yang dihasilkan dilakukan dengan menggunakan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat. Pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat merupakan pereaksi yang bersifat destruktif karena pereaksi ini memecah senyawa pada plat KLT supaya dapat diamati oleh sinar tampak (Alegantina dkk., 2010). Dari hasil yang diperoleh,

fraksi yang diduga mengandung saponin adalah fraksi 1, 4, 5, 8, dan 10 yang menghasilkan spot berwarna biru dengan masing-masing nilai Rf 0,4875; 0,45; 0,45; 0,5; dan 0,5375 setelah disemprot dengan anisaldehyd-asam sulfat. Saponin akan memberikan warna coklat-ungu setelah disemprot dengan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat pada UV 366 nm.

Pemurnian dilakukan secara kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak kloroform:methanol:air (65:25:4 v/v). Diperoleh 2 pita setelah diamati dibawah sinar UV 254nm dan 366 nm dimana pita pertama berwarna biru gelap dan pita kedua berwarna biru muda terang. Pita yang dihasilkan tidak lurus, melainkan sangat bergelombang. Hal ini mungkin disebabkan oleh pengaruh fase gerak, ukuran sampel, sifat analit dan adanya kontaminan. Pada identifikasi plat KLT di UV 366 nm bagian pinggir plat tidak menunjukkan adanya pita yang berwarna. Hal ini kemungkinan disebabkan karena proses pemanasan yang dilakukan tidak optimal. Kedua pita tersebut kemudian dikerok untuk KLT Hasil Subfraksinasi. KLT hasil subfraksinasi dilakukan untuk memastikan dari fraksi KLT. Hasil yang diperoleh berasal dari pita pertama dimana diperoleh spot berwarna biru dan memiliki nilai Rf 0,46. Adanya spot berwarna biru-ungu mencerminkan adanya kandungan saponin (Harwoko *et al.*, 2014)

KLT dua dimensi merupakan KLT yang menggunakan 2 eluen yang memiliki tingkat kepolaran berbeda. Fase gerak pertama menggunakan campuran 6,9 mL kloroform, 2,7 mL methanol, dan 0,4 mL air. Fase gerak kedua menggunakan campuran 5,3 mL kloroform, 2,8 mL asam asetat glasial, 1,1 ml metanol dan 0,7 mL air (Harwoko *et al.*, 2014; James and Dubery, 2011). Sampel yang ditotol merupakan hasil dari KLT, yang ditotolkan pada plat KLT hingga spot terlihat gelap jika diamati dibawah sinar UV. Spot hasil KLT berwarna biru dengan Rf elusi pertama yaitu



0,5 dimana mendekati dari nilai Rf *madecassic acid* karena menurut James and Dubery (2011) *madecassic acid* memiliki nilai Rf sebesar 0,55. Nilai Rf pada elusi kedua diperoleh 0,71 dimana dimana mendekati dari nilai Rf *asiatic acid* karena menurut Harwoko *et al.*, (2011) *asiatic acid* memiliki nilai Rf sebesar 0,70.

4. KESIMPULAN

Herba pegagan mengandung *madecassic acid* dan *asiatic acid*.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua rekan serta pihak yang telah membantu dan memberi saran pada penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

Alegantina, S., A. Isnawati, dan I. Rooslamati. 2010. Isolasi dan Identifikasi Artemisinin dari Herba *Artemisia annua* L. *Buletin Penelitian Kesehatan*. Vol. 38 (3) : 159-168.

Biradar, S.R. dan B.D. Rachetti. 2013. Extraction of Some Secondary Metabolites & Thin Layer Chromatography from Different Parts of *Centella asiatica* L. (URB). *American Journal of Life Sciences*. Vol. 1(6): 243-247.

Harborne, J. B. 1998. *Phytochemical Methods*. Third Edition. United Kingdom : Chapman & Hall.

Harwoko, S. Pramono, and A. E. Nugroho. 2014. Triterpenoid-rich Fraction of *Centella asiatica* Leaves and *in vitro* Antihypertensive Activity. *International Food Research Journal*. Vol. 21 (1) : 149-154.

James, J., and I. Dubery. 2011. Identification and Quantification of Triterpenoid Centelloids in *Centella asiatica* (L.) Urban by Densitometric TLC. *Journal of Planar Chromatography*. Vol. 24 (1) : 82-87.

Kristanti, A. N., N. S. Aminah., M. Tanjung, dan B. Kurniadi. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Jurusan Kimia-Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga.

Kristina, N. N., E. D. Kusumah, P. K. Lailani. 2009. Analisis Fitokimia dan Penampilan Polapita Protein Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Hasil Konservasi *in vitro*. *Bul. Littro*. Vol. 20 (1) : 11-20.

Kusmardiyani, S. dan A. Nawawi. 1992. *Kimia Bahan Alam*. Jakarta: Universitas Bidang Ilmu Hayati.

Rafamantanana, M.H., E. Rozet, G.E. Raelison, K. Cheuk, S.U. Ratsimamanga, Ph. Hubert, J. Quetin-Leclercq. 2009. An Improved HPLC-UV Method for The Simultaneous Quantification Of Triterpenic Glycosides And Aglycones In Leaves Of *Centella asiatica* (L.) Urb (APIACEAE). *Journal Of Chromatography B*. Vol. 877 (23) : 2396-2402.

Sari, L. O. R. K. 2006. Pemanfaatan Obat Tradisional Dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol. 3 (1) : 01-07.

Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar *Jatropha curcas* sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA*. Vol. 35 (1): 77-83.

Simaremare, E. S. 2014. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd). *PHARMACY*. Vol. 11 (1) : 98-107.

Soenanto, H. 2009. *100 Resep Sembuhkan Hipertensi, Obesitas Dan Asam Urat*. Jakarta: PT Alex Media Kopuntindo.

Sutrisna, E. M. 2016. *Herbal Medicine: Suatu Tinjauan Farmakologis*. Surakarta: Muhammadiyah University Press.



Üstündağ, Ö. G. and G. Mazza. 2007. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 47 (3) : 231-258.

Wardhani, L. K. dan N. Sulistyani. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat

Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella flexneri* beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. Vol. 2 (1) : 1-16.