

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN POTENSI OBAT ORAL SENYAWA
NANOPARTIKEL EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERSALUT
KITOSAN BERDASARKAN HASIL ANALISIS LCMS**

SKRIPSI

Oleh:

REALSYAH RAMADHAN

NIM: 15620122



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2019

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN POTENSI OBAT ORAL SENYAWA
NANOPARTIKEL EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERSALUT
KITOSAN SECARA *In Silico* BERDASARKAN HASIL ANALISIS LCMS**

SKRIPSI

Oleh:

REALSYAH RAMADHAN

NIM: 15620122

Ditujukan Kepada :

Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

**Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2019

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN POTENSI OBAT ORAL SENYAWA
NANOPARTIKEL EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERSALUT
KITOSAN SECARA *In Silico* BERDASARKAN HASIL ANALISIS LCMS**

SKRIPSI

Oleh:

REALSYAH RAMADHAN

NIM: 15620122

Telah Diperiksa dan Disetujui :

Tanggal 10 Desember 2016

Dosen Pembimbing I



Dr. drh. Hj. Bayyinatul M., M. Si

NIP. 19710919 200003 2 001

Dosen Pembimbing II



Mujahidin Ahmad, M. Sc

NIP. 19860512 201903 1 002

Mengetahui

Ketua Jurusan



Romaidi, M.Si, D.Sc

NIP. 198102012009011019

canned with
amScanner

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN POTENSI OBAT ORAL SENYAWA
NANOPARTIKEL EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERSALUT
KITOSAN SECARA *In Silico* BERDASARKAN HASIL ANALISIS LCMS
SKRIPSI**

Oleh:

REALSYAH RAMADHAN

NIM: 15620122

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi Dan Dinyatakan
Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana
(S.Si)**

Tanggal : 9 Desember 2016

Susunan Dewan Penguji

Tanda Tangan

Penguji Utama:

Dr. Kiptiyah, M. Si

NIP 19731005 200212 2 003

()

Ketua Penguji :

Kholifah Holil, M.Si

NIP 19751106 200912 2 002

()

Sekretaris Penguji:

Dr. Drh. Hj. Bayyinatul M., M.Si

NIP. 19710919 200003 2 001

()

Anggota Penguji:

Mujahidin Ahmad, M.sc

NIP. 19860512 201903 1 002

()

Mengesahkan,

Ketua Jurusan Biologi



Donaidi, M.Si, D.Sc

NIP. 198102012009011019

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah rabbil ‘alamin...

Tiada kata yang mampu menggambarkan kebahagiaanku saat ini, saya berterima kasih kepada Allah Subhanahu wa ta'ala yang telah memberikan kemudahan dari saya sehingga mampu mengerjakan skripsi ini sampai selesai. Skripsi ini saya persembahkan kepada orang-orang yang berjasa dalam hidup saya yang tanpa mereka saya tidak mungkin dapat melangkah sejauh ini. Terima kasih kepada kedua orang tua saya yang telah memberikan support baik berupa materi, maupun doa. Semoga setelah lulus ini saya mampu membahagiakan dan membalas jasa kalian. Kedua orang tuaku, serta Keluarga besar yang lain. Terimakasih untuk teman-teman Biologi-D semua yang telah memberikan banyak pelajaran hidup serta manisnya perjuangan. Terima kasih untuk Ibu Bayyin selaku dosen pembimbing yang jasa beliau yang sangat besar kepada saya. Terimakasih juga untuk Bapak Suyono selaku dosen wali yang telah memberikan wejangan kepada saya dari semester 1 hingga saya mampu menyelesaikan perkuliahan saat ini. Untuk teman-teman Genetist semoga selalu diberikan kesehatan demi menggapai cita-cita yang diimpikan hingga memperoleh kesuksesan di masa depan.

Terima kasih sebesar-besarnya saya haturkan kepada :

1. Pak Sohieb dan Ibu Suryanah, Kedua orang tua saya yang selalu memberikan mendoakan dan memberikan motivasi demi masa depan.
2. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah., M.Si. sebagai dosen pembimbing skripsi saya. Terimakasih atas kesabaran serta keikhlasan telah memberikan bimbingan, pengarahan serta dorongan dalam proses menyusun skripsi ini.
3. Dr. Kiptiyah. M.Si, Kholifah Holil M.Si, Mujahidin Ahmad, M.sc dan Ustad Basyar yang telah membimbing dan memberikan arahan berdasarkan ilmunya kepada saya dengan sangat sabar.
4. Saudara dan saudari saya Irva Fitriah, Idha Erliah, Ismarti, Umi Laila, Dian Al-Akbar dan Arief Yunius yang saya cintai, yang selalu mendukung serta mendoakan saya agar dapat menyelesaikan proses belajar diperkuliahan ini.
5. Teman-teman pejuang Nanopartikel : Masduki, Tria, Malifah , Tri, Meilinda, hibah, Mbak sasa dan Zizi, yang telah berjuang bersama dari pagi hingga malam demi menyelesaikan proyek penelitian ini.
6. Teman-teman Kelas D serta teman-teman seangkatan GENETIST 2015 yang selalu menemani dan mendukung saya mulai dari semester 1 hingga selesainya perkuliahan saya saat ini.

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Realsyah Ramadhan
NIM : 15620122
Jurusan : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Potensi Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Dari Nanopartikel Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) Tersulut Kitosan Menggunakan Metode LCMS dan DPPH

Meyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan saya atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 22 Desember 2019
Saya Membuat Pernyataan



Realsyah Ramadhan
NIM : 15620122

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi yang berjudul “Potensi Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Dari Nanopartikel Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) Tersulut Kitosan Menggunakan Metode LCMS dan DPPH” ini tidak dipublikasikan. Akan tetapi akses terbuka dan dapat digunakan untuk umum dengan ketentuan hak Cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



Aktivitas Antioksidan dan Potensi Obat Oral Senyawa Nanopartikel Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) Tersalut Kitosan Secara *In Silico* Berdasarkan Hasil Analisis LCMS.

Realsyah Ramadhan, Bayyinatul Muchtaromah dan Mujahidin Ahmad

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi obat secara oral dari hasil LCMS dan aktivitas antioksidan yang terdapat dalam nanopartikel ekstrak pegagan dengan penyalut kitosan. Metode penelitian ini dilakukan dengan cara eksploratif kuantitatif. Penelitian ini diawali dengan ekstraksi pegagan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian diproses kembali menjadi nanopartikel dengan metode gelasi ionic. Ekstrak (EP) dan nanopartikel (NEP) yang terbentuk dilakukan uji fitokimia menggunakan metode LCMS (*Liquid Chromatografi-Mass Spectrofotometri*) untuk mengetahui kandungan metabolit sekundernya serta potensi sebagai obat menggunakan pendekatan Lipinski menggunakan SwissADME. Kemudian dilakukan pula uji aktivitas antioksidan untuk mengetahui potensi senyawa metabolit sekunder tersebut dalam menangkal radikal bebas. Hasil LCMS menunjukkan 50 jenis senyawa aktif yang terkandung dalam EP dan 43 jenis senyawa aktif dalam NEP, dengan 10 jenis senyawa aktif yaitu asam askorbat, myristicin, asam ferulic, asam asiatic, asam madiasitik, centellasapogenol A, asam isothankunik, asam madekasik, brahmoside dan asam terminolik yang berpotensi sebagai obat oral berdasarkan uji Lipinski. Adapun aktivitas antioksidan pada kedua sampel tersebut ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ sebesar 44,67 pada NEP dan 56,57 pada EP.

Kata Kunci: *Screening* Fitokimia, gelasi ionik, nanopartikel, pegagan, antioksidan, Lipinski

**Antioxidant Activity and Potentials of Oral Drug From Nanoparticles
Extract of Pegagan (*Centella asiatica*) Coated in Chitosan by *in Silico*
Based on LCMS Analysis Results**

Realsyah Ramadhan, Bayyinatul Muchtaromah, and Mujahidin Ahmad

ABSTRACT

This research begins with extraction of gotu kola using maceration method with 70% ethanol solvent. The concentrated extract obtained then processed into nanoparticles by the ionic gelation method. The extract (EP) and nanoparticles (NEP) were subjected to phytochemical tests using the LCMS (Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometry) method to determine the content of secondary metabolites. Afterwards, doing antioxidant activity test to find out the potential of these secondary metabolites in counteracting free radicals. The result from phytochemical test showed that there are 50 types of active compounds contained in EP and 43 types of active compounds in NEP, with 10 types of active compounds that is ascorbis acid, myristicin, ferulic acid, Asiatic acid, madiasitic acid, centellasapogenol A, isothankunic acid, madecassic acid, brahmoside and terminolic acid that has potential as oral drugs based on the Lipinski test. The antioxidant activity in both samples was indicated by IC₅₀ with 44.67 of NEP and 56.57 of EP.

Keyword: Phytochemical, antioxidant, Gotu kola, nanoparticles, ionic gelation

نشاط المضاد للأكسدة وامكان الداء الفموي لمركب النانوي لاستخراج فيكاكان (*Centella asiatica*) المعلق

بكيوسان خلال سيليكو (*In Silico*) بناء على نتائج تحليل LCMS

ريلشه رمضان، بينة المخترمة ومجاهدين أحمد

ملخص البحث

يهدف هذا البحث لان يحدد الإمكان الطب الفموي من نتائج LCMS ونشاط مضاد الأكسدة الموجودة في النانوي لاستخراج فيكاكان مع تغليق كيتوسان. وقد قام هذا البحث عن طريق الأسلوب الاستكشافية الكمية. بدأ هذا البحث باستخراج فيكاكان باستخدام طريقة النقعة مع مذيب إيثانول بنسبة 70 ٪. علاج استخراج المركز مرة أخرى إلى النانوي بواسطة طريقة الجيل الأيونية. تعرض الاستخراج (EP) و النانوي (NEP) التي تتكون لاختبارات كيميائية نباتية باستخدام طريقة LCMS (*Liquid* ليغينسكي باستخدام SwissADME وقيم اختبار نشاط مضاد الأكسدة أيضاً لتحديد إمكان هذه المستقبلات الثانوية في درء الجذور الحرة. دلت نتائج LCMS 50 انواع من المركبات النشطة الموجودة في EP و 43 انواع من المركبات النشطة في NEP ، مع 10 أنواع من المركبات النشطة هي حمض الأسكوربيك ، وميريسيسين ، وحمض الفيرليك ، وحمض الأستيك ، وحمض المادياسيتك ، وحمض السينتلاسابوغنول أ ، وحمض الإيزوتانكونيك ، وحمض الميدكاسيك ، وبراموسيد و حمض التيرمنوليك التي تحتل أن تكون داء الفم بناء على اختبار ليغينسكي. دل نشاط مضاد الأكسدة في العينتين بقيم IC₅₀ بقيمة 44.67 للنانوي (NEP) و 56.57 للاستخراج (EP)

الكلمات الرئيسية: الفحص الكيميائي النباتي، الجيل الأيونية، النانوي، فيكاكان، مضاد الأكسدة ، ليغينسكي

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah Subhanahu wa ta'ala, karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan studi di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, sekaligus menyelesaikan tugas akhir/skripsi ini dengan baik.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- 1) Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 2) Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 3) Bapak Romaidi, M.Si, D.Sc, selaku Ketua Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- 4) Ibu Dr. drh, Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku pembimbing skripsi yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan kami serta memberikan motivasi demi terselesainya skripsi ini.
- 5) Bapak Mujahidin Ahmad, M.Sc selaku pembimbing agama serta Ibu Dr. Kiptiyah, M.Si dan Ibu Kholifah Holil, M.Si selaku penguji yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan kami demi terselesainya skripsi ini.
- 6) Ayah, Ibu dan Saudara/i penulis tercinta yang telah memberikan dukungan moril maupun materiil dan selalu memberikan motivasi demi kelancaran penyusunan skripsi ini.
- 7) Segenap sivitas akademika Jurusan Biologi, seluruh dosen, staf administrasi dan laboran, terima kasih untuk segala bantuan hingga skripsi ini terselesaikan.
- 8) Teman-teman Biologi angkatan 2015 yang telah memberi semangat dan berbagai bantuan.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
PEDOMAN PENGGUUNAAN SKRIPSI.....	vi
ABSTRAK	vii
ABSTACT	viii
ملخص البحث	ix
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.4 Manfaat Penelitian	8
1.5 Batasan Masalah	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pegagan	10
1. Klasifikasi Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	10
2. Kandungan Pegagan.....	12
3. Manfaat Pegagan.....	13
4. Tumbuhan dalam Al-Qur'an.....	16
2.2 Sintesis Nanopartikel Menggunakan Metode Gelasi Ionik	17
2.3 Analisis Senyawa Aktif Menggunakan Metode LCMS.....	22
2.4. Bioinformatika	24
2.4.1. PubChem Compound	24
2.4.2. SwissADME	25
2.4 Antioksidan	26
2.4.1 Sumber-Sumber Antioksidan.....	28
2.4.2 Uji Antioksidan Menggunakan DPPH.....	28
2.5 Spektrofotometer UV-VIS	31
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Rancangan Penelitian	33
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	33
3.3. Variabel Penelitian	33
3.4. Alat dan Bahan.....	34
3.5. Prosedur Penelitian	34
3.5.1. Ekstraksi Pegagan	34
3.5.2. Pembuatan Nanopartikel Pegagan	35

3.5.3. Uji Kualitatif Senyawa Aktif Menggunakan LCMS	35
3.5.3.1. Pengenceran Sampel	35
3.5.3.2. Presipitasi protein	36
3.5.3.3. Pemurnian Dengan SPE.....	36
3.5.3.4. Persiapan Larutan	36
3.5.3.5. Operasional LCMS	37
3.5.4. Analisis Potensi Senyawa Obat Oral Secara In Silico Berdasarkan Pendekatan Lipinski.....	37
3.5.5 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH	38
3.5.4.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM	38
3.5.4.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimal	38
3.5.4.3 Pembuatan Larutan Blanko	38
3.5.3.4 Pembuatan Larutan Pembanding.....	38
3.5.4.5 Penentuan Persen Inhibisi.....	39
3.6. Analisis Data	39
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Analisis Senyawa Fitokimia Menggunakan LCMS.....	41
4.2 Potensi Obat Oral Senyawa Pegagan Berdasarkan Pendekatan Lipinski	47
4.3 Analisis Aktivitas Antioksidan	57
4.2.1 Analisis kualitatif aktivitas antioksidan	57
4.2.2 Analisis kuantitatif aktivitas antioksidan	59
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	64
5.2 Saran	64
DAFTAR PUSTAKA	66
LAMPIRAN-LAMPIRAN	79

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Senyawa Aktif Yang Terkandung Dalam Pegagan.....	42
4.2. Potensi dan Bioavailabilitas Obat Senyawa Pegagan	49
4.3. Nilai absorbansi, persen penghambatan dan IC50 NEP.....	60
4.4. Nilai absorbansi, persen penghambatan dan IC50 EP	61
5.5. Nilai absorbansi, persen penghambatan dan IC50 Asam Askorbat.	61



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Tumbuhan Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	10
2.2. Tampilan Senyawa Asam Asiatik pada PubChem Compound.....	25
2.3. Tampilan website SwissADME	26
2.4. Struktur DPPH	30
4.1. Hasil Kromatogram Senyawa Nanopartikel Ekstrak Pegagan.....	41
4.2. Hasil Kromatogram Senyawa Ekstrak Pegagan.....	42
4.3. Perubahan Warna Antioksidan Pada Berbagai Sampel	58



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	79
Lampiran 2. Preparasi Sampel	79
2.1. Ekstraksi Maserasi	79
2.2. Sintesis Nanopartikel	80
2.3. Analisis Senyawa Aktif Menggunakan LCMS	80
2.4. Analisis Potensi Senyawa Obat Menggunakan SwissADME.....	83
2.5. Analisis Antioksidan Menggunakan DPPH.....	83
Lampiran 3. Hasil Uji LCMS	
3.1. Hasil Kromatografi Ekstrak Pegagan.....	86
3.2. Hasil Kromatografi Nanopartikel Ekstrak Pegagan.....	87
Lampiran 4. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan	87
4.1. Hasil Pengukuran Absorbansi	87
4.2. Kurva Standar dan Persamaan Regresi Linier	88
Lampiran 5. Daftar Canonical SMILES berbagai senyawa pegagan.....	90
Lampiran 6. Hasil analisis senyawa berdasarkan SwissADME.....	92
Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian	
5.1. Proses Ekstraksi	94
5.2. Sintesis Nanopartikel	95
5.3. Proses Analisis Antioksidan.....	97

DAFTAR SINGKATAN

Simbol/Singkat	Keterangan
NEP	Nanopartikel ekstrak pegagan
EP	Ekstrak pegagan
Nm	nanometer
μm	micrometer
NaTPP	Natrium tripolifosfat
Mg/ml	milligram/milliliter
Ppm	<i>part per million</i>
Cm	centimeter
Mm	millimeter
M	meter
5-HT	5-hydroxytryptamine
PLA2	Fosfolipaase A2
PSA	<i>Particle Size Analyzer</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
XRD	<i>X-Ray Difrraction</i>
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
m/z	<i>Mass-to-charge ratio</i>
ESI	<i>electrospray ionization</i>
Pb	Timbal
Fe	Besi
Mn	Magnesium
Cu	Tembaga
DNA	<i>Deoksiribonucleic Acid</i>
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
λ	lambda (Panjang gelombang)
LCMS	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>
pH	<i>Power of Hydrogen</i> (derajat keasaman)
Rt	<i>retentions time</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAD ⁺	<i>Nikotinamida adenina dinukleotida</i>
PTP1b	<i>protein tyrosine phosphatase 1b</i>
BDNF	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang masih memegang teguh unsur-unsur tradisional dalam kehidupan sehari-harinya. Keadaan seperti ini didukung dengan keanekaragaman hayati yang terhimpun dalam berbagai tipe ekosistem yang pemanfaatannya telah mengalami sejarah panjang sebagai bagian dari kebudayaan. Salah satu aktivitas kebudayaan yang masih dipertahankan sampai sekarang adalah penggunaan tumbuhan sebagai bahan pengobatan tradisional oleh berbagai suku yang tinggal di wilayah pedalaman Indonesia (Rahayu, 2006).

Salah satu bentuk obat tradisional yang banyak ditemukan di masyarakat adalah jamu. Jamu telah dikenal masyarakat Indonesia secara turun temurun dan digunakan secara luas untuk memenuhi kebutuhan akan kesehatan. Pemanfaatan jamu ini umumnya lebih diutamakan sebagai upaya untuk menjaga kesehatan, meskipun ada juga yang menggunakannya untuk pengobatan. Seiring dengan maraknya semangat kembali ke alam atau “*back to nature*”, penggunaan jamu sebagai obat tradisional semakin meningkat. Hal ini terbukti dengan banyaknya industri jamu yang berkembang di Nusantara (Rukmi, 2009).

Jamu merupakan salah satu obat tradisional masyarakat Indonesia yang berasal dari bagian macam tanaman yang berkhasiat, baik berupa akar, rimpang, kulit batang, daun, bunga maupun buah. Bahan tersebut digunakan dalam bentuk segar maupun dikeringkan terlebih dahulu (simplisia). Dalam pemanfaatannya sebagai jamu, bahan-bahan tersebut dapat dikonsumsi dengan cara direbus maupun diseduh terlebih dahulu (Rukmi, 2009). Penggunaan jamu sebagai obat tradisional sangat dipengaruhi oleh berbagai senyawa aktif yang terkandung di dalam tumbuhan. Setiap tumbuhan terdapat senyawa aktif yang memiliki manfaat bagi manusia. Senyawa tersebut dapat bekerja sendiri atau berinteraksi dengan senyawa lain sehingga menghasilkan efek secara fisiologis terhadap makhluk hidup termasuk manusia (Savitri, 2015).

Salah satu cara untuk menentukan potensi suatu senyawa dapat digunakan sebagai obat adalah dengan menggunakan metode *in silico*. Uji *in silico* merupakan uji yang dilakukan dengan menggunakan bantuan komputer. Uji *in silico* dapat

digunakan guna mengetahui interaksi antara suatu senyawa dengan molekul target, salah satunya reseptor. Interaksi senyawa dengan reseptor dapat divisualisasikan dengan metode komputasi dan dapat digunakan untuk mengetahui *pharmacophore* dari suatu senyawa (Setiawan, 2015)

Makhluk hidup khususnya tumbuh-tumbuhan telah disebutkan sebanyak 121 ayat dalam 46 surah Al-Qur'an yang merupakan kitab suci umat Islam. Sebanyak 47 ayat dalam 28 surah di Al-Qur'an menyebutkan jenis tumbuhan tertentu yang dapat digunakan sebagai tanaman obat. (Hossain, 2016). Salah satu ayat yang menyebutkan soal tumbuh-tumbuhan terdapat dalam Al-Qur'an Surat Asy-Syu'ara ayat 7 yang berbunyi :

أَو لَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya : *“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”* (QS. Asy-Syu'ara : 7)

Ayat di atas menunjukkan pertanyaan Allah Subhanahu wa ta'ala terhadap umat manusia berupa perintah untuk berpikir dan memperhatikan ciptaan-Nya. Allah Subhanahu wa ta'ala memerintahkan kepada setiap umatnya untuk memperhatikan keadaan sekitar dimana telah Allah ciptakan tumbuhan dengan berbagai macam ukuran dan manfaat tersendiri. Kata زَوْجٍ كَرِيمٍ berdasarkan tafsir Ath-Thabari mempunyai arti tumbuhan yang baik, begitupun dengan tafsir Al-Qurthubi menunjukan arti kata yang sama. Menurut Al-Jazairi (2008), ayat di atas memiliki makna bahwa Allah Subhanahu wa ta'ala mengajak manusia untuk mengambil pelajaran dari lingkungan alam yang ada di sekitar untuk mengetahui betapa besarnya kekuasaan Allah dan berpikir bahwa hanya Allah saja yang berhak untuk disembah. Perhatikan apa yang tercipta di hamparan bumi, betapa banyak Allah telah tumbuhkan tumbuh-tumbuhan yang baik dan membawa manfaat bagi kehidupan manusia. Bukankah itu pertanda atas kekuasaan Allah, dan anugerah-Nya yang tak terhingga kepada manusia.

Al-Qur'an juga menyebutkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan, salah satu contohnya terdapat dalam surah An Nahl ayat 11, yang berbunyi :

يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ

Artinya : “Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan” (QS. An-Nahl : 11)

Dalam Surah An-Nahl di atas Allah menumbuhkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang di dalamnya terdapat manfaat bagi umat manusia. Salah satu penggalan dari ayat tersebut, yakni *الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ*. Menurut tafsir

Ath-Thabari (Al Hifnawi, 2009) kata *الزَّرْعَ* mempunyai arti tumbuh-tumbuhan, dan menurut tafsir Al-Qurthubi (Al Bakri, 2009) kata *وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ* mempunyai arti buah zaitun, buah kurma dan buah anggur. Kedua tafsir tersebut mengartikan bahwa penggalan kalimat diatas berarti contoh tumbuh-tumbuhan bermanfaat yang telah Allah ciptakan diantaranya adalah buah zaitun, buah kurma dan buah anggur. Oleh karena itu, manusia dapat memanfaatkan bahan makanan yang lezat dari buah kurma dan anggur, serta rempah-rempah dari buah zaitun. Penciptaan tumbuh-tumbuhan tersebut sesungguhnya merupakan bukti adanya kuasa Allah yang tidak terbatas. Allah telah menciptakan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang memiliki manfaat tersendiri bagi manusia, termasuk pegagan (*Centella asiatica*) yang akan digunakan dalam penelitian ini.

Pegagan (*Centella asiatica*) mempunyai rasa yang manis dan bersifat sejuk ketika dimakan, dengan kandungan senyawa aktif yang terdapat di dalamnya berupa asiatikosida, madekosida, brahmosida, tannin, resin, pectin, gula, vitamin B. selain itu, pegagan juga mengandung garam mineral seperti kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi, fosfor, minyak atsiri, pektin dan asam amino (Kristina, 2009). Dengan banyaknya kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam pegagan, maka tidak heran bahwa masyarakat memanfaatkan pegagan dalam berbagai macam pengobatan seperti memperbaiki gangguan pencernaan, membersihkan darah dan menjaga kesehatan. Selain itu, pegagan juga dapat digunakan sebagai obat luka seperti luka bakar, borok pada luka dan mencegah keloid (Pramono, 2004).

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan salah satu tumbuhan yang banyak ditemukan hidup liar di Indonesia. Menurut Ferhad (2018) pegagan mengandung senyawa flavonoid dan triterpenoid yang cukup tinggi. Adanya kandungan senyawa

flavonoid dan triterpenoid mengindikasikan bahwa pegagan mempunyai aktivitas antioksidan dan juga neuroprotektif. Antioksidan menurut Gerald (2017) merupakan suatu zat yang dapat menghambat reaksi oksidasi atau mencegah pembentukan radikal bebas dalam proses oksidasi. Radikal bebas dapat diartikan sebagai atom-atom molekul yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif dikarenakan adanya satu atau lebih electron yang tidak memiliki pasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilan, atom atau molekul dalam radikal bebas akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron.

Pegagan telah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional dan banyak digunakan oleh masyarakat indonesia untuk mengatasi berbagai macam masalah kesehatan, diantaranya adalah sebagai *brain tonic* dan agen peningkat ingatan. Pegagan telah terbukti dapat meningkatkan kinerja pembelajaran dan meningkatkan daya ingat dalam model hewan mencit (Puttarak, 2017). Dalam sistem syaraf pusat, senyawa aktif yang terkandung dalam pegagan diketahui dapat menghambat dan mengurangi kematian sel akibat induksi H_2O_2 yang merupakan senyawa racun dalam tubuh. Selain itu, senyawa aktif yang terkandung dalam pegagan juga mampu menurunkan konsentrasi radikal bebas intraseluler dan melindungi otak terhadap efek neurotoksisitas beta amiloid (Roy, 2017). Beta amiloid merupakan gugus polipeptida yang merupakan komponen utama dalam pembentukan plak amiloid pada penyakit alzheimer sehingga mengakibatkan kehilangan sel-sel neuron secara *irreversible* yang menurunkan kemampuan intelektual, daya ingat dan kemampuan berpikir (Indra, 2017).

Kandungan senyawa fitokimia dalam pegagan mempunyai daya simpan yang relatif singkat. Selain itu, proses pengolahan yang tidak benar juga dapat mengurangi kandungan senyawa fitokimia yang terkandung di dalamnya. Oleh karena itu, dilakukan proses pembuatan nanopartikel terhadap ekstrak pegagan untuk menjaga kualitas senyawa fitokimia dalam pegagan dan juga untuk mengatasi tingkat kelarutan zat aktif yang susah larut. Menurut Abdasah (2014), pembuatan nanopartikel mampu memperbaiki bioavaibilitas yang buruk, memperbaiki absorbansi suatu senyawa makromolekul oleh tubuh dan mengurangi efek iritasi saluran cerna terhadap zat aktif.

Karakter unik nanopartikel lainnya adalah ukurannya yang sangat kecil sehingga mampu memberikan keunggulannya dalam aktivitas penyerapan yang lebih baik jika dibandingkan dengan ekstrak. Nanopartikel dengan ukuran lebih kecil dari 500 nm mempunyai daya serap lebih besar 3 kali lipat dibandingkan dengan ekstrak yang memiliki ukuran molekul diatas 1000 nm atau 1 μm (Husniati, 2014).

Nanopartikel merupakan partikel yang mempunyai ukuran 1-100 nanometer (nm), namun batasan ukuran ini sulit dicapai untuk sistem nanopartikel dalam bidang pengobatan. Oleh karena itu, ukuran nanopartikel harus lebih besar dari 100 nm, tapi tetap berada dibawah ukuran 1 mikron atau 1000 nm, hal ini dikarenakan nanopartikel obat secara umum harus terkandung obat dengan jumlah yang cukup di dalam matriks pada tiap butir partikelnya (Martien, 2012). Adapun abdasah (2014) menyatakan bahwa ukuran paling baik nanopartikel dalam pengobatan berkisar antara 200-600 nm.

Nanopartikel diketahui memiliki kompatibilitas yang tinggi dengan berbagai sistem biologis yang memiliki banyak aplikasi dalam pengobatan. Nanopartikel telah dianggap sebagai agen pembawa obat terbaik karena sudah memanipulasi ukuran partikel dan dapat dimodifikasi sifat dasarnya. Dengan ukuran yang lebih kecil, nanopartikel mempunyai luas permukaan yang lebih besar dan sifat fisik dan kimia yang berbeda sehingga berbagai senyawa aktif dapat dengan mudah melekat (Raj, 2015).

Salah satu metode yang dapat digunakan dalam pembuatan nanopartikel adalah metode gelas ionik. Metode gelas ionik merupakan metode yang sederhana karena tidak membutuhkan pelarut organik dan dapat dikontrol dengan mudah (Mardiyanti, 2017). Metode gelas ionik memiliki stabilitas yang buruk dalam kondisi asam dan sulit untuk mengikat molekul obat (Mohammed, 2017). Pembentukan nanopartikel dalam metode gelas ionik terbentuk karena adanya interaksi ionik antara gugus amino pada kitosan yang bermuatan positif dengan polianion yang bermuatan negatif. Polianion yang paling banyak digunakan berupa natrium tripolifosfat (NaTPP) karna memiliki sifat yang tidak toksik serta memiliki multivalent (Mardiyanti, 2017). Reaksi yang terjadi antara kitosan dengan TPP crossliker akan memberikan bentuk material yang baik serta mereduksi ukuran

partikel material (Wulandari, 2016), meningkatkan biokompatibilitas, menurunkan derajat swelling (Kurniasari, 2017) lebih stabil dan memiliki sifat penembusan membran yang lebih baik (Ningsih, 2017).

Penggunaan kitosan dalam metode gelasi ionik ini didasarkan pada sifat kitosan yang merupakan agen bio-kompatibilitas yang baik dengan senyawa lain, tidak beracun dan sebagai penyembuhan luka yang sangat baik, sehingga banyak digunakan di bidang medis dan perawatan kesehatan yang aplikasi dalam kapsul, bead, dan nanopartikel (Sudha, 2015). Kitosan juga mempunyai sifat yang menguntungkan dalam penggunaannya dalam bentuk nanopartikel, yakni Kitosan juga memiliki tingkat kestabilan yang tinggi dalam penggunaannya, luas permukaan yang tinggi, tidak beracun, dan dapat dijadikan matriks untuk berbagai macam jenis ekstrak tumbuhan (Rismana, 2014). Selain itu, kitosan juga mempunyai sifat anti mikroba, tidak beracun, dan biokompatibilitas dengan senyawa lain (Rismana, 2014).

Skrining senyawa aktif dalam nanopartikel diketahui memiliki kandungan yang sama, tetapi dalam konsentrasi berbeda dengan ekstrak sebelumnya. Hal ini terbukti dari penelitian Abirami (2017), menyebutkan bahwa dalam skrining fitokimia dari nanopartikel perak dengan ekstrak *Cardiospermum halicacabum* dan *Butea monosperma* mengandung berbagai senyawa aktif, yakni senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, fenol, protein, terpenoids, dan karbohidrat. Kehadiran senyawa tersebut menunjukkan bahwa tumbuhan maupun sampel nanopartikel tersebut dapat digunakan dalam bidang pengobatan.

Nanopartikel juga diketahui dapat meningkatkan kadar antioksidan dari tumbuhan yang digunakan karena adanya penambahan polimer berupa kitosan. Hal ini ditunjukkan oleh pendapat Rashmi (2017) yang menyatakan bahwa aktivitas antioksidan dalam nanopartikel yang dimediasi dengan tambahan herba pegagan mengalami peningkatan dibandingkan dengan ekstrak pegagan sebelumnya. Peningkatan aktivitas antioksidan pada nanopartikel menurut Luntungan (2017) dikarenakan sifat kitosan sebagai biopolimer alami yang menyebabkan terjadinya perubahan kimia. Kitosan diketahui berperan sebagai elisitor terhadap pelepasan enzim fenilalanin ammonia liase. Enzim fenilalanin ammonia liase merupakan enzim yang berperan dalam katalisisasi reaksi penting dalam asam sinamat dan

berbagai turunannya dengan mengubah fenilalanin menjadi asam sinamat melalui proses pelepasan amonia atau disebut juga deaminasi. Pembentukan asam sinamat ini menghasilkan peningkatan kandungan fenolik yang terdapat dalam nanopartikel dengan penambahan ekstrak herba. Kesornbuakao (2016), juga menyatakan bahwa nanopartikel dengan penambahan ekstrak pegagan yang dilarutkan sebanyak 1 mg/ml (1000 ppm) kemudian diencerkan sebanyak 100 μ l (100 ppm), setelah itu di uji menggunakan DPPH dengan perbandingan 3:1 (nanopartikel:DPPH) menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap radikal bebas sebesar 13,57 %. Sedangkan ekstrak pegagan yang dilarutkan pada konsentrasi yang sama menunjukkan aktivitas penghambatan sebesar 11,55 %. Nilai tersebut menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada nanopartikel ekstrak pegagan mempunyai kemampuan penghambat yang lebih baik dari ekstrak pegagan.

Dengan adanya kandungan senyawa aktif tersebut dalam nanopartikel serta peningkatan aktivitas antioksidan pada nanopartikel dengan penambahan polimer berupa kitosan, maka hal tersebut dapat menunjukkan bahwa nanopartikel ekstrak tersalut kitosan dapat menimbulkan efek farmakologis yang lebih baik jika dibandingkan dengan ekstrak maupun nanopartikel tanpa penyalut kitosan. Oleh karena itu, Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dan nanopartikel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) tersalut kitosan serta potensinya sebagai obat oral berdasarkan uji *in silico* melalui pendekatan Lipinski. Sehubungan dengan tingginya kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam pegagan, maka uji aktivitas antioksidan juga perlu dilakukan untuk mengetahui besaran tingkat penyerapan senyawa aktif tersebut terhadap radikal bebas. Pemanfaatan metode nano ini diharapkan dapat meningkatkan tingkat dispersi senyawa bioaktif dari ekstrak pegagan, melindungi terhadap degradasi mutu yang tidak diinginkan, serta meningkatkan penyerapan tubuh terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Berapakah jenis senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dan nanopartikel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) tersalut kitosan yang dideteksi menggunakan metode LC-MS ?
- b. Senyawa apa sajakah yang mempunyai potensi sebagai obat oral berdasarkan pendekatan Lipinski ?
- c. Apakah ada perbedaan aktivitas antioksidan yang terdapat pada ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dan nanopartikel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) tersalut kitosan yang dideteksi menggunakan metode DPPH ?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini memiliki tujuan untuk :

- a. Mengetahui jenis senyawa yang terkandung dalam ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dan nanopartikel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) tersalut kitosan yang dideteksi menggunakan metode LC-MS.
- b. Mengetahui jenis senyawa yang berpotensi sebagai obat secara oral berdasarkan pendekatan Lipinski
- c. Mengetahui aktivitas antioksidan yang terdapat dalam ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dan nanopartikel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) tersalut kitosan yang dideteksi menggunakan metode DPPH ?

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

- a. Memberikan informasi mengenai kadar senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dan nanopartikel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) tersalut kitosan yang dideteksi menggunakan metode LC-MS ?
- b. Memberikan informasi mengenai senyawa dalam pegagan yang memiliki potensi sebagai obat secara oral berdasarkan pendekatan Lipinski
- c. Memberikan informasi mengenai aktivitas antioksidan yang terkandung dalam ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dan nanopartikel ekstrak pegagan

(*Centella asiatica*) tersalut kitosan yang dideteksi menggunakan metode DPPH ?

1.5. Batasan Masalah

- a. Sampel berupa serbuk simplisia dari daun pegagan (*Centella asiatica*) yang diperoleh dari UPT. Materia Medika Malang.
- b. Ekstraksi sampel simplisia dari serbuk pegagan (*Centella asiatica*) yang diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol 70% dilanjutkan dengan uji fitokimia menggunakan reagen.
- c. Pembuatan sediaan nanopartikel dengan menggunakan metode gelasi ionik dari ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dengan penambahan polimer berupa kitosan sebagai bahan penyalut.
- d. Uji kandungan senyawa aktif dalam ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dan nanopartikel ekstrak pegagan tersalut kitosan menggunakan LC-MS.
- e. Uji aktivitas antioksidan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dan nanopartikel ekstrak pegagan tersalut kitosan menggunakan metode DPPH.
- f. Hasil LCMS berupa daftar senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dan nanopartikel ekstrak pegagan tersalut kitosan menggunakan LC-MS.
- g. Pendekatan Lipinski terhadap senyawa yang terkandung dalam pegagan dilakukan dengan mencari SMILES (*simplified molecular-input line-entry system*) pada database PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) kemudian dilakukan analisis pendekatan senyawa tersebut berdasarkan pendekatan Lipinski berdasarkan swiss adme (<http://www.swissadme.ch>)
- h. Hasil uji aktivitas antioksidan berupa nilai IC50

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan salah satu tumbuhan yang banyak ditemukan hidup liar di lingkungan sekitar. Keberadaan pegagan yang dapat dengan mudah ditemukan, menjadikan pegagan sebagai tumbuhan yang sering digunakan masyarakat untuk berbagai keperluan, misalnya digunakan sebagai bahan sayuran maupun sebagai obat-obatan.

1. Klasifikasi pegagan (*Centella asiatica*)



Gambar 2.1. Tumbuhan pegagan (*Centella asiatica*) (Sutardi, 2016)

Klasifikasi tanaman pegagan (*Centella asiatica*) (Hayne, 1987)

Kingdom : Plantae

Division : Tracheophyta

Sub Division : Spermatophyta

Class : Magnoliopsida

Order : Apiales

Family : Apiaceae

Genus : *Centella*

Spesies : *Centella asiatica* (L.) Urban

Pegagan dikenal dengan nama ilmiah *Centella asiatica*, merupakan tanaman yang termasuk dalam keluarga *Apiaceae* atau adas-adasan yang berasal dari negara Asia seperti India, Sri Lanka, Cina, Indonesia dan Malaysia. Pegagan

juga dikenal dengan *Gotu kola*, *Asiatic pennywort*, *Indian pennywort*, *Indian water navelwort*, *wild violet*, and *tiger herb* oleh masyarakat asing. Di Indonesia sendiri, pegagan memiliki berbagai macam nama, yakni pegago di daerah Minangkabau; antanan gede dan antanan rambat di wilayah Sunda; dan di wilayah Jawa dikenal dengan ganggagan, kerok batok, pantegowang, panegowang, rendeng, calingan rambat, pegagan, atau gagan-gagan. Pegagan juga sering disebut dengan daun kaki kuda, penyebutan ini dikarenakan bentuk dari daun pegagan yang menyerupai telapak kaki kuda (Lasmadiwati, 2003).

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman herba tahunan yang memiliki habitat di daerah tropis dan berbunga sepanjang tahun. Bentuk daunnya bulat seperti ginjal manusia, batangnya lunak dan beruas, serta menjalar hingga mencapai satu meter (Bermawie, 2008). Daun pegagan memiliki warna hijau kekuningan, tipis, bentuknya oriformis, orbicular, atau lonjong dengan tujuh urat (Orhan, 2012). Pada tiap ruas batang tumbuh akar dan daun dengan tangkai daun yang panjangnya sekitar 5–15 cm dan akar berwarna putih, mempunyai rimpang pendek dengan stolon yang merayap dengan panjang 10–80 cm (van Steenis, 1997). Tinggi tanaman ini berkisar antara 5,39–13,3 cm, jumlah daunnya berkisar antara 5–8,7 untuk tanaman induk dan 2–5 daun pada anakan (Bermawie et al., 2008). Pada umumnya mempunyai 3 Bunga dengan bunga duduk di bagian tengah, bunga samping memiliki tangkai pendek, 2 daun pelindung dengan panjang 3-4 mm berbentuk bulat telur, mahkota bunga berwarna merah lembayung dengan panjang 1-1,5 mm dan lebarnya mencapai 0,75 mm. Buah berbentuk pipih lebar dengan ukuran lebih kurang 7 mm dan tingginya lebih kurang 3mm, bertekuk dua, memiliki rusuk yang jelas, berwarna kuning kecoklatan serta berdinding agak tebal (Badan Pengawas Obat, 2010).

Pegagan (*Centella asiatica*) mempunyai batang pendek, sehingga dapat dianggap tidak mempunyai batang, dari batang tersebut tumbuh geragih atau stolon yang tumbuh secara horisontal di atas tanah dan berbuku-buku. Dari buku tersebut keluar akar dan tunas yang kemudian tumbuh menjadi tanaman baru (Reniza, 2013).

Pegagan (*Centella asiatica*) ditemukan di seluruh wilayah tropis dan sub tropis dengan ketinggian 600 m. pegagan juga diketahui hidup pada ketinggian

1.550 m di Sikkim dan 1.200 m di Gunung Abu (Rajasthan) India. Pegagan dapat tumbuh subur di tempat-tempat teduh, berawa, lembab dan basah seperti sawah, tepi sungai hingga membentuk seperti karpet yang hijau pekat (Singh, 2010).

2. Kandungan pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki manfaat yang besar bagi kesehatan, seperti menjaga dan meningkatkan daya ingat, menurunkan tekanan darah, serta mencegah terjadinya keloid pada bekas luka. Hal ini dikarenakan pegagan mengandung berbagai senyawa aktif. Sihombing (2015) dalam jurnalnya menyatakan bahwa pegagan mengandung senyawa aktif diantaranya adalah triterpenoid saponin dengan unsur utamanya terdiri dari asiatikosida dan madekassosida, genin triterpen, minyak esensial, flavonoid, fitosterol, dan gula. Bahan aktif lainnya adalah tanin, asam amino, asam lemak, alkaloid, dan garam-garam mineral. Sutardi (2016) menambahkan, pegagan juga mengandung asam brahmik, asam madasiatik, meso-inositol, sentelosida, karotenoid, hidrokotilin, vellarin, tanin serta garam mineral seperti kalium, natrium, magnesium, kalsium, dan besi, fosfor, minyak atsiri (1%), pektin (17.25%), asam amino dan vitamin B, senyawa pahit vellarine, dan senyawa samak. Adapun Khusnawati (2015) menyatakan, Pegagan juga diketahui mengandung senyawa aktif lainnya yakni vallerin, alkaloid, dan glikosida triterpen.

Senyawa aktif terpenting yang terkandung dalam pegagan adalah triterpenoid dan saponin, yang meliputi senyawa asiatikosida, sentelosida, madekosida, dan asam asiatik serta komponen lain seperti minyak volatil, flavonoid, tanin, fitosterol, asam amino, dan karbohidrat. Semua kandungan bioaktif tanaman pegagan merupakan antioksidan yang bermanfaat bagi tubuh manusia dalam meningkatkan sistem imun dan menjaga sel-sel tubuh dari kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas (Hebbar, 2019).

Triterpenoid merupakan senyawa paling penting yang terkandung dalam tanaman pegagan. Triterpenoid berfungsi untuk meningkatkan fungsi mental dan memberi efek menenangkan. Senyawa ini juga dapat merevitalisasi pembuluh darah sehingga peredaran darah menuju otak menjadi lancar. Asiatikosida merupakan derivat dari senyawa triterpenoid yang berfungsi untuk menguatkan sel-sel kulit dan meningkatkan perbaikannya, menstimulasi sel darah dan sistem imun,

serta sebagai antibiotik alami. Asiatikosida juga diketahui memiliki khasiat dalam meningkatkan vitalitas dan daya ingat serta mengatasi pikun yang berkaitan erat dengan asam nukleat (Khusnawati, 2015).

Dari berbagai senyawa tersebut, asiatikosida triterpen (asiatikosida) menjadi senyawa yang biasa digunakan sebagai senyawa penanda (Khusnawati, 2015). Asiatikosida merupakan senyawa glikosida triterpen, yakni senyawa turunan (derivat) alfa-amirin dengan gugus molekul yang terdiri atas dua glukosa dan satu rhamnosa. Aglikon triterpen pada pegagan yang disebut juga asiatikosida mempunyai gugus alkohol primer, glikol, dan satu karboksila teresterifikasi dengan gugus gula (Sutardi, 2016). Aglikon triterpen dari asiatikosida disebut dengan asam asiatik yang mempunyai gugus alkohol primer, dan sebuah karboksilat yang teresterifikasi dengan gugus gula. Asiatikosida mempunyai gugus polar karena ikatan glikosida yang terjadi antara molekul gula dan gugus benzene (Febriyanti, 2016). Brahmosida juga merupakan senyawa derivat triterpenoid yang fungsinya untuk memperlancar aliran darah dan merupakan protein penting bagi sel otak (Lachman, 2009).

3. Manfaat pegagan

Tanaman telah banyak digunakan sebagai bahan perawatan bagi ribuan orang dalam ribuan tahun. Berdasarkan pengalaman, obat tradisional terus menarik perhatian masyarakat luas dalam penggunaannya sebagai obat dari penyakit ringan hingga penyakit kronis. Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat tradisional adalah pegagan (*Centella asiatica*). Pegagan merupakan tanaman tropis yang sering digunakan sebagai obat tradisional bagi masyarakat di negara-negara Asia termasuk Cina dan Indonesia karena manfaatnya yang besar dalam bidang kesehatan, sehingga sering disebut sebagai “*miracle elixirs of life*” (Orhan, 2012).

Berbagai penelitian yang telah dilakukan, pegagan (*Centella asiatica*) diketahui memiliki berbagai manfaat, yaitu sebagai obat luka, sebagai obat penenang, meningkatkan daya ingat dan pelindung sel-sel syaraf.

a. Agen penyembuh luka

Berbagai penelitian yang dilakukan terhadap obat-obatan tradisional yang berasal dari pegagan menyebutkan bahwa proses epitelisasi pada luka terjadi lebih cepat dan tingkat kontraksi luka lebih tinggi apabila dibandingkan dengan luka yang tidak diobati. Hal ini diyakini karena pegagan memiliki efek pada proses keratinisasi yang membantu proses penebalan kulit di area infeksi (Gohil, 2010).

Asiatikosida yang merupakan senyawa dalam pegagan dilaporkan mempunyai aktivitas penyembuhan luka dengan meningkatkan pembentukan kolagen dan angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru, meningkatkan kekuatan tarik kulit yang baru terbentuk sehingga mempercepat penyembuhan luka, dan menghambat proses inflamasi yang dapat memicu hipertrofi di bekas luka serta meningkatkan permeabilitas kapiler (Gohil, 2010).

Peranan Asiaticoside dalam penyembuhan luka ditunjukkan dengan meningkatkan tingkat migrasi sel-sel kulit, meningkatkan adhesi sel kulit awal, dan menginduksi peningkatan jumlah fibroblast pada kulit. Selain itu, Asiaticoside berperan dalam merangsang sintesis kolagen penuaan kulit tipe 1 dalam sel fibroblast kulit manusia sehingga dapat digunakan sebagai obat pencegahan bekas luka hipertrofik dan keloid (Roy, 2013).

b. Agen penenang atau antidepresan

Senyawa total triterpenoid yang terkandung dalam pegagan menunjukkan waktu imobilitas dan memperbaiki ketidakseimbangan kadar asam amino pada tikus yang berenang paksa menunjukkan aktivitas antidepresan (Roy, 2013). Keadaan ini menimbulkan efek penurunan kadar kortikosteron dalam otak sehingga menimbulkan efek antidepresan (Gohil, 2010).

c. Agen peningkat daya ingat

Pegagan diketahui mengandung senyawa brahmicacid, asam isobrahmic, brahminoside dan brahmoside. Senyawa ini menimbulkan efek yang signifikan pada sistem pembelajaran dan memori serta menurunkan kadar norepinefrin, dopamin, dan 5-HT serta metabolitnya di otak. Senyawa ini juga memiliki sifat psikotropik yang berfungsi sebagai obat penenang dan antikonvulsan yang berguna dalam demensia, gangguan mental dan kecemasan. Dengan demikian, formulasi polyherbal di mana semua herbal bertindak secara sinergis menghasilkan

peningkatan memori, perhatian dan konsentrasi pada anak-anak dengan ketidakmampuan belajar (Singh, 2010). Roy (2013) menambahkan bahwa Asam Asiatic yang diisolasi dari pegagan juga menunjukkan adanya peningkatan pembelajaran dan peningkatan memori yang dilakukan terhadap tikus.

d. Agen pelindung sel syaraf

Penelitian terhadap pegagan yang dilakukan terhadap morfologi dendritik neuron amygdaloid pada tikus dewasa yang merupakan salah satu daerah pada otak yang berkaitan dengan pembelajaran dan memori, menunjukkan adanya peningkatan yang signifikan dalam panjang dendritik dan titik percabangan. Selain itu, pegagan juga diketahui menghambat aktivitas subtipe fosfolipase A2 (PLA2), yang berhubungan dengan penyakit neurodegeneratif. Adapun aktivitas antikonvulsan dan neuropektif ditemukan pada tikus albino jantan. Aktivitas tersebut disebabkan oleh reaksi n-heksana, kloroform, etil asetat, n-butanol yang terdapat dalam pegagan (Roy, 2013).

Pegagan berperan dalam proses perlindungan sel syaraf dengan cara penghambatan enzim cPLA2, penghambatan enzim ini kemudian mencegah pembentukan plak amiloid yang terjadi pada penyakit Alzheimer, neurotoksisitas dopamin pada penyakit Parkinson, dan mengurangi stres oksidatif (Prakash, 2017).

Asam asiatic merupakan senyawa dalam pegagan yang berperan dalam neuroprotektif. Tiga turunan asam asiatic secara signifikan diketahui efektif dalam melindungi kelebihan neuron yang terpapar glutamat pada sel kortikal. Asam asiatic juga menunjukkan adanya aktivitas neuroprotektif potensial terhadap kematian sel yang diinduksi C2-ceramides pada sel-sel neuron kortikal tikus yang dikultur primer. Oleh karena itu, senyawa ini dapat digunakan sebagai bahan pengobatan untuk penyakit epilepsi, stroke, multiple sclerosis dan gangguan neuropsikiatri lainnya (Roy, 2013).

e. Manfaat lainnya

Pegagan (*Centella asiatica*) juga mempunyai khasiat sebagai anti bakteri dan anti jamur. Ekstak pegagan mengandung minyak atsiri yang dapat digunakan dalam menghambat bakteri (*Bacillus subtilis* dan *Staphilococcus aureus*) dan jamur (*Aspergillus niger* dan *Candida albicans*) (Prakash, 2017). Pegagan juga mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat, yang dapat memberikan efek

neuropektif terhadap kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. Hal ini karena kandungan fenolik pegagan cukup tinggi sehingga dapat mengurangi proses oksidasi akibat radikal bebas dalam tubuh (Roy, 2013).

Ekstrak pegagan mampu menurunkan kadar glukosa darah dikarenakan kandungan asam asiatik yang berperan dalam meningkatkan fibrosis islet pada pankreas (Prakash, 2017), menghambat lesi pada lambung dengan cara memperkuat mukosa lambung dan mengurangi oksidasi akibat radikal bebas (Gohil, 2010).

4. Tumbuhan dalam Al-Qur'an

Allah telah menyebutkan tumbuh-tumbuhan dalam Al-Qur'an sebanyak 121 ayat dalam 48 surah. Salah satu ayat yang menyebutkan mengenai tumbuh-tumbuhan adalah surah Asy-Syuara ayat 7 berikut :

أَو لَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya : *“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”* (QS. Asy-Syu'ara : 7)

Ayat di atas menunjukkan pertanyaan Allah SWT terhadap umat manusia berupa perintah untuk berpikir dan memperhatikan ciptaan-Nya. Allah Subhanahu wa ta'ala memerintahkan kepada setiap umatnya untuk memperhatikan keadaan sekitar dimana telah Allah ciptakan tumbuhan dengan berbagai macam ukuran dan manfaat tersendiri. Kata زَوْجٍ كَرِيمٍ berdasarkan tafsir Ath-Thabari (Al Bakri, 2009) mempunyai arti tumbuhan yang baik, begitupun dengan tafsir Al-Qurthubi (Al Hifnawi, 2008) menunjukkan arti kata yang sama. Menurut Al-Jazairi (2008), ayat di atas memiliki makna bahwa Allah Subhanahu wa ta'ala mengajak manusia untuk mengambil pelajaran dari lingkungan alam yang ada di sekitar untuk mengetahui betapa besarnya kekuasaan Allah dan berpikir bahwa hanya Allah saja yang berhak untuk disembah. Perhatikan apa yang tercipta di hamparan bumi, betapa banyak telah Allah tumbuhkan tumbuh-tumbuhan yang baik dan membawa manfaat bagi kehidupan manusia. Bukankah itu pertanda atas kekuasaan Allah, dan anugerah-Nya yang tak terhingga kepada manusia.

2.2. Sintesis Nanopartikel Menggunakan Metode Gelasi Ionik

Sintesis nanopartikel dalam penelitian ini menggunakan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) yang diekstrak menggunakan metode maserasi. Ekstrak menurut Harbone (1987) merupakan sediaan pekat yang didapat dengan cara menarik senyawa aktif dari simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Adapun Prinsip penarikan senyawa aktif ini bertujuan untuk memisahkan komponen-komponen senyawa terlarut dalam suatu campuran dari komponen yang tidak larut dengan pelarut sesuai. Proses ini juga mengakibatkan perpindahan massa senyawa aktif dari dalam sel yang ditarik oleh cairan penyari hingga mendapat senyawa aktif larut yang diharapkan. Pembuatan ekstrak dimaksudkan agar senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia mempunyai kadar yang tinggi dan memudahkan pengaturan dosis senyawa aktif dalam obat.

Penggunaan metode maserasi dilakukan dikarenakan metode Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari kemudian masuk menembus dinding sel menuju ke dalam rongga sel yang terdapat senyawa aktif, sehingga senyawa aktif akan larut bersama cairan penyari (Wientarsih, 2006).

Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol. Hal ini dikarenakan etanol merupakan cairan serbaguna yang baik digunakan dalam proses ekstraksi karena sifatnya sebagai larutan universal. Dalam cairan ini senyawa yang memiliki sifat polar maupun non-polar dapat larut secara maksimal. Selain itu, baik alkohol maupun etanol merupakan larutan yang dapat dengan mudah didapatkan dan tidak berbahaya karena tingkat toksisitasnya yang rendah (Harbone, 1987).

Ekstrak kemudian disintesis ke dalam bentuk nanopartikel dengan penambahan kitosan sebagai penyalutnya. Nanopartikel dalam Abdasah (2014) dapat diartikan sebagai senyawa obat yang dibuat dalam ukuran nanometer dengan menggunakan cara tertentu yang hasilnya disebut dengan nanokristal, nanopartikel juga dapat diartikan sebagai senyawa obat yang mengalami proses enkapsulasi dalam suatu sistem pembawa yang berukuran nanometer atau disebut juga nanocarrier. Tujuan dari penggunaan nanopartikel adalah untuk meningkatkan kelarutan zat aktif, memperbaiki bioavailabilitas senyawa yang buruk dan memodifikasi sistem penghantaran obat sehingga obat dapat bereaksi pada daerah

yang spesifik. Selain itu, nanopartikel juga berguna dalam memperbaiki absorpsi suatu senyawa dalam tubuh serta mengurangi efek iritasi saluran cerna terhadap zat aktif (Abdassah, 2014).

Teknologi nanopartikel dapat digunakan sebagai agen pembawa obat. Nanopartikel umumnya mempunyai ukuran yang dibawah 1000 nm dan diproduksi dari bahan yang bersifat *biodegradable* seperti polimer alami atau sintetis, lipid, atau logam. Oleh karena ukurannya yang kecil, nanopartikel dapat diserap oleh sel dengan efisiensi yang lebih tinggi dibandingkan mikromolekul yang memiliki ukuran lebih besar sehingga (Yasurin, 2016). Dengan ukuran tersebut, penggunaan nanopartikel sebagai obat dapat dikatakan lebih efisien. Hal ini dikarenakan dalam sistem nanopartikel, obat langsung didispersikan dalam matriks polimerik, diserap, dikomplekskan, atau dikonjugasikan pada permukaan partikel sehingga menyebabkan proses penyerapan zat oleh tubuh lebih banyak. Penyerapan nanopartikel polimer oleh tubuh juga bergantung pada ukurannya. Semakin kecil ukuran nanopartikel maka semakin banyak obat yang mampu dibawa karena luas permukaan partikel semakin besar (Wijayadi, 2018).

Allah subhanahu wa ta'ala berfirman dalam surah Luqman ayat 16 :

يُنْيِيَّ إِنَّهَا إِنْ تَكُ مِثْقَالَ حَبَّةٍ مِنْ خَرْدَلٍ فَتَكُنْ فِي صَخْرَةٍ أَوْ فِي السَّمَوَاتِ أَوْ فِي الْأَرْضِ يَأْتِ بِهَا اللَّهُ إِنَّ اللَّهَ لَطِيفٌ خَبِيرٌ

Artinya : “(Luqman berkata): "Hai anakku, sesungguhnya jika ada (sesuatu perbuatan) seberat biji sawi, dan berada dalam batu atau di langit atau di dalam bumi, niscaya Allah akan mendatangkannya (membalasinya). Sesungguhnya Allah Maha Halus lagi Maha Mengetahui” (Q.S. Luqman : 16).

Ayat di atas menunjukkan bahwa Allah subhanahu wa ta'ala telah menciptakan segala sesuatu ciptaannya dengan bentuk dan ukuran yang sebaik-baiknya. Penggalan ayat yang berbunyi حَبَّةٍ مِنْ خَرْدَلٍ, berdasarkan tafsir Al-Qurthubi (Al Hifnawi, 2008) dan Ath-Thabari (Al Bakri, 2009) mempunyai arti perumpamaan sekecil biji sawi. Hal tersebut, menandakan bahwa Allah SWT berkuasa dalam penciptaan segala sesuatu, baik objek yang besar maupun yang lebih kecil. Allah SWT tidak pernah menganggap remeh sesuatu apapun yang Dia ciptakan meskipun hal itu berukuran sangat kecil. Orang-orang yang beriman meyakini bahwa dalam perumpamaan penciptaan yang dilakukan oleh Allah SWT memiliki manfaat bagi kehidupan manusia (Al-Mubarak, 2006). Sesuatu dengan

ukuran kecil dalam penelitian ini adalah partikel nano yang merupakan sebuah molekul yang mempunyai ukuran sangat kecil.

Pembuatan nanopartikel dalam penelitian ini menggunakan nanopartikel sebagai *nanocarrier* dengan jenis nanopartikel *cross link*. Menurut (Abdasah, 2014), nanopartikel *cross link* merupakan metode pembuatan partikel nano yang terbentuk melalui proses sambung silang antara elektrolit dengan pasangan ionnya yang terbentuk oleh ikatan ionik maupun kovalen yang disebut dengan gelasi ionik. Prosedur gelasi ionik dilakukan dengan mencampur dua fase cair, fase yang satu mengandung kitosan dan fase yang satu lagi mengandung anion multivalen. Taurina (2017) menyatakan, Pembuatan nanopartikel dengan menggunakan metode gelasi ionik menunjukkan adanya interaksi ionik antara gugus amino positif pada kitosan dengan polianion yang bermuatan negatif yaitu Na-TPP atau STPP.

Kitosan merupakan bahan dalam pembuatan nanopartikel bersamaan dengan sTPP. Kitosan dihasilkan dari deasetilasi kitin yang merupakan elemen struktural dari exoskeleton krustasea (Wijayadi, 2018). kitosan tersusun dari gugus N-Amino-2-deoxy- β -D-glucopiranososa yang dikombinasikan dengan ikatan glikosidik sehingga memberikan sifat khusus pada kitosan sehingga sangat bermanfaat dalam bidang farmasi (Debnath, 2010).

Allah Subhanahu wa ta'ala berfirman dalam surah Shad ayat 27 sebagai berikut :

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَطْلًا ذَلِكُمْ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ

Artinya : “Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah. Yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka.”(Shad : 27).

Penggalan awal pada ayat diatas terdapat kata **بَطْلًا** menurut tafsir Al-Qurthubi (Al Hifnawi, 2009) kata tersebut mempunyai arti batil/palsu/sia-sia. Adapun tafsir dari kementrian RI tahun 2010, ayat tersebut menunjukkan kebesaran Allah dalam penciptaan langit, bumi, dan makhluk apa saja yang berada di antaranya tidak ada yang sia-sia. Langit dengan segala bintang dan bulan yang menghiasi malam hari, serta matahari yang memancarkan sinarnya di waktu siang, sangat bermanfaat bagi kehidupan manusia. Begitu juga bumi dengan segala isinya, baik yang berada di permukaan bumi maupun yang tersimpan dalam perut bumi.

Semua itu diciptakan Allah atas kekuasaan dan kehendak-Nya sebagai rahmat yang tak ternilai harganya. Kitosan merupakan salah satu bentuk ciptaan Allah subhanahu wa ta'ala yang keberadaannya dianggap remeh bagi masyarakat karena berasal dari bahan kulit *crustaceae*, tetapi dalam kenyataannya kitosan mempunyai manfaat bagi kesehatan manusia.

Dalam penggunaannya sebagai bahan pengobatan, kitosan mempunyai sifat hipoalergenik dan sifat antibakteri alami berkualitas sehingga membuatnya berguna sebagai agen penyembuhan luka. Kitosan juga diketahui dapat meningkatkan kekebalan tubuh. Harganya yang murah dengan kualitas yang baik menunjukkan bahwa kitosan dapat digunakan dalam bidang pengobatan (Wijayadi, 2018).

Nanopartikel kitosan dibuat dengan cara mereaksikan kitosan dengan natrium tripolifosfat (NaTPP) yang mampu meningkatkan kelarutannya dalam air (Amaliyah, 2018). Fungsi penambahan TPP ini adalah sebagai reagen crosslinker antara gugus amino yang bermuatan positif dari kitosan dengan polianion yang bermuatan negatif dari TPP (Yudhasmita, 2017). Penambahan tripolifospat yang tepat dapat menurunkan ukuran nanopartikel dan meningkatkan kekuatan matriks kitosan sehingga membuat nanopartikel semakin kuat dan sulit terpecah (Nadia, 2014).

Proses reaksi yang terjadi dari *crosslinker* antara kitosan dengan TPP akan menghasilkan bentuk yang baik dan mereduksi ukuran partikel (Wulandari, 2016), meningkatkan biokompatibilitas, menurunkan derajat *sweeling* (Kurniasari, 2017) lebih stabil dan memiliki sifat penembusan terhadap membran yang lebih baik (Ningsih, 2017).

Proses *crosslinker* dalam metode gelasi ionik dapat terjadi dengan bantuan homogenisasi atau pengadukan pada kecepatan dan durasi tertentu. Umumnya proses homogenisasi ini dilakukan pada kecepatan 1200 rpm dengan durasi 1 jam (Nadia, 2014). Berdasarkan dari penelitian Wijayadi (2018), optimasi kecepatan pengadukan menunjukkan bahwa seiring dengan meningkatnya kecepatan pengadukan akan menghasilkan ukuran partikel yang semakin kecil. Peningkatan kecepatan pengadukan ini meningkatkan intensitas molekul pelarut untuk bersentuhan dengan kitosan sehingga menghasilkan ukuran partikel yang semakin

kecil. Nadia (2014) juga berpendapat bahwa pengecilan ukuran partikel menggunakan magnetic stirrer pada kecepatan tinggi dapat menyamaratakan energy yang diterima oleh seluruh bagian partikel terlarut, sehingga ukuran partikel homogen dan sama rata.

Hasil sintesis nanopartikel pegagan kemudian dilakukan uji untuk menentukan karakteristik sampel nanopartikel yang dihasilkan. Uji yang dilakukan pada sampel nanopartikel ini adalah PSA (*Particle Size Analyzer*), SEM (*Scanning Electron Microscopy*), XRD (*X-Ray Diffraction*), dan FTIR (*Fourier-transform infrared spectroscopy*). Karakteristik nanopartikel ekstrak pegagan yang didapatkan dari berbagai uji diatas menurut Muchtaromah (2019), sintesis nanopartikel pegagan yang telah dilakukan menghasilkan sampel nanopartikel dengan bentuk bulat seperti bola dan mempunyai berbagai ukuran, yang disesuaikan dengan perlakuan lama sonikasi. Sonikasi selama 90 menit menunjukkan sampel dengan ukuran 286,2 nm. Sedangkan sonikasi selama 120 menit menghasilkan sampel dengan ukuran 420 nm dan sonikasi 150 menit menghasilkan sampel berukuran 416 nm. ukuran tersebut dianggap telah memenuhi kriteria pembentukan nanopartikel yang berkisar antara 1-10.000 nm. Dalam uji FTIR, sampel nanopartikel menunjukkan adanya gugus kitosan pada berbagai bilangan gelombang yang menunjukkan adanya peran kitosan sebagai penyalut senyawa ekstrak pegagan. Kemudian, uji XRD yang dilakukan menunjukkan karakter nanopartikel yang terbentuk adalah amorf. Karakter tersebut menunjukkan bahwa nanopartikel yang terbentuk dengan susunan yang tidak teratur dan kurang padat. Bentuk tersebut akan mengakibatkan mudahnya nanopartikel untuk dimasukkan molekul lain, seperti senyawa antioksidan yang terdapat dalam ekstrak pegagan yang turut serta disintesis dalam pembuatan nanopartikel.

2.3. Analisis Senyawa Aktif Menggunakan Metode LC-MS (*Liquid Chromatografi - Mass Spectrofotometri*).

Sebagai manusia, kita diharuskan untuk selalu berpikir mengenai segala sesuatu yang diciptakan Allah Subhanahu wa ta'ala. Firman dalam Al-Qur'an surah Ali Imran ayat 65 berikut :

يَا هَلْ أَلْكُتُبِ لِمَ تُحَاجُّونَ فِي إِبْرَاهِيمَ وَمَا أُنزِلَتِ التَّوْرَةُ وَالْإِنْجِيلُ إِلَّا مِنْ بَعْدِهِ أَفَلَا تَعْقِلُونَ

Artinya : *“Hai Ahli Kitab, mengapa kamu bantah membantah tentang hal Ibrahim, padahal Taurat dan Injil tidak diturunkan melainkan sesudah Ibrahim. Apakah kamu tidak berpikir ?”* (Surah Ali Imran : 65).

Ayat di atas memerintahkan manusia untuk berpikir yang ditunjukkan oleh penggalan ayat *أَفَلَا تَعْقِلُونَ* yang dalam Bahasa Indonesia menurut tafsir Al Jazairi (2008) yang berbunyi *“Apakah kamu tidak berpikir ?”*. Berpikir merupakan sebuah bentuk kegiatan untuk memahami berbagai hal, misalnya untuk mengetahui kekuasaan Allah melalui berbagai ciptaanNya. Contoh lain dalam berpikir dalam bidang sains adalah dengan cara melakukan uji coba terhadap lingkungan, misalnya untuk mengetahui kandungan senyawa dalam tumbuh-tumbuhan. Uji fitokimia dengan menggunakan metode LC-MS dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa fitokimia yang terkandung dalam tumbuh-tumbuhan.

LC-MS/MS atau dalam Bahasa Indonesia disebut dengan kromatografi cair–spektrofotometer massa adalah salah satu teknik analisis dengan kemampuan gabungan dari metode pemisahan fisik menggunakan kromatografi cair dan kemampuan analisis menggunakan metode spectrometer massa (Khotimah, 2016). Kromatografi cair cocok digunakan untuk memisahkan berbagai komponen organik dengan kisaran yang luas, seperti nano molekul, mikromolekul, metabolit sekunder pada tanaman, molekul obat, dan protein (Anissa, 2012).

LC-MS memiliki berbagai keunggulan dalam penggunaannya sebagai metode pemisah molekul. Berbagai keunggulan tersebut adalah Hasil analisis yang khas dan spesifik yang diperoleh dari penggunaan spectrometer massa sebagai detektor. Kemudian aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis sehingga analisis yang dapat dilakukan tidak terbatas pada molekul volatil saja (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da). Selain itu, Adanya Teknik derivatisasi dan persiapan sampel yang sederhana menunjukkan bahwa metode LC-MS Mampu mengukur analit yang sangat polar sehingga metode ini mampu menghasilkan

sejumlah data kuantitatif maupun kualitatif dengan tingkat fleksibilitas tinggi dan dalam waktu relative singkat. Hal ini disebabkan karena terjadinya proses seleksi ion dengan sangat cepat dari banyak parameter (Ginting, 2012).

Metode deteksi dalam kromatografi biasanya menggunakan berbagai jenis detektor, diantaranya adalah detektor indeks refraktif, elektrokimia, floresens, UV-tampak, dan yang paling banyak digunakan adalah spektroskopi massa. Detector jenis spektroskopi massa ini merupakan salah satu detektor yang mampu menghasilkan data dalam bentuk 3 dimensi dengan penggambaran kekuatan sinyal dan juga spektrum massa. Spektrum massa yang dihasilkan akan menyajikan informasi berupa berat molekul, struktur, identitas, kuantitas, dan kemurnian sampel sehingga dapat meningkatkan kualitas hasil yang diperoleh pada analisis kuantitatif dan kualitatif (Vogeser, 2016).

Sistem kerja spektroskopi massa dalam analisis LC-MS berdasarkan proses ionisasi molekul yang akan menyortir dan mengidentifikasi ion berdasarkan perbandingan massa terhadap muatan (m/z). dalam proses tersebut, terdapat 2 kunci utama yaitu sumber ion dan penganalisis massa. Sumber ion spektroskopi massa yang digunakan pada penelitian ini adalah jenis electrospray ionization (ESI). Sumber ion jenis ini memanfaatkan electrospray yang menghasilkan ion analat pada larutan sebelum mencapai spektroskopi massa. Eluen kromatografi cair akan disemprotkan (nebulisasi) ke dalam sebuah ruang pada tekanan atmosfer dengan tambahan tekanan dari medan elektrostatik yang kuat dan pemanas gas. Teknik ini akan menghasilkan sistem ionisasi yang efektif dari kisaran molekul yang bersifat semipolar hingga polar. Metode ionisasi ESI merupakan metode yang memiliki kemampuan yang lebih baik dibanding jika dengan metode ionisasi lainnya karena metode ESI mempunyai kisaran massa yang lebih luas, yakni sekitar beberapa ratus kilodalton (Trauger, 2012).

LC-MS merupakan metode pendekatan yang sangat berguna dalam penentuan profil suatu metabolit dalam sampel. Penggunaan sistem pemisahan dengan resolusi yang lebih tinggi merupakan kunci dalam metode ini sehingga mampu menentukan profil suatu metabolit dengan lebih baik. Analisis dengan menggunakan metode LC-MS ini sering digunakan di bidang bioanalisis karena kemampuannya dalam deteksi dan pemisahan molekul dengan rentang yang luas

serta dapat digunakan untuk analisis kuantitatif maupun analisis struktural dengan nilai sensitivitasnya mencapai pg/mL (Anissa, 2012).

2.4. Bioinformatika

Secara sederhana, bioinformatika merupakan penerapan teknologi komputer yang berguna dalam memecahkan permasalahan biologis. Bioinformatika digunakan sebagai pengelola data interaksi antar protein dan struktur tiga dimensinya, cell imaging, ekspresi gen, dan lain sebagainya. Dalam penerapannya, bioinformatika membutuhkan beberapa perangkat seperti bahasa pemrograman dan juga system operasi yang dapat mendukung (Abraham, 2013).

Terdapat beberapa metode yang digunakan dalam pemodelan komputer dari bioinformatika dalam proses penemuan obat, di antaranya adalah mekanika molekuler, dinamika molekuler, mekanika kuantum, dan penambatan molekuler. Mekanika molekuler merupakan metode dalam menganalisa energi pada sebuah atom yang diasumsikan dalam kondisi diam sehingga mengurangi waktu komputansi dan lebih mudah digunakan. Dinamika molekuler menggunakan pendekatan sebaliknya, metode ini memungkinkan perhitungan energi dengan asumsi atom dalam keadaan bergerak dinamis. Mekanika kuantum bekerja dengan cara menghitung energi yang digunakan menggunakan pendekatan fisika kuantum. Sedangkan penambatan molekuler bekerja dengan cara menerapkan metode simulasi grafis tiga dimensi untuk mengamati interaksi yang terbentuk antara ligan dan reseptor (Thomas, 2013).

2.4.1. PubChem Compound

PubChem Compound adalah salah satu basis data yang terdapat dalam situs Pubchem yang dapat digunakan untuk mencari berbagai informasi mengenai senyawa aktif tanaman. Salah satu info yang terdapat dalam basis data ini adalah karakteristik, rumus kimia, berat molekul, dan lain sebagainya. PubChem Compound menyimpan berbagai macam struktur kimia dengan kandungan dan karakteristik yang khas dari PubChem Substance. Senyawa tersebut dapat dicari berdasarkan sifat kimia terukur dan digolongkan berdasarkan perbandingan struktur ke dalam kelompok yang memiliki kemiripan dan kesamaan identitas. Senyawa

tersebut dihubungkan melalui PubChem Substance untuk mendapatkan informasi aktivitas biologisnya. Situs PubChem Compound adalah <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (Bolton, Wang, Thiessen, & Bryant, 2008). Tampilan dari website PubChem Compound dapat dilihat pada gambar 2.2 berikut :

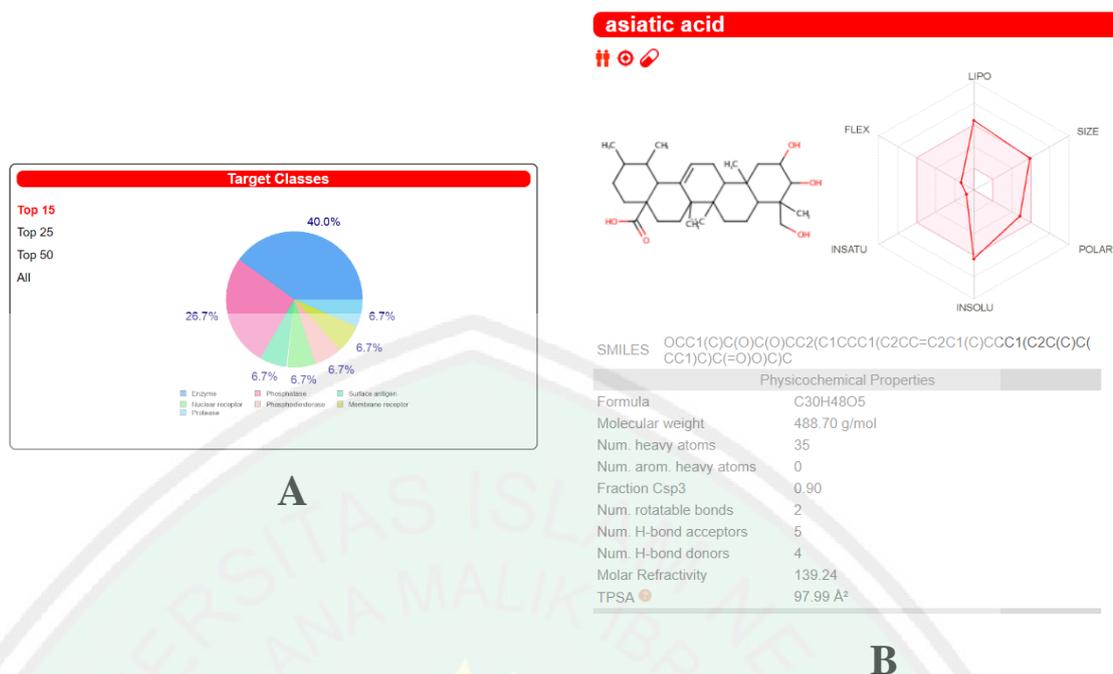
Asiatic acid

PubChem CID:	119034
Structure:	 Find Similar Structures
Molecular Formula:	$C_{39}H_{49}O_5$
Synonyms:	Asiatic acid 464-92-6 Dammarolic acid Asiatic acid Asiatic-acid More...
Molecular Weight:	488.7 g/mol
Dates:	Modify: 2019-12-14 Create: 2005-06-24

Gambar 2.2. Tampilan informasi senyawa Asiatic acid pada PubChem Compound (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

2.4.2. SwissADME

SwissADME merupakan salah satu aplikasi berbasis *online* yang dapat diakses secara gratis dan dikenal sebagai *physicochemical descriptor* dan sering digunakan untuk memprediksi aktivitas suatu senyawa berdasarkan strukturnya. Keunggulan dari aplikasi ini digunakan oleh berbagai kalangan untuk melakukan pencarian mengenai potensi suatu senyawa sebagai obat dengan cara membantu memprediksi aktivitasnya berdasarkan sifat fisikokimia dan juga memprediksi sifat farmakokinetik maupun farmakodinamikya. Keunggulan lain dari SwissADME adalah cara mempresentasikan hasil prediksi dari banyak senyawa tersebut sehingga lebih mudah dalam tahapan analisisnya dengan menampilkan *Swiss target prediction* yang akan menampilkan secara visual sederhana prediksi kemampuan senyawa dalam proses penghambatan enzim di dalam tubuh (Daina *et al.*, 2016). Tampilan *Swiss target prediction* dan SwissADME secara umum dapat dilihat pada gambar 2.3 berikut :



Gambar 2.3. A. Tampilan SwissADME dengan *Swiss target prediction*
B. Tampilan SwissADME dengan *physicochemical descriptor*

(<http://www.swissadme.ch/>)

2.5. Antioksidan

Allah subhanahu wa ta'ala berfirman dalam Al-Quran surah Yasin ayat 36 :

سُبْحٰنَ الَّذِيْ خَلَقَ الْاَزْوَاجَ كُلَّهَا مِمَّا تُنْبِتُ الْاَرْضُ وَمِنْ اَنْفُسِهِمْ وَمِمَّا لَا يَعْلَمُوْنَ

Artinya : “Maha Suci Tuhan yang telah menciptakan pasangan-pasangan semuanya, baik dari apa yang ditumbuhkan oleh bumi dan dari diri mereka maupun dari apa yang tidak mereka ketahui” (Yasin:36).

Ayat diatas ditafsirkan berdasarkan tafsir jalalain menunjukkan bahwa Allah telah menciptakan segala sesuatu secara berpasang-pasangan (الْأَزْوَاج). Jantan dan betina, baik dalam dunia hewan maupun tumbuh-tumbuhan, serta manusia dan makhluk hidup lainnya yang tak kasat mata dan belum diketahui manusia. Tidak ada sesuatu apapun diciptakan Allah mempunyai bersifat tunggal. Hanya Allah Subhanahu wa ta'ala yang mempunyai sifat tunggal karena tidak ada yang mampu menyerupainya (Jalalaini, 1990). Segala sesuatu telah diciptakan Allah mempunyai pasangan, termasuk zat antioksidan yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai pasangan berupa oksidan. Antioksidan merupakan

senyawa pasangan dari zat reaktif yang mampu mencegah terjadinya reaksi oksidasi sehingga kerusakan dalam sel tidak terjadi.

Antioksidan merupakan senyawa reduktan atau dapat juga dikatakan sebagai senyawa pendonor electron. Senyawa ini mampu mencegah berkembangnya reaksi oksidasi yang terjadi di dalam tubuh dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan dapat pula didefinisikan sebagai senyawa penghambat reaksi oksidasi, karena adanya antioksidan bersamaan dengan substrat yang dapat teroksidasi. Walaupun dalam konsentrasi yang rendah, antioksidan tetap bekerja sebagai pendonor elektron terhadap radikal bebas (Sunarni, 2017).

Dalam ilmu kimia, antioksidan diartikan sebagai senyawa-senyawa pemberi elektron, sedangkan dalam ilmu biologi antioksidan dapat diartikan sebagai molekul atau senyawa yang mampu meredam aktivitas radikal bebas dengan cara mencegah proses oksidasi pada sel (Syahrizal, 2013). Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dibedakan menjadi 3 kelompok, yaitu (Amnauaycheewa, 2010):

a. Antioksidan primer

Antioksidan primer merupakan antioksidan yang bekerja dalam mencegah terbentuknya radikal bebas baru serta mengubah radikal bebas menjadi molekul yang tidak merugikan. Contohnya adalah butyl hidroksi toluen (BHT), tokoferol alami maupun sintetik, tersier butyl hidro Quinon (TBHQ), alkil galat, dan propil galat (Amnauaycheewa, 2010).

b. Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder merupakan antioksidan yang sifatnya mencegah kerja prooksidan yaitu faktor-faktor yang mempercepat terjadinya reaksi oksidasi terhadap logam seperti : Pb, Fe, Mn, dan Cu. Antioksidan sekunder mempunyai fungsi sebagai penangkap radikal bebas sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar akibat terjadinya reaksi oksidasi. Contoh dari antioksidan sekunder ini adalah vitamin C, vitamin E, dan betakaroten yang dapat diperoleh dari buah-buahan (Cahyani, 2017).

c. Antioksan tersier

Antioksidan tersier merupakan senyawa antioksidan yang fungsinya untuk memperbaiki sel dan jaringan yang rusak akibat serangan radikal bebas. Contoh dari antioksidan tersier yakni enzim, misalnya enzim metionin sulfoksidan reduktase yang dapat memperbaiki DNA dalam inti sel (Amnauaycheewa. 2010).

2.5.1. Sumber-sumber antioksidan

Berdasarkan sumbernya, antioksidan menurut Setyowati (2011) dibedakan menjadi dua golongan yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami.

2.5.1.1. Antioksidan alami

Antioksidan alami menurut Purwaningsih (2012) adalah jenis antioksidan yang asalnya dari tumbuhan dan hewan. Antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan adalah senyawa fenolik berupa golongan flavonoid, triterpenoid, fenolik, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam organik polifungsional (Isnindar, 2011). Pada semua bagian tanaman baik pada akar, biji, kayu, daun, dan bunga maupun serbuk sari terdapat senyawa fenolik. Adapun flavonoid diketahui mempunyai sifat antioksidan yang mampu mereduksi radikal bebas (Sihotang, 2009).

2.5.1.2. Antioksidan sintetik

Antioksidan sintetik merupakan antioksidan yang berasal dari berbagai bahan kimia dengan tujuan produksi sebagai bahan obat-obatan dalam bidang farmakologi maupun bahan penambah vitamin dalam makanan. Jenis antioksidan sintesis yang umum digunakan dalam makanan adalah butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), dan profil galat. Pada saat ini penggunaan antioksidan sintetik mulai dibatasi karena beberapa antioksidan terbukti bersifat karsinogenik dan beracun terhadap hewan percobaan (Sihotang, 2009).

2.5.2. Uji antioksidan menggunakan DPPH

Metode uji DPPH merupakan suatu metode kolorimetri yang efektif dan cepat dalam memperkirakan aktivitas antiradikal/antioksidan. Uji ini seringkali digunakan dalam penelitian produk alami untuk isolasi antioksidan dari fitokimia dan juga uji kapasitas ekstrak dan senyawa murni dalam menyerap radikal bebas. Metode DPPH berfungsi untuk mengukur electron tunggal seperti aktivitas transfer

hydrogen dalam senyawa aktif sekaligus mengukur aktivitas penghambatan radikal bebasnya. (Pratimasari, 2009).

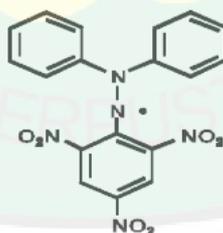
DPPH dengan gugus kimia 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil merupakan senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dengan tingkat absorbansi paling kuat berada pada λ max 517 nm dan berwarna ungu gelap. Hasil reaksi DPPH terhadap antioksidan akan mereduksi dan merubah warnanya menjadi kuning. Perubahan tersebut dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan cara diplotkan terhadap konsentrasi senyawa (Sunarni, 2015). Keberadaan sebuah antioksidan akan menyumbangkan electron kepada radikal bebas, dalam metode ini berupa DPPH. Reaksi tersebut menghasilkan perubahan warna menjadi kuning yang merupakan ciri spesifik dari reaksi radikal DPPH (Pratimasari, 2009). Penangkap radikal bebas oleh antioksidan akan menyebabkan electron mempunyai pasangan yang akan mengakibatkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah electron yang diikat (Sunarni, 2015). Pengurangan intensitas warna yang terjadi berhubungan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap atom hidrogen. Sehingga pengurangan intensitas warna mengindikasikan peningkatan kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas (Prakash, 2011).

Uraian DPPH (Ozyurt, 2015)

Nama Kimia : 1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazyl

Rumus Kimia : C₁₈H₁₂N₅O₆

Rumus Struktur :



Gambar 2.4. Rumus Struktur 1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazyl (Prakash, 2011)

Berat Molekul : 349,3

Titik Lebur : 127-1290 dan biasa dilaporkan 132-1330 C

Pemerian : Besar, membentuk prisma berwarna ungu gelap ketika benzen ditambah petrolatum eter

Kegunaan : Sebagai reagen analisis untuk mereduksi suatu substansi

Radikal bebas yang umumnya digunakan sebagai sampel dalam penelitian antioksidan atau peredam radikal bebas adalah jenis DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Metode DPPH merupakan metode deteksi yang sederhana, cepat, dan mudah dalam pengukuran aktivitas penangkap radikal beberapa senyawa aktif. selain itu, metode DPPH juga terbukti menghasilkan data yang akurat, reliabel dan praktis (Pratimasari, 2009).

Aktivitas antioksidan dapat dinyatakan dengan satuan persen (%) aktivitas. Nilai ini didapat dengan menggunakan rumus % inhibisi berikut (Molyneux, 2013).

$$\%Inhibisi = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Absorbansi blanko yang digunakan dalam prosedur penelitian adalah absorbansi DPPH dengan methanol pro analisa. Berdasarkan rumusan tersebut, semakin tinggi tingkat diskolorisasi yang ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang semakin kecil, maka nilai aktivitas penangkapan radikal bebas akan semakin tinggi (Molyneux, 2013).

Nilai aktivitas antioksidan pada metode DPPH dinyatakan dengan Inhibition Concentration (IC50). IC50 merupakan nilai yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas (DPPH) sebesar 50%. IC50 merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC50 menunjukkan tingkat aktivitas antioksidan yang semakin tinggi. Sebaliknya, semakin besar nilai IC50 menunjukkan tingkat aktivitas antioksidan yang semakin rendah. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika mempunyai nilai IC50 kurang dari 50 ppm, kuat jika IC50 bernilai 50-100 ppm, sedang untuk IC50 bernilai 100-150 ppm, dan lemah jika nilai IC50 bernilai 151-200 ppm, serta tidak aktif jika IC50 bernilai diatas 200 ppm (Blois, 2010).

2.6. Spektrofotometer UV-VIS

Spektrofotometer digunakan untuk mengukur spektrum serapan kandungan senyawa tumbuhan dalam larutan yang sangat encer dengan menggunakan pembanding berupa blangko pelarut. Senyawa tanpa warna diukur dengan menggunakan panjang gelombang 200-400 nm, sedangkan senyawa yang memiliki warna diukur dengan menggunakan panjang gelombang 400-800 nm. Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis ialah dengan memanfaatkan interaksi sinar ultraviolet atau cahaya tampak dengan molekul sampel. Energi cahaya akan mengeksitasi elektron terluar molekul menuju orbital lebih tinggi (Harbone, 1987).

Pada kondisi ini, elektron yang tidak stabil akan melepas energi untuk kembali ke tingkat dasar, dengan disertai emisi cahaya. Besarnya penyerapan cahaya sebanding dengan molekul, sesuai dengan hukum “Lambert-Beer” sebagai berikut : (Day, 2010)

$$A = \epsilon \cdot B \cdot C$$

Keterangan: (Day, 2010)

A = serapan

ϵ = absorptivitas molar

B = tebal tempat komponen

C = konsentrasi komponen

Berdasarkan panjang gelombang, sumber radiasi pada spektrofotometer UV-Vis terbagi menjadi 2, yaitu lampu deuterium dan tungstent. Lampu deuterium menghasilkan sinar dengan Panjang gelombang 160-500 nm, sedangkan Lampu tungsten menghasilkan sinar tampak dengan Panjang gelombang 350-3500 nm. Sumber radiasi dikatakan ideal jika memancarkan spektrum radiasi secara kontinyu dengan intensitas tinggi dan stabil pada semua Panjang gelombang.

Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam melakukan analisis spektrofotometri UV-Vis adalah sebagai berikut :

1. Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang yang digunakan dalam analisis kuantitatif adalah panjang gelombang dengan serapan maksimum. Untuk mendapatkan panjang gelombang dengan serapan maksimum, perlu dilakukan pembuatan kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku (blanko) pada konsentrasi tertentu (Rohman, 2007).

2. Pembuatan kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi dilakukan dengan pembuatan seri larutan baku (blanko) dari zat yang akan dianalisis dengan berbagai konsentrasi. Masing–masing absorbansi larutan dengan berbagai konsentrasi diukur, kemudian dibuat kurva yang menghubungkan antara absorbansi dengan konsentrasi. Jika kurva kalibrasi berupa garis lurus maka hukum Lambert-Beer terpenuhi atau positif (Day, 2010).

3. Pembacaan absorbansi sampel atau cuplikan

Absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer hendaknya berkisar antara 0,2 sampai 0,6. Anjuran ini berdasarkan anggapan bahwa pada kisaran nilai absorbansi tersebut merupakan kesalahan fotometrik paling minimal (Rohman, 2007).



BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode eksperimental eksploratif di laboratorium untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam nanopartikel pegagan (*Centella asiatica*). Tahapan awal dari penelitian ini adalah melakukan proses ekstraksi terhadap simplisia pegagan yang diperoleh dari UPT. Materia Medika Malang dengan menggunakan pelarut metanol. Kemudian ekstrak dibuat menjadi nanopartikel dengan penyalut kitosan menggunakan metode gelasi ionik yang dilanjutkan dengan sonikasi. Penggunaan kitosan berperan dalam reaksi gelasi ionik sebagai polikation yang bereaksi dengan polyanion berupa STPP sehingga dapat menghasilkan partikel yang berukuran nanometer. Tahapan selanjutnya dilakukan uji fitokimia yang terkandung dalam nanopartikel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dengan metode Liquid Chromatography - Mass Spektrofotometri (LC-MS) serta uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2018 – oktober 2019 di Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi, Laboratorium Kimia Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, dan Laboratorium Teknologi Farmasi Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.

3.3. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini meliputi :

1. Variabel bebas

Variable bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah konsentrasi nanopartikel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) tersalut kitosan dan konsentrasi ekstrak pegagan.

2. Variabel terikat

Variable terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah nilai IC50 dari uji aktivitas antioksidan dan jenis senyawa fitokimia yang terkandung dalam nanopartikel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) tersalut kitosan serta ekstrak pegagan.

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

Alat yang digunakan dalam tahapan penelitian ini adalah sebagai berikut : Neraca analitik (Sartorius), *hotplate* (Benstead/Thermolyne), stirer, gelas ukur (Iwaki), *beaker glass* (Iwaki), tabung reaksi (Iwaki), rak tabung reaksi, pipet tetes, vortex (Thermolyne), labu ukur 25 ml (Iwaki), labu ukur 5 ml (Iwaki), pipet ukur 10 ml (Iwaki), Bola hisap, Spektrofotometri UV-Vis, dan uji LC-MS adalah *vortex* (Thermolyne), *sentrifuge* (*Ultra-scientific*), *micropipet* (Bio-Rad), tip, kolom sepak C18 (*Hawach Scientific*), menggunakan autosampler (Thermo scientific) dan UPHLC (Thermo scientific).

3.4.1. Bahan

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia pegagan (*Centella asiatica*), ekstrak pegagan, nanopartikel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) aquades, STPP dan kitosan. Sedangkan bahan kimia yang digunakan dalam uji antioksidan adalah etanol, aquades, asam askorbat, dan DPPH. Sedangkan dalam uji LCMS menggunakan bahan berupa aquades, asam format, asetonitril, methanol.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Ekstraksi Pegagan

100 gram serbuk simplisia pegagan dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian ditambahkan 500 mL etanol 70%, ditutup dengan alumunium foil dan direndam selama 24 jam sambil di shaker pada kecepatan 130 rpm (Yenie, 2013). Setelah itu sampel disaring dengan penyaring *Buncher* dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama sampai tiga kali pengulangan.

Maserat (filtrat) yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai didapatkan ekstrak pekat (Yudhistira, 2012).

3.5.2. Pembuatan Nanopartikel Pegagan

Pembuatan nanopartikel pegagan dimulai dengan melarutkan 0,5% asam asetat glasial (AAG) dalam 100 ml aquades. Kemudian ditambahkan 0,5% kitosan pada larutan AAG dan dihomogenkan menggunakan bantuan *stirrer*. Setelah itu, ditambahkan larutan STPP 0,5% dalam 20 ml aquades dan dihomogenizer dengan kecepatan 1000 rpm. Setelah 10 menit, ditambahkan 0,1 gram ekstrak pegagan dan tetap dihomogenizer dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit.

Sampel kemudian dihomogenkan kembali dengan menggunakan Disperser dengan kecepatan 10.000 rpm selama 90 menit dengan penambahan 5 ml tween 80. Campuran yang diperoleh kemudian disonikasi dengan frekuensi 20 kHz pada amplitudo 80%. Dalam proses sonikasi ini, dilakukan perlakuan rentang waktu yakni selama 90 menit, 120 menit dan 150 menit. Hasil sonikasi kemudian dimasukkan ke dalam *tube* 15 ml untuk dilakukan proses sentrifugasi dan diambil pelletnya. Pellet dimasukkan ke dalam *deepfreezer* dan dikeringkan untuk memperoleh serbuk nanopartikel. Kemudian ditentukan ukuran, morfologi, gugus fungsi dan kristalinitas partikel menggunakan PSA, FITR, SEM dan XRD (Muchtarmah, *et al*, 2018).

3.5.3. Uji Kualitatif Senyawa Aktif Menggunakan LC-MS

Uji kuantitatif dengan mengukur kadar senyawa aktif yang terkandung dalam nanopartikel pegagan (*Centella asiatica*) yang tersalut kitosan dapat dilakukan menggunakan metode LC–MS yang prinsipnya dengan cara memisahkan dan mendeteksi senyawa tersebut dari senyawa yang lainnya berdasarkan berat molekul.

Analisis senyawa menggunakan metode LCMS dilakukan dengan beberapa tahapan, yakni :

3.5.3.1. Pengenceran Sampel

Dilarutkan nanopartikel ekstrak pegagan ke dalam pelarut metanol dengan konsentrasi 100 ppm tabung reaksi kemudian divortex hingga didapatkan larutan yang homogen. Langkah selanjutnya, dilakukan pemisahan padatan dilakukan

proses sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil supernatan untuk diproses ke tahap selanjutnya. Langkah yang sama dilakukan pula pada ekstrak pegagan.

3.5.3.2.Presipitasi Protein

Proses pemisahan protein dilakukan dengan cara diendapkan dengan menggunakan pelarut kimia. Langkah yang dilakukan untuk mengendapkan protein adalah diambil 2 ml supernatan yang telah diencerkan sebelumnya, dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, kemudian ditambahkan 3 ml asetonitril yang diasamkan dengan 0,2% asam format. Tahap selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 30 detik dan diambil supernatan yang diperoleh.

3.5.3.3.Pemurnian dengan SPE (Solid Phase Extraction)

Dimasukkan sampel pada Sep-Pak C18 Cartridge (1 cc, 100 mg) yang telah dikondisikan dengan 1 ml 80:20 (asetonitril : air), kemudian ditampung 0,5 ml larutan yang keluar. Setelah itu ditambahkan 1 ml sampel ke dalam kolom Sep – Pak dan ditampung kembali 0,5 ml larutan yang keluar. Larutan yang telah ditampung kemudian ditambahkan 0,5 ml larutan 80:20 asetonitril/air ke dalam kolom Sep – Pak dan diampung kembali sebanyak 0,5 ml larutan yang keluar.

Larutan hasil pemurnian sebanyak kemudian ditambahkan 0,25 ml 200 mM amonium format dalam larutan 50:50 asetonitril/metanol ke dalam kolom Sep-Pak. Setelah itu diambil 0,5 ml larutan yang keluar dan tambahkan dengan 0,2 ml larutan 25:75 asetonitril/buffer (25 mM amonium format pH 4,5). Larutan siap digunakan untuk diinjeksikan pada LCMS. Sebelum diinjeksikan, Larutan disaring terlebih dahulu dengan membran filter, cellulose acetate 0,45 μ m dan dilakukan degassing

3.5.3.4.Persiapan Larutan

Persiapan larutan sebelum diinjeksikan pada LCMS harus memenuhi syarat sebagai berikut :

- a) Botol larutan, botol harus dibersihkan dengan baik dan dalam kondisi kering, bebas dari kontaminan
- b) Semua larutan harus disaring dengan membran filter, cellulose acetate 0,45 μ m
- c) Semua larutan, setelah disaring, harus dilakukan *degassing*, untuk menghilangkan gas yang terdapat dalam larutan

3.5.3.5. Kondisi Operasi LCMS

Kadar senyawa aktif diuji dengan metode LC–MS pada kondisi operasi sebagai berikut: autosampler (suhu = 35⁰C, volume injeksi 1µl), UPLC dengan gradient (fase gerak = isocratic), kolom (2 mm x 150 mm x 3 µM), dan MS/MS. Metode validasi dilakukan guna memastikan akurasi dan presisi dari metode yang digunakan (Long, 2012).

Analisis LC-MS dilakukan pada methanol 90% + air Synapt G2 *quadrupole* waktu spektrometer massa penerbangan digabungkan ke kromatografi cair *ultraperformance* cair *Acquity* (UPLC) yang dilengkapi dengan detektor Array *photo diode array* (PDA). Pemisahan dicapai pada kolom methanol 90% + air UPLC BEH C18 (2 mm × 150 mm, ukuran partikel 3 µm) dengan *isocratic* sebagai fase gerak. Laju aliran adalah 0,5 ml/menit. Gradien yang digunakan dimulai untuk 30 detik pertama pada pelarut isocratic (Long, 2012).

Ionisasi electrospray diterapkan dalam mode negatif pada tegangan kapiler 3,0 kV, tegangan kerucut 23 V, suhu desolvasi 350° C dan pengaturan gas desolvasi 60 mL/jam. Metode akuisisi MS terdiri dari fungsi energi rendah pada tegangan perangkap 6 V dan fungsi energi tinggi di mana energi tumbukan perangkap ditingkatkan dari 15 hingga 60 V untuk menghasilkan data fragmentasi (MSE) (Long, 2012).

3.5.4. Analisis Potensi Senyawa Obat Oral Secara *In Silico* Berdasarkan Pendekatan Lipinski.

Analisis potensi senyawa obat dilakukan dengan cara mencari *canonical SMILES* (*simplified molecular-input line-entry system*) melalui database senyawa pada PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), setelah didapati *canonical SMILES*, dicari potensi senyawa tersebut melalui website SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) dan dimasukkan *canonical SMILES* pada kolom yang bertuliskan *Enter a list of SMILES* kemudian klik *run*. Setelah itu, Website akan menampilkan karakteristik senyawa yang dicari berdasarkan pendekatan Lipinski dan juga target penghambatan senyawa dalam tubuh

3.5.5. Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

3.5.4.1. Pembuatan larutan DPPH 0,2 mM

Serbuk DPPH (BM 394,32) 1.97 mg dilarutkan dalam 25 ml etanol kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml, setelah itu dicukupkan volumenya dengan etanol sampai tanda batas (DPPH 0,2 mM) (Killedar, 2013).

3.5.4.2. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1.5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan larutan etanol sebanyak 1.5 ml dan di vortex hingga homogen lalu dituang ke dalam kuvet sebanyak 3 ml dan diukur pada panjang gelombang 400-800 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Musfiroh, 2009). Panjang gelombang maksimal menurut (Khomdram, 2010) dalam pengukuran absorbansi terhadap aktivitas antioksidan adalah pada Panjang gelombang 517 nm.

3.5.4.3. Pembuatan larutan blanko

Sebanyak 1.5 ml larutan DPPH 0,1 mM dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan etanol sebanyak 1.5 ml dan divortex hingga homogen, diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit (Molyneux, 2013) kemudian diukur panjang gelombang optimal yang telah diukur sebelumnya (517 nm).

3.5.4.4. Pembuatan larutan pembanding

a. Pembuatan larutan induk konsentrasi 100 ppm

asam askorbat (Vitamin C) digunakan sebagai pembanding kemudian ditimbang sebanyak 2 mg dan dilarutkan dengan etanol lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 20 ml, volume dicukupkan hingga mencapai 20 ml (Karinda, 2013).

b. Pembuatan larutan uji seri konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm

Larutan induk asam askorbat (vitamin C) digunakan sebagai pembanding dan dibuat seri konsentrasi sebesar 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm. Dari larutan induk 100 ppm dipipet 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, dan 5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, lalu ditambahkan etanol hingga mencapai konsentrasi 5 ml (Cahyani, 2017).

c. Pengukuran serapan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 1,5 mL larutan uji pembanding (asam askorbat) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 ml dan di vortex hingga homogen, di inkubasi selama 30 menit dalam ruangan gelap (Molyneux, 2004) kemudian diukur serapan pada panjang gelombang 517 nm.

3.5.4.5. Penentuan persen inhibisi

a. Pembuatan larutan induk konsentrasi 100 ppm

nanopartikel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) tersalut kitosan ditimbang sebanyak 2 mg, dilarutkan dengan etanol lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 20 ml, kemudian dicukupkan volumenya hingga tanda batas (20 ml) dengan etanol pro analisa (Cahyani, 2017).

b. Pembuatan larutan uji seri konsentrasi (ppm)

Larutan induk nanopartikel pegagan tersalut kitosan diencerkan dengan seri konsentrasi sebesar 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm. Dari larutan induk 100 ppm dipipet 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml dan 5 μ dimasukkan ke dalam labu ukur dengan volume 5 ml, kemudian ditambahkan dengan etanol hingga konsentrasi 5 ml (Cahyani, 2017).

c. Pengukuran serapan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 1,5 ml larutan uji nanopartikel pegagan tersalut kitosan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 ml dan di vortex hingga homogen, di inkubasi selama 30 menit dalam ruangan gelap (Molyneux, 2004) kemudian diukur serapan pada panjang gelombang 517 nm (Cahyani, 2017).

3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengukuran spektrofotometer kemudian diukur persentase inhibisi dengan melakukan perhitungan dengan menggunakan rumus sebagai berikut : (Ghosal, 2012)

$$\%Inhibisi = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Hasil perhitungan IC50 menunjukkan tingkat aktivitas antioksidan. Nilai IC50 mulai dari 0-50 menunjukkan aktivitas antioksidan sangat kuat, nilai 50-100

menunjukkan aktivitas antioksidan kuat, nilai 100-250 menunjukkan aktivitas antioksidan sedang, nilai 250-500 menunjukkan aktivitas antioksidan lemah, dan nilai lebih dari 500 menunjukkan aktivitas antioksidan tidak aktif (Faustino, 2010). Adapun analisis data fitokimia menggunakan metode LC-MS berupa kromatogram dengan data waktu retensi (RT) dan nilai m/z yang merupakan nilai massa. Hasil kedua data tersebut kemudian dibandingkan dengan *library* pada alat LC-MS sehingga menghasilkan daftar senyawa yang terkandung. Senyawa-senyawa yang terkandung kemudian dilakukan analisis terhadap potensi sebagai senyawa obat secara oral dengan menggunakan *database* berupa swissADME (<http://www.swissadme.ch>).



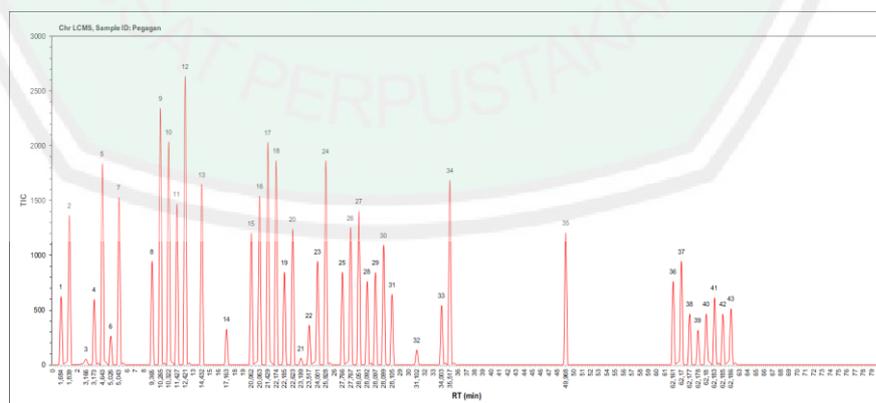
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan uji yang telah dilakukan terhadap nanopartikel ekstrak pegagan (NEP) dan ekstrak pegagan (EP) didapati hasil berupa data senyawa aktif dan aktivitas antioksidan dari NEP dan EP serta potensi senyawa pegagan berdasarkan pendekatan Lipinski. Data yang diperoleh kemudian dilakukan analisis secara deskriptif kualitatif.

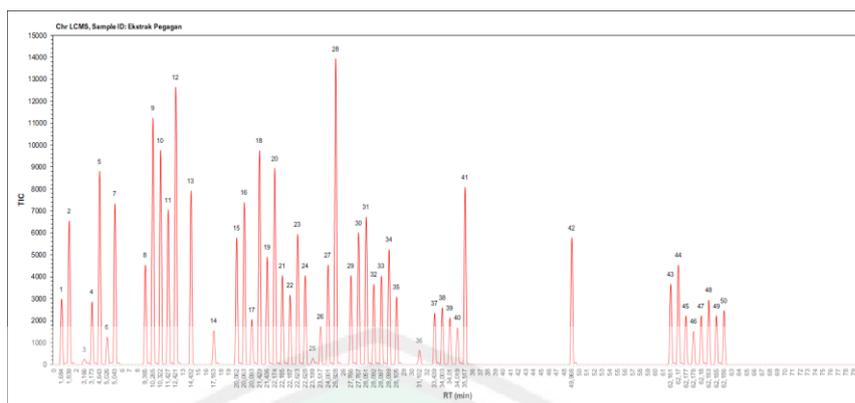
4.1. Analisis Senyawa Fitokimia Menggunakan LCMS

LC-MS merupakan salah satu metode analisis untuk mengetahui kandungan senyawa pada suatu bahan dengan memanfaatkan prinsip kerja gabungan dari metode pemisahan fisik menggunakan kromatografi cair dan kemampuan analisis menggunakan metode spektrometer massa (Khotimah, 2016). Metode ini digunakan dengan alasan efisiensi karena penggunaan bahan yang sedikit dan mampu mengetahui berbagai senyawa dalam rentang yang luas. Menurut Annisa (2012) LCMS mampu memisahkan senyawa organik seperti nano molekul, mikromolekul, metabolit sekunder pada tanaman, molekul obat, dan protein.

Hasil analisis LCMS ditemukan sebanyak 43 jenis senyawa pada NEP dan 50 jenis senyawa pada EP. Hasil kromatogram NEP dapat dilihat pada gambar 4.1 dan EP pada gambar 4.2



Gambar 4.1. Kromatogram LCMS Nanopartikel Ekstrak Pegagan



Gambar 4.2. Kromatogram LCMS Ekstrak Pegagan

Kromatogram tersebut kemudian diinterpretasikan kedalam bentuk tabel berdasarkan waktu retensi (Rt), persentase area (%area), berat molekul (m/z), rumus molekul dan jenis senyawa yang dapat dilihat pada tabel 4.1 berikut :

Tabel 4.1. Senyawa yang terkandung dalam pegagan menggunakan metode LCMS

Analisis LCMS Senyawa Pegagan								
NO	Rt (Min)	%Area		m/z	Rumus Molekul	Senyawa Aktif	NEP*	EP**
		NEP*	EP**					
1	1,684	1,39803	1,24997	162,03	C ₉ H ₆ O ₃	Umbelliferone	Ada	Ada
2	1,839	3,06101	2,73683	164,04	C ₉ H ₈ O ₃	p-coumaric acid	Ada	Ada
3	3,166	0,11771	0,10524	176,03	C ₆ H ₈ O ₆	Ascorbic acid	Ada	Ada
4	3,173	1,33817	1,19644	176,04	C ₁₀ H ₈ O ₃	7-methoxycoumarin	Ada	Ada
5	4,643	4,11923	3,68297	180,04	C ₉ H ₈ O ₄	Caffeic acid	Ada	Ada
6	5,026	0,59109	0,52849	192,07	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	Myristicin	Ada	Ada
7	5,043	3,42896	3,06581	194,05	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Ferulic acid	Ada	Ada
8	9,365	2,12261	1,89761	270,05	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Apigenin	Ada	Ada
9	10,265	5,25188	4,69566	286,04	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Luteolin	Ada	Ada
10	10,322	4,56858	4,08474	286,04	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol	Ada	Ada
11	11,427	3,29587	2,94681	302,04	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetin	Ada	Ada
12	12,421	5,90491	5,27953	354,09	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Chlorogenic acid	Ada	Ada
13	14,432	3,69831	3,30663	418,09	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	Kaempferol-3-arabinoside	Ada	Ada
14	17,163	0,73148	0,65401	414,38	C ₂₉ H ₅₀ O	β-sitosterol	Ada	Ada
15	20,062	2,69992	2,41398	432,10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Kaempferol-7-rhamnoside	Ada	Ada
16	20,063	3,45370	3,08793	432,10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Kaempferol-4'-rhamnoside	Ada	Ada
17	20,093	-	0,85934	432,10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Apigenin-7-O-glucoside	-	Ada
18	21,429	4,55669	4,07410	432,10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Kaempferol-3-O-rhamnoside	Ada	Ada
19	21,432	-	2,04594	434,08	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	Quercetin-3-arabinoside	-	Ada

20	22,174	4,17977	3,73710	448,10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Quercetin-3-O-rhamnoside	Ada	Ada
21	22,185	1,89793	1,69692	448,10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Kaempferol-5-glucoside	Ada	Ada
22	22,187	-	1,32292	448,10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Luteolin-4'-glucoside	-	Ada
23	22,623	2,77876	2,48447	448,10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Kaempferol-3-O-glucoside	Ada	Ada
24	22,628	-	1,69506	448,10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Luteolin-7-glucoside	-	Ada
25	23,199	0,13949	0,12472	450,35	C ₃₁ H ₄₆ O ₂	Phylloquinone (Vit K)	Ada	Ada
26	23,517	0,81337	0,72722	456,36	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	Betulinic acid	Ada	Ada
27	24,001	2,12257	1,89777	463,08	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	Quercetin-3-glucoside	Ada	Ada
28	25,928	4,17793	5,82484	488,35	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	Asiatic acid	Ada	Ada
29	27,766	1,89823	1,69719	488,35	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	Madasiatic acid	Ada	Ada
30	27,767	2,81125	2,51351	488,35	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	Centellasapogenol A	Ada	Ada
31	28,051	3,14551	2,81238	502,36	C ₃₁ H ₅₀ O ₅	Methyl asiatate	Ada	Ada
32	28,092	1,71080	1,52961	504,34	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	Isotankunic acid	Ada	Ada
33	28,097	1,89150	1,69117	504,34	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	Madecassic acid	Ada	Ada
34	28,099	2,45329	2,19347	504,34	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	Brahmoside	Ada	Ada
35	28,105	1,44327	1,29041	504,34	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	Terminolic acid	Ada	Ada
36	31,102	0,30641	0,27396	536,43	C ₄₀ H ₅₆	β-carotene	Ada	Ada
37	33,439	-	0,98143	578,16	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	apigenin-7-O-rutinoside	-	Ada
38	34,003	1,21667	1,08782	594,15	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol-7-rhamnoside-4'-glucoside	Ada	Ada
39	34,01	-	0,89277	740,19	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₇	apigenin-7-rutinoside-4'-transcaffate	-	Ada
40	34,019	-	0,70390	594,15	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	luteolin-7-O-rutinoside	-	Ada
41	35,517	3,77821	3,37806	610,15	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutin	Ada	Ada
42	49,968	2,70461	2,41817	828,45	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₆	Centellasaponin B	Ada	Ada
43	62,161	1,71203	1,53072	942,51	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	Asiaticoside F	Ada	Ada
44	62,17	2,12269	1,89788	958,51	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	Asiaticoside	Ada	Ada
45	62,177	1,03926	0,92920	959,51	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	Centellasaponin C	Ada	Ada
46	62,178	0,71022	0,63501	959,51	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	Centellasaponin D	Ada	Ada
47	62,18	1,04069	0,93048	959,51	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	Centellasaponin A	Ada	Ada
48	62,183	1,37585	1,23013	970,51	C ₄₉ H ₇₈ O ₁₉	Scheffuroside B	Ada	Ada
49	62,185	1,03934	0,92927	974,50	C ₄₈ H ₇₈ O ₂₀	Asiaticoside B	Ada	Ada
50	62,186	1,15220	1,03017	974,50	C ₄₈ H ₇₈ O ₂₀	Asiaticoside A	Ada	Ada
Ket :		 Triterpenoid	 Vitamin	* NEP = Nanopartikel Ekstrak Pegagan				
		 Flavonoid	 Fenolik	** EP = Ekstrak Pegagan				
		 Asam Klorogenat	 Saponin					

Data di atas menunjukkan perbedaan kandungan senyawa aktif antara NEP dan EP. Konsentrasi senyawa aktif paling rendah pada kedua sampel adalah asam askorbat dengan konsentrasi 0,11% (NEP) dan 0,10% (EP). Sedangkan konsentrasi

senyawa paling besar pada NEP ditunjukkan oleh senyawa *asiaticoside* dengan konsentrasi sebesar 6,01%, dan pada ekstrak pegagan konsentrasi senyawa paling besar ditunjukkan oleh asam asiatik dengan konsentrasi sebesar 5,8%. Pada senyawa lain, konsentrasi senyawa pada NEP lebih banyak dibandingkan dengan EP kecuali pada asam asiatik. Hal tersebut dapat dikarenakan jumlah senyawa yang terekspresi pada NEP lebih sedikit dibandingkan dengan senyawa pada EP.

Terdapat 7 jenis senyawa yang ditemukan pada EP, senyawa tersebut merupakan senyawa turunan dari senyawa luteolin sebanyak 4,33% (*luteolin-7-O-rutinoside* (1,32%) yang terekspresi dalam waktu retensi pada menit ke 22,187, *luteolin-7-glucoside* (1,69%) yang terekspresi pada menit ke 22,628 dan *luteolin-4'-glucoside* (1,32%) yang terekspresi pada menit ke 34,019), apigenin (*apigenin-7-rutinoside-4'-transcaffete* (0,98%) yang terekspresi pada menit ke 20,093, *apigenin-7-O-glucoside* (0,85%) dan *apigenin-7-O-rutinoside* (0,85%) yang terekspresi pada menit ke 20,093), dan quercetin (*quercetin-3-arabinoside* (2,04%) yang terekspresi pada menit ke 21,432). Senyawa tersebut tidak dapat terekspresi pada NEP dapat dimungkinkan karena proses sonikasi yang dilakukan saat pembuatan nanopartikel. Nanopartikel memanfaatkan gelombang ultrasonic untuk memecah partikel. Selain itu, proses sonikasi juga dapat menseleksi jenis senyawa aktif yang terekspresi berdasarkan frekuensi gelombang dan lama sonikasi yang dilakukan. Menurut Sondari (2016) proses sonikasi mampu menghasilkan rendemen tinggi dengan senyawa aktif selektif berdasarkan frekuensi gelombang dan besarnya intensitas perlakuan terhadap sampel.

Selain itu, terdapat pula beberapa senyawa yang merupakan senyawa khas yang sering ditemukan dalam pegagan pada kedua sampel, yakni *umbelliferone*, *asiatic acid*, *brahmoside*, *isothankunic acid*, *madecassic acid*, *terminolic acid*, *asiaticoside*, *centellasaponin*, dan *scheffuroside*. Menurut Zahara (2014), senyawa yang seringkali ditemukan dalam pegagan adalah asiatikosida, brahmosida, asam madekasik dan centellasaponin sehingga senyawa tersebut dapat dikategorikan sebagai senyawa khas pegagan.

Pada NEP senyawa *umbelliferone* terekspresi sebesar 1,39%, asam asiatik sebesar 4,17% dengan waktu retensi pada menit ke 25,928, *brahmoside* sebesar 2,45% pada menit ke 28,099, asam *isothankunic* sebesar 1,71% pada menit ke

28,092, asam madecassik sebesar 1,89% pada menit ke 28,097, asam terminolik sebesar 1,44% pada menit ke 28,105, asiaticosida sebesar 6,01% pada menit ke 62, centellasaponin sebesar 5,48% pada menit ke 62, dan scfeffurosida sebesar 1,37% pada menit ke 62,183. Sedangkan pada EP senyawa umbelliferone terekspresi sebesar 1,24%, asam asiatik terekspresi sebesar 5,82%, brahmoside terekspresi sebesar 2,19%, asam isotankunic terekspresi sebesar 1,52%, asam madecassic terekspresi sebesar 1,69%, asam terminolic terekspresi sebesar 1,29%, asiaticoside terekspresi sebesar 5,35%, centellasaponin terekspresi sebesar 4,98%, dan scfeffurosida terekspresi sebesar 1,23%. Adapun waktu retensi pada semua senyawa yang terdapat pada EP terekspresi pada menit yang sama dengan NEP.

Pegagan diketahui mempunyai berbagai manfaat bagi kesehatan, beberapa manfaat pegagan menurut Orhan (2012), pegagan dapat digunakan untuk mengobati luka luar, diabetes, *neuroprotective*, anti-inflamasi, dan juga mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi. Kemampuan pegagan dalam kesehatan tidak lepas dari senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. *Asiaticoside* dan *madecassic acid* merupakan senyawa antioksidan yang mempunyai manfaat sebagai agen penyembuh luka (Seevaratnam, 2012), sedangkan brahmoside mampu memperlancar aliran darah dan sebagai protein penting bagi sel otak (Lachman, 2009). *Centellasaponin* merupakan senyawa pelindung kulit yang telah terbukti mampu menginduksi sintesis kolagen tipe 1 pada sel fibroblast kulit manusia (Seevaratnam, 2012).

Asiatic acid atau asam asiatik merupakan senyawa khas yang memiliki peran sebagai agen *neuroprotective*, fungsi ini dikarenakan asam asiatik mampu menjaga aliran darah menuju otak dengan cara melindungi fungsi mitokondria. Senyawa ini juga diketahui mampu merusak membran sel pada bakteri dengan cara meningkatkan pelepasan ion kalium dan nukleotida pada *Staphylococcus aureus* sehingga dapat dikatakan bersifat sebagai antimikroba. (Junwey, 2018). Selain itu, senyawa ini juga mempunyai sifat sebagai anti-diabetes, anti-kanker, dan juga anti-inflamasi.

Senyawa-senyawa khas pegagan yang telah dijelaskan di atas merupakan derivat dari senyawa triterpenoid. Menurut Widiyati (2006), triterpenoid merupakan metabolit sekunder yang mempunyai aktifitas fisiologis paling tinggi

sehingga seringkali dimanfaatkan sebagai obat diabetes, malaria, kerusakan hati, dan gangguan kulit. Adapun bagi tumbuhan, senyawa ini bermanfaat sebagai anti fungi, anti bakteri, insektisida dan anti virus. Dalam penelitian, selain senyawa khas pegagan yang telah disebutkan, adapula senyawa lain yang tergabung dalam senyawa triterpenoid. Senyawa tersebut adalah *betulinic acid* yang terekpresi pada menit 23,517 dengan konsentrasi sebesar 0,81% pada NEP dan 0,72% pada EP. *Betulinic acid* mempunyai manfaat sebagai anti kanker dan anti tumor dengan cara menghambat pertumbuhan sel melanoma (Hordyjewska, 2019). Adapun Lee (2015), menambahkan bahwa *benulinic acid* secara dependen menunjukkan aktivitas penghambat proliferasi dan menginduksi proses apoptosis pada neuroblastoma dan apoptosis garis sel melanoma.

Selain triterpenoid, golongan senyawa lain yang terkandung dalam pegagan adalah senyawa fenolik, berupa flavonoid dan saponin serta vitamin A dan K. Menurut Hanin (2017), senyawa Fenolik merupakan golongan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan sebagai respon terhadap stress lingkungan. Salah satu golongan senyawa paling besar adalah flavonoid. Senyawa yang tergabung dalam golongan senyawa flavonoid dalam penelitian ini adalah apigenin yang terekpresi pada menit ke 9,365 dengan konsentrasi sebesar 2,12% pada NEP dan 1,89% pada EP, kemudian luteonin terekpresi pada menit ke 10,265 dengan konsentrasi sebesar 5,25% pada NEP dan 4,69% pada EP, adapun kaempferol terekpresi pada menit ke 10,322 dengan konsentrasi sebesar 4,56% pada NEP dan 4,08% pada EP dan quercetin terekpresi pada menit ke 11,427 dengan konsentrasi sebesar 3,29% pada NEP dan 2,94% pada EP.

Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa precursor yang merupakan senyawa pendahulu dari senyawa lain dalam jalur metabolisme. Senyawa kaempferol merupakan senyawa prekursor pembentukan senyawa kaempferol-3-arabinoside, kaempferol-7-rhamnoside, kaempferol-4'-rhamnoside, kaempferol-3-O-rhamnoside, kaempferol-5-glucoside, kaempferol-3-O-glucoside, dan kaempferol-7-rhamnoside-4'-glucoside. Adapun quercetin juga merupakan senyawa prekursor pembentukan senyawa quercetin-3-O-rhamnoside dan quercetin-3-O-glikoside (rutin).

Flavonoid merupakan senyawa aktif yang terdapat pada semua tumbuhan hijau sehingga dapat ditemukan pada setiap ekstrak tumbuhan hijau. Senyawa flavonoid juga merupakan senyawa yang mempunyai berbagai manfaat bagi kesehatan tubuh termasuk anti virus, anti-inflamasi, kardioprotektif, anti-diabetes, anti kanker, anti penuaan, antioksidan (Arifin, 2018). Dalam pegagan, derivat flavonoid yang telah disebutkan di atas mempunyai berbagai manfaat bagi kesehatan yakni sebagai obat anti diabetes, agen penenang (Salehi, 2019), cardioprotective (Luo, 2017), anti kanker, anti inflamasi, dan antioksidan (Montano, 2011), serta mampu mengobati Alzheimer dengan cara memecah gugus polipeptida berupa beta amiloid yang merupakan komponen pembentuk plak amiloid (Indra, 2017).

Senyawa fenolik lain yang terdapat dalam pegagan adalah *chlorogenic acid* yang terekspresi pada menit ke 12,421 dengan konsentrasi sebesar 5,90% pada NEP dan 5,27% pada EP, kemudian ditemukan *ferulic acid* pada menit ke 5,043 dengan konsentrasi sebesar 3,42% pada NEP dan 3,06% pada EP, adapun *p-coumaric acid* ditemukan pada NEP sebesar 3,06% dan 2,73% pada EP di menit ke 1,893, serta *caffeic acid* ditemukan pada menit ke 4,634 dengan konsentrasi sebesar 4,11% pada NEP dan 3,68% pada EP. Senyawa ini diketahui mempunyai manfaat sebagai senyawa antioksidan. *Ferulic acid*, *p-coumaric acid* dan *caffeic acid* merupakan senyawa yang tergabung dalam golongan senyawa asam klorogenat. Asam klorogenat menurut Farhaty (2012), merupakan senyawa fenolik yang bermanfaat bagi tumbuhan dan manusia. Senyawa ini digunakan tumbuhan sebagai pelindung dari serangan mikroorganisme, serangga dan juga radiasi UV. Sedangkan pada manusia, senyawa ini memberikan manfaat sebagai senyawa antioksidan, anti diabetes, hepatoprotektif, dan antivirus. Sebagai antivirus, asam klorogenat diketahui mampu menghambat replikasi HBV pada virus hepatitis B. Sebagai anti-diabetes, asam klorogenat diketahui mampu mengatur metabolisme lemak dan glukosa dalam tubuh melalui aktivasi AMPK sehingga mampu menghambat ekspresi glukosa-6-fosfatase (G6Pase), meningkatkan glukosa puasa, toleransi glukosa dan sensitivitas insulin. Xiong (2016), menjelaskan bahwa G6Pase merupakan enzim yang berperan dalam menghambat proses

gluconeogenesis pada jalur PI3k / Akt / mTOR dengan cara mengurangi deposisi lipid yang disebabkan oleh insulin pada hepatosit.

Semua senyawa yang terkandung dalam pegagan diketahui mempunyai potensi sebagai obat berdasarkan berbagai literatur yang telah dijelaskan sebelumnya. Akan tetapi, setiap senyawa mempunyai jalur yang berbeda dalam mencapai target sel untuk dapat menunjukkan efek farmakologis maksimal. Salah satu jalur masuk obat ke dalam tubuh yang sering dilakukan dalam pengobatan adalah melalui oral. Pemberian obat melalui oral karena merupakan cara yang paling mudah dan aman terhadap tubuh.

4.2. Potensi Obat Oral Senyawa Pegagan Berdasarkan Pendekatan Lipinski

Dari 50 senyawa yang terkandung dalam pegagan, tersisa 10 senyawa yang berpotensi sebagai obat oral (Tabel 4.2). Sebagian besar merupakan senyawa yang larut dalam air kecuali asiatic acid yang memiliki nilai kelarutan rendah dan madasiatic acid serta centellasapogenol A yang memiliki nilai kelarutan menengah. Selain itu, ke 10 senyawa aktif memenuhi persyaratan lain sebagai senyawa obat berdasarkan uji Lipinski. Menurut Kesuma (2018), Uji Lipinski merupakan aturan praktis yang digunakan untuk mengevaluasi kesamaan obat atau untuk menentukan apakah suatu senyawa mempunyai aktivitas farmakologis atau biologis tertentu sehingga dapat digunakan menjadi obat aktif secara oral pada manusia.

Sebagian senyawa pada tabel 4.2 juga mempunyai nilai LD50 di atas 1000 yang menunjukkan bahwa semua senyawa tersebut dapat digunakan dalam dosis tinggi kecuali *centellasapogenol A*, *isothankunic acid* dan *terminolic acid* yang memiliki LD dibawah 1000. Sedangkan tingkat bioavailabilitas oral yang terdapat pada semua senyawa termasuk dalam kategori bagus berdasarkan uji Lipinski yang ditunjukkan dengan garis merah yang terletak didalam heksagon berwarna merah muda sehingga sangat cocok digunakan sebagai obat dengan pemberian secara oral. Pengetahuan mengenai LD50 penting dilakukan untuk mengetahui besaran dosis yang diperlukan dalam pengobatan. Angka LD50 seringkali digunakan dalam penelitian sebagai indikator umum toksisitas suatu zat (Mosaad, 2017).

Tabel 4.2. Potensi dan Bioavaibilitas Obat Senyawa Pegagan

Senyawa Aktif Dengan Potensi Obat Berdasarkan Metode Lipinski							
No	Senyawa	Kelarutan Dalam Air	Penyerapan Pada Pencernaan	Kemiripan Dengan Obat	LD50	Bioavaibilitas Oral	Prediksi Target Penghambatan Oleh Senyawa
1	Asam askorbat	Sangat larut	Tinggi	Ya	11.900 mg/kg		
2	Myristicin	Larut	Tinggi	Ya	1595 mg/kg		
<p>Ket : sifat fisikokimia senyawa obat ditandai dengan garis merah yang berada dalam heksagonal berwarna merah muda.</p> <p>6 sifat oral bioavaibilitas senyawa obat</p> <p>a. Lipo : lipopolisitas < 5</p> <p>b. Size : ukuran < 500 g/mol</p> <p>c. Polar : polaritas < 130 Å²</p> <p>d. Insolu : Insolubilitas < 6</p> <p>e. Insatu : Insaturasi < 1</p> <p>f. Flex : Fleksibilitas < 9</p>							

7	Asam Isothankunic	Larut	Tinggi	Ya	675 mg/kg		
8	Asam madecassic	Larut	Tinggi	Ya	2000 mg/kg		
<p>Ket : sifat fisikokimia senyawa obat ditandai dengan garis merah yang berada dalam heksagonal berwarna merah muda.</p> <p>6 sifat oral bioavaibilitas senyawa obat</p> <p>a. Lipo : lipopolisitas < 5</p> <p>b. Size : ukuran < 500 g/mol</p> <p>c. Polar : polaritas < 130 Å²</p> <p>d. Insolu : Insolubilitas < 6</p> <p>e. Insatu : Insaturasi < 1</p> <p>f. Flex : Fleksibilitas < 9</p>							

9	Brahmoside	Larut	Tinggi	Ya	1650 mg/kg		
10	Asam terminolic	Larut	Tinggi	Ya	800 mg/kg		
<p>Ket : sifat fisikokimia senyawa obat ditandai dengan garis merah yang berada dalam heksagonal berwarna merah muda.</p> <p>6 sifat oral bioavaibilitas senyawa obat</p> <p>d. Lipo : lipopolisitas < 5</p> <p>e. Size : ukuran < 500 g/mol</p> <p>f. Polar : polaritas < 130 Å²</p> <p>d. Insolu : Insolubilitas < 6</p> <p>e Insatu : Insaturasi < 1</p> <p>f. Flex : Fleksibilitas < 9</p>							

Terdapat 5 syarat yang digunakan dalam aturan Lipinski menurut Adriani (2018), yaitu suatu senyawa mempunyai berat molekul kurang dari 500 dalton, mempunyai tingkat lipophilicity tinggi, mempunyai kurang dari 5 donor ikatan hydrogen, dan memiliki kurang dari 10 penerima ikatan hydrogen serta mempunyai refraksitas molar antara 40-330.

Aturan Lipinski digunakan dalam penentuan sifat fisikokimia sel dalam menentukan karakter hidrofobik/hidrofilik suatu senyawa dalam melewati membran sel dengan cara difusi pasif. Nilai log P (*lipophilicity*) menyatakan koefisien kelarutan dalam lemak/air yang memiliki rentang antara -0,4 – 5, dan berat molekul obat yang sesuai harus berada dibawah 500 Dalton sehingga mampu berdifusi menembus membran sel. Semakin besar nilai log P, maka molekul tersebut mempunyai sifat yang semakin hidrofobik. Nilai log P yang terlalu negatif juga tidak baik karena molekul tersebut tidak dapat melewati membran lipid bilayer (Lipinski, 1997).

Molekul dengan sifat yang terlalu hidrofobik cenderung memiliki tingkat toksisitas yang tinggi karena akan tertahan lebih lama pada membran lipid bilayer dan akan terdistribusi lebih luas di dalam tubuh sehingga selektivitas ikatan terhadap enzim target menjadi berkurang. Selain itu, Jumlah donor ikatan hydrogen harus kurang dari 5 dan akseptor ikatan hidrogen harus kurang dari 10. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen, maka semakin tinggi pula energi yang dibutuhkan pada proses absorpsi yang terjadi. Secara umum aturan Lipinski menggambarkan solubilitas senyawa tertentu untuk menembus membran sel oleh difusi pasif (Lipinski, 1997).

Sebagian besar senyawa yang terkandung dalam pegagan mampu menghambat enzim *aldo-keto reductase* dengan persentase penghambatan di atas 20%. Senyawa tersebut adalah asam asiatic dengan persentase penghambatan 46,7%, asam madasiatic, asam madekasik dan asam isothankunik mempunyai persentase penghambatan sebesar 40%, kemudian centellasapogenol A dan asam terminolik sebesar 33,3%, dan asam ferulic yang mempunyai persentase penghambatan sebesar 20%. Menurut Barski (2019), enzim *aldo-keto reductase* terbagi menjadi 16 jenis, beberapa diantaranya adalah *aldehyde reductase*, *prostaglandin F sintase*, *xilosa reductase* dan *aldose reductase* yang merupakan

jenis enzim dengan efek penghambatan paling besar. Enzim *aldose reductase* merupakan enzim yang berperan dalam proses sintesis gula darah (Krismanita, 2017). Proses penghambatan ini terjadi pada jalur poliol yang mengakibatkan pengurangan pembentukan glukosa menjadi sorbitol. Sorbitol sendiri merupakan jenis alkohol hidrofilik dan polihidroksi yang kuat sehingga sorbitol sukar berdifusi melalui membrane sel dan akan terakumulasi dalam sel yang akan mengakibatkan stress osmotik yang akhirnya akan mengarah pada komplikasi diabetes (Grewal, 2016).

Jalur poliol merupakan proses metabolisme dua langkah dengan cara mereduksi glukosa menjadi sorbitol, kemudian sorbitol akan dikonversi kembali menjadi fruktosa. Enzim yang berperan dalam proses metabolisme ini terdiri dari enzim *aldose reductase* dengan kofaktornya NADPH yang akan mengkatalisis proses reduksi glukosa menjadi sorbitol. Adapula enzim *sorbitol dehidrogenase* (SDH), dengan co-factor berupa NAD⁺ yang akan mengoksidasi sorbitol menjadi fruktosa (Grewal, 2016).

Dalam kasus hiperglikemia, konsentrasi glukosa yang lebih tinggi akan menstimulasi enzim *aldose reductase* menjadi aktif dan akan mengurangi aldehida beracun dari hasil reaksi oksidasi menjadi alkohol yang tidak aktif. *aldose reductase* juga berperan dalam mengurangi glukosa menjadi sorbitol, yang kemudian akan dioksidasi menjadi fruktosa. Proses tersebut terjadi dengan cara *aldose reductase* mengkonsumsi kofaktor NADPH sehingga mengurangi stres osmotik karena banyaknya sorbitol yang terakumulasi dalam sel dan stres oksidatif karena penurunan rasio NADPH / NADP⁺ serta berkurangnya NAD⁺ yang merupakan penyebab utama dalam berbagai komplikasi diabetes. Oleh karena itu aktivitas *aldose reductase* pada kondisi hiperglikemia akan mengurangi kapasitas oksidasi yang terjadi di dalam sel (Grewal, 2016).

Selain enzim *aldose reductase*, penghambatan enzim paling banyak juga terjadi pada enzim fosfatase dengan target penghambatan *protein tyrosine phosphatase 1b* (PTP1b). Enzim PTP1b mampu dihambat dengan persentase penghambatan di atas 20% oleh 6 jenis senyawa aktif, yakni asam askorbat dan asam madasiatik dengan persentase penghambatan sebesar 33,3%, kemudian asam asiatik, asam madekasik dan asam isothankunik dengan persentase sebesar 26,7%,

serta centellasapogenol hanya mampu menghambat enzim PTP1b sebesar 20%. Berdasarkan Shah (2016), PTP1b merupakan protein tipe non reseptor intraseluler yang dianggap sebagai target terapi tervalidasi untuk berbagai penyakit, termasuk diabetes. Proses penghambatan tersebut dapat mengurangi resisten terhadap insulin dan menurunkan tingkat hiperlipidemia.

Penghambatan terhadap enzim PTP1b juga mampu digunakan dalam terapi pengobatan penyakit Alzheimer. Menurut Vieira (2017), PTP1b diketahui terlibat dalam proses pengaturan di susunan syaraf pusat. Peningkatan aktivitas PTP1b menunjukkan bahwa insulin neural dan sinyal leptin mengalami kerusakan sehingga menyebabkan penyakit Alzheimer. Dengan terjadinya penurunan aktivitas PTP1b, akan mengembalikan insulin hipotalamus yang mempengaruhi keseimbangan energi dan metabolisme glukosa serta sinyal terhadap leptin. Penghambatan PTP1b akan meningkatkan pensinyalan *Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF) yang merupakan neurotropin penting dalam mengatur aktivitas sinaptik syaraf pusat. Chan (2012), insulin hipotalamus mempunyai peran dalam mengatur fase pertama dalam proses konversi glukosa-6-fosfat oleh glukokinase dalam hipotalamus yang akan menurunkan kadar glukosa.

Selain menghambat PTP1b, asam askorbat bersamaan dengan myristicin mampu menghambat enzim kinase pada bagian glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3). Persentase penghambatan enzim oleh asam askorbat dan myristicin sebesar 26,7%. Efek penghambatan terhadap GSK-3 diketahui mampu meningkatkan fungsi sel saraf pada neurofilament H. selain itu, penghambatan GSK-3 juga mampu meningkatkan degradasi fragmen C-terminal pada substrat presenilin 1 (PS1) yang akan meningkatkan fungsi protein transmembran yang berhubungan dengan penyakit Alzheimer, serta mampu mengikat β -catenin (Woodgett, 2015). β -catenin merupakan protein multifungsi yang berperan dalam homeostasis fisiologi. Ekspresi gen yang berlebih pada β -catenin akan mengakibatkan berbagai penyakit, salah satunya adalah kanker.

Senyawa brahmoside juga merupakan salah satu senyawa yang mendukung dalam terapi penyakit Alzheimer. Senyawa ini mampu menghambat enzim protease sebesar 26,7 % dan akan memberikan efek terhadap penurunan produksi *gamma* dan *beta secretase*. Menurut Tate (2012), *gamma* dan *beta secretase* merupakan

kompleks protease yang berperan dalam produksi beta amiloid. Adapun Indra (2017) menyatakan bahwa beta amiloid merupakan gugus polipeptida yang merupakan komponen utama dalam pembentukan plak amiloid pada penyakit alzheimer sehingga mengakibatkan kehilangan sel-sel neuron secara *irreversible* yang menurunkan kemampuan intelektual, daya ingat dan kemampuan berpikir.

Senyawa-senyawa yang terkandung dalam pegagan berdasarkan berbagai data dan literatur yang telah dijelaskan di atas menunjukkan aktivitas sebagai bahan pengobatan dalam berbagai penyakit, beberapa diantaranya adalah sebagai obat diabetes dan juga mempunyai kemampuan dalam *therapy* penyakit Alzheimer. Sabda Rasulullah Shollallahu alaihi wasallam dalam HR Abu Dawud berikut :

إِنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ الدَّاءَ وَالذَّوَاءَ وَجَعَلَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءً فَتَدَاوُوا وَلَا تَدَاوُوا بِحَرَامٍ

Artinya: “*Sesungguhnya Allah telah menurunkan penyakit dan obatnya, demikian pula Allah menjadikan bagi setiap penyakit ada obatnya. Maka berobatlah kalian dan janganlah berobat dengan yang haram.*” (HR. Abu Dawud) (Al-Qarni, 2007)

Hadist tersebut mengatakan bahwa setiap penyakit mempunyai obat atau penawar. Hal tersebut menyatakan kebesaran Allah Subhanahu wa ta’ala yang maha adil bagi setiap makhluknya karena telah menciptakan penyakit dengan makna agar manusia berpikir untuk mencari jalan keluar dari penyakit yang dideritanya. Salah satu anjurannya adalah dengan berobat pada bagian akhir kalimat hadist diatas. Salah satu pengobatan terhadap penyakit-penyakit tersebut adalah dengan menggunakan tumbuh-tumbuhan atau herba karena tumbuh-tumbuhan mengandung banyak senyawa aktif yang bermanfaat bagi kesehatan. Adapun salah satu contoh tumbuhan bermanfaat adalah pegagan yang dalam penelitian ini dapat digunakan dalam pengobatan diabetes dan neuroprotective.

Segala macam penyakit pasti ada obat atau penawarnya yang diberikan oleh Allah, bahkan manusia belum menyadari keberadaan obat dari sebagian penyakit. Seperti halnya pada sabda Rasulullah saw dalam HR. Ibnu Majah : 3430 berikut :

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

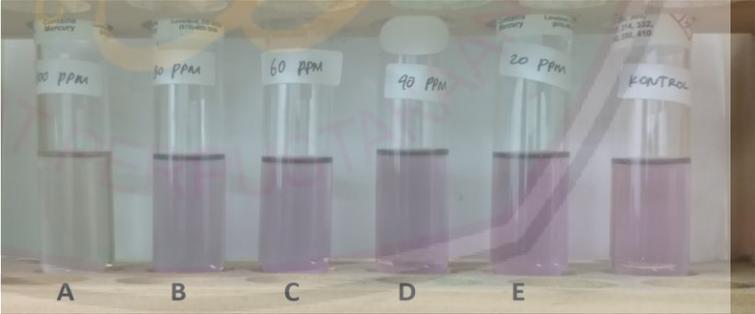
"Allah tidak menurunkan suatu penyakit kecuali menurunkan obat baginya" (HR. Ibnu Majah: 3430) (Al-Qarni, 2007).

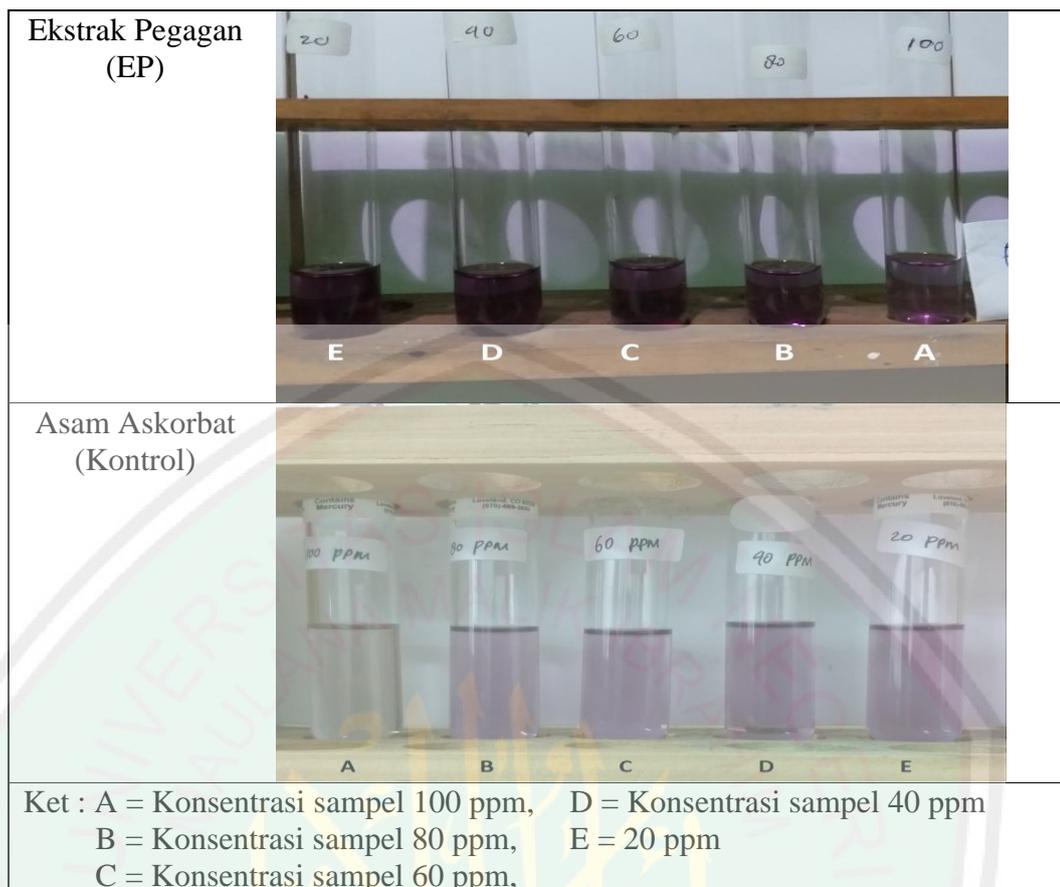
Hadist tersebut menunjukkan bahwa Allah Subhanahu wa ta'ala merupakan zat yang maha adil. Allah telah menciptakan penyakit dengan berbagai macam bentuk dan efeknya sekaligus menciptakan penawar (obat) dari penyakit tersebut hingga dapat dimaknai dengan semua penyakit pasti mempunyai obat. Semua itu bertujuan agar manusia beriman terhadap Allah Subhanahu wa ta'ala dengan salah satu cara, yakni berpikir. Dalam hal ini, manusia dituntut berpikir dalam menangani berbagai penyakit yang telah Allah ciptakan dengan cara mencari penawarnya, yaitu obat.

4.3. Analisis Aktivitas Antioksidan

4.3.1. Analisis kualitatif aktivitas antioksidan

Analisis aktivitas antioksidan yang dilakukan terhadap sampel berupa NEP, EP dan vitamin C (asam askorbat) sebagai pembanding yang diukur menggunakan metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazyl). Sebelum dilakukan pengukuran, aktivitas antioksidan dapat diamati dengan cara kualitatif melalui perubahan warna yang terjadi pada sampel. Warna yang terbentuk menunjukkan bahwa semakin tinggi aktivitas antioksidannya, maka warna yang terlihat akan semakin pudar. Proses tersebut dapat dilihat pada hasil perubahan warna pada gambar 4.3 berikut.

Sampel	Foto Pengamatan
Nanopartikel Ekstrak Pegagan	
Ket : A = Konsentrasi sampel 100 ppm, B = Konsentrasi sampel 80 ppm, C = Konsentrasi sampel 60 ppm,	D = Konsentrasi sampel 40 ppm E = 20 ppm



Gambar 4.3. Perubahan warna pada NEP, EP dan Asam askorbat (Kontrol)

Aktivitas antioksidan secara kualitatif dapat dilihat berdasarkan perubahan gradasi warna yang terjadi pada tingkatan konsentrasi larutan uji. Perubahan warna pada sampel uji terjadi secara bertahap mulai dari warna ungu hingga ungu muda hingga bening kekuningan. Hal ini dapat terlihat pada gambar 4.1. Pada konsentrasi sampel terendah (20 ppm) terlihat bahwa larutan sampel masih berwarna ungu, kemudian pada konsentrasi sampel 40 ppm mengalami gradasi perubahan warna menjadi ungu lebih muda atau lebih bening. Hingga akhirnya pada konsentrasi paling tinggi (100 ppm) larutan sampel mengalami perubahan warna menjadi berwarna bening kekuningan pada sampel NEP dan Asam askorbat, akan tetapi pada sampel EP warna yang terbentuk pada konsentrasi paling tinggi (100 ppm) adalah warna ungu bening. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar perubahan warna yang terjadi pada larutan maka semakin besar pula aktivitas antioksidan yang terdapat di dalam larutan tersebut. Menurut (Prakash,2011), Perubahan warna yang terbentuk secara bertahap tersebut merupakan akibat dari

adanya aktivitas antioksidan yang mengakibatkan hampir semua radikal bebas dari DPPH telah berikatan dengan atom hidrogen antioksidan sehingga mengubah DPPH menjadi DPPH-H yang telah kehilangan sifat radikal bebasnya atau dapat dikatakan menjadi molekul yang stabil.

4.3.2. Analisis kuantitatif aktivitas antioksidan

Uji selanjutnya dilakukan secara kuantitatif dengan cara mengukur absorbansi terhadap larutan uji dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 517 nm. Panjang gelombang ini merupakan hasil pengukuran maksimal yang telah diukur sebelumnya dengan cara mengukur λ_{\max} larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 ml yang ditambahkan dengan pelarut etanol sebanyak 1 ml, kemudian diukur pada rentang gelombang 400 – 800 nm. Khomdram (2010) juga menyatakan bahwa Panjang gelombang maksimal dalam pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan pelarut etanol adalah pada λ_{517} nm.

Pengukuran absorbansi larutan uji dilakukan secara bertahap mulai dari konsentrasi rendah hingga konsentrasi tinggi. hasil pengukuran absorbansi kemudian dilakukan perhitungan persentase penghambatan dengan menggunakan rumus %penghambatan = (absorbansi blangko – absorbansi sampel)/absorbansi blanko x 100%. Berikut hasil pengukuran absorbansi dan %penghambatan pada NEP (Tabel 4.3), EP (Tabel 4.4) dan asam askorbat (Tabel 4.5) .

Tabel 4.3. Nilai absorbansi, persen penghambatan dan IC₅₀ NEP

Nanopartikel Ekstrak Pegagan				
No	Konsentrasi (ppm)	rerata absorbansi	%penghambatan	IC ₅₀
1	20	0.8603	7.59	44,67 ±
2	40	0.7435	20.13	
3	60	0.6532	29.83	
4	80	0.513	44.89	
5	100	0.401	56.92	

*Absorbansi rerata kontrol = 0.931

Tabel 4.4. Nilai absorbansi, persen penghambatan dan IC₅₀ EP

Ekstrak Pegagan				
No	Konsentrasi (ppm)	rerata absorbansi	%penghambatan	IC ₅₀
1	20	0.8793	5.55	56,57 ±
2	40	0.8213	11.78	
3	60	0.7536	19.05	
4	80	0.6383	31.44	
5	100	0.4953	46.79	

*Absorbansi rerata kontrol = 0.931

Tabel 4.5. Nilai absorbansi, persen penghambatan dan IC₅₀ asam askorbat

Asam Askorbat				
No	Konsentrasi (ppm)	rerata absorbansi	%penghambatan	IC ₅₀
1	20	0.647	13.27	37,06 ±
2	40	0.5836	21.76	
3	60	0.445	40.34	
4	80	0.331	55.63	
5	100	0.2632	64.71	

*Absorbansi rerata kontrol = 0.746

Berdasarkan pada data tabel 4.3, tabel 4.4, dan tabel 4.5, dapat diketahui bahwa semakin besar konsentrasi larutan NEP, EP dan asam askorbat maka akan semakin kecil nilai absorbansinya. Adapun semakin kecil nilai absorbansi maka akan meningkatkan persentase penghambatan antioksidan terhadap radikal bebas.

Setelah mendapatkan nilai persen penghambatan pada larutan sampel, dilakukan pembuatan grafik antara konsentrasi larutan (x) dan persen penghambatan (y) dengan menggunakan software berupa *microsoft excel*. Nilai IC₅₀ didapatkan dari persamaan regresi linier $y=a+bx$, dimana koefisien y adalah nilai IC yang telah ditetapkan yaitu 50. Sedangkan koefisien x adalah nilai IC₅₀ atau

konsentrasi dari sampel yang akan dicari nilainya (Blois, 2018). Hasil perhitungan nilai IC_{50} pada larutan sampel dapat dilihat pada tabel 4.5 di atas.

Hasil pengukuran IC_{50} pada sampel NEP dan asam askorbat menunjukkan aktivitas antioksidan sangat kuat yakni sebesar 45,27 dan 37,93 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan pada ekstrak pegagan menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat yakni sebesar 56,50 $\mu\text{g/ml}$. menurut Blois (2010), suatu zat yang memiliki nilai aktivitas antioksidan ≤ 50 , maka dapat dikatakan bahwa zat tersebut mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Sedangkan nilai aktivitas antioksidan berkisar antara 50-100 maka zat tersebut mempunyai aktivitas antioksidan kuat. 100-150 dikatakan aktivitas antioksidannya lemah, 150-250 dikatakan aktivitas antioksidannya sangat lemah, dan apabila ≥ 250 maka aktivitas antioksidan pada zat tersebut dapat dikatakan tidak aktif, tetapi masih mempunyai potensi sebagai zat antioksidan.

Tingginya aktivitas antioksidan yang terdapat dalam pegagan dapat dikarenakan tingginya kandungan senyawa golongan flavonoid dan triterpenoid didalamnya. Dalam NEP menunjukkan aktivitas antioksidan lebih kuat yang ditandai dengan nilai IC_{50} sebesar 45,27, jika dibandingkan dengan ekstrak pegagan mempunyai aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 56,50. Nilai tersebut jika dibandingkan dengan data LCMS pada Tabel 4.1 yang menunjukkan besaran senyawa yang terkandung di dalamnya. Senyawa golongan triterpenoid dan flavonoid yang terkandung didalam pegagan merupakan golongan senyawa dengan konsentrasi paling besar.

Senyawa yang tergabung dalam golongan triterpenoid berdasarkan analisis LCMS pada tabel 4.1 adalah senyawa Umbeliferone, *7-methoxycoumarin*, asam betulinik, asam asiatik, asam madasiatik, *methyl asiatate*, asam isothankunik, asam madekasik, *brahmoside*, asam terminolik dan *scheffuroside*. Sedangkan senyawa yang tergabung dalam golongan senyawa flavonoid adalah senyawa apigenin, luteolin, kaemferol, quercetin, dan rutin. Golongan senyawa tersebut juga merupakan golongan senyawa dengan aktivitas antioksidan yang besar.

Menurut Arifin (2018), senyawa golongan flavonoid dan triterpenoid merupakan senyawa antioksidan dengan aktivitas yang tinggi. Tingginya aktivitas antioksidan tersebut dikarenakan adanya ikatan rangkap $C2=C3$ dalam konjugasi dengan $C4$ gugus karbonil kelompok tertentu serta adanya pola hidroksilasi

terutama bagian catechol pada cincin B, dan ikatan sakarida yang lebih sedikit akan menghasilkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi.

Perbandingan konsentrasi kedua golongan senyawa tersebut berdasarkan persentase area dalam uji LCMS. Konsentrasi senyawa dalam NEP diketahui nilai persentase area sebesar 71,17% dan dalam EP sebesar 76,12%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi senyawa golongan flavonoid dan triterpenoid dalam EP lebih besar jika dibandingkan dengan NEP. Akan tetapi, aktivitas antioksidan pada NEP dan EP berbanding terbalik dengan konsentrasi kedua golongan senyawa tersebut. Hal tersebut dapat dimungkinkan karena ukuran partikel senyawa pada NEP lebih kecil dibandingkan dengan EP. Hal ini sesuai dengan Noviantari (2017) yang menyatakan bahwa ukuran partikel dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan. Semakin kecil ukuran partikel akan memperluas permukaan suatu partikel sehingga kontak yang terjadi antara partikel dan radikal bebas akan lebih banyak pula. Adapun Hidayat (2018), Sampel dengan ukuran yang halus menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 6,23 mg/ml sedangkan pada sampel dengan ukuran kasar menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 9,29 mg/ml.

Selain ukuran partikel, penambahan kitosan dalam proses sintesis nanopartikel juga dapat memungkinkan adanya peningkatan aktivitas antioksidan. Menurut Luntungan (2017), kitosan mempunyai peran sebagai elisitor terhadap pelepasan enzim fenilalanin ammonia liase. Enzim tersebut merupakan enzim yang berperan dalam proses katalisisasi reaksi penting yang terjadi di dalam asam sinamat dan berbagai turunannya dengan cara mengubah fenilalanin menjadi asam sinamat melalui proses pelepasan ammonia atau disebut juga deaminasi. Pembentukan asam sinamat ini menghasilkan peningkatan kandungan fenolik yang terdapat dalam nanopartikel dengan penambahan ekstrak herba.

BAB V PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah :

- a. Terdapat 50 jenis senyawa yang terkandung dalam ekstrak pegagan dan 43 senyawa dalam nanopartikel ekstrak pegagan. senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa fenolik dari golongan flavonoid (apigenin, luteonin, kaempferol dan quercetin), triterpenoid (umbelliferone, *asiatic acid*, *brahmoside*, *isotankunic acid*, *madecassic acid*, *terminolic acid*, *asiaticoside*, dan *scheffuroside*), asam klorogenat (*ferulic acid*, *p-coumaric acid* dan *caffeic acid*), saponin (*centellasaponin*) dan vitamin (vitamin A dan K).
- b. Terdapat 10 senyawa dalam pegagan yang berpotensi sebagai obat oral. Senyawa tersebut adalah umbelliferone, myristicin, asam ferulic, asam asiatik, asam madiasitic, centellasapogenol A, asam isotankunik, asam madekasik, brahmoside dan asam terminolik.
- c. Terdapat perbedaan aktivitas antioksidan antara nanopartikel ekstrak pegagan (NEP) dan ekstrak pegagan (EP). NEP mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan dengan EP yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} . Nanopartikel ekstrak pegagan mempunyai nilai IC_{50} sebesar 45,27 dan ekstrak pegagan mempunyai nilai IC_{50} sebesar 56,50.

5.2. Saran

- a. Penelitian ini dilakukan analisis senyawa aktif dilakukan secara kualitatif menggunakan LCMS. Oleh karena itu, perlu dilakukan pula analisis secara kuantitatif guna mengetahui kadar senyawa secara akurat.
- b. Analisis potensi senyawa obat dari senyawa yang terkandung dalam pegagan dilakukan secara *in silico* menunjukkan bahwa beberapa senyawa mempunyai efek terhadap penyakit diabetes dan Alzheimer. Oleh karena itu, perlu dilakukan pula pengujian terhadap hewan coba guna mengetahui efek farmakologi senyawa tersebut.

- c. Analisis antioksidan yang dilakukan menunjukkan tingkat aktivitas antioksidan yang bagus. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut guna mendukung data antioksidan seperti uji total fenol dan flavonoid. Selain itu, perlakuan terhadap hewan coba juga perlu dilakukan guna mengetahui efek aktivitas antioksidan senyawa tersebut.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdasah, Marline. 2014. Nanopartikel Dengan Gelasi Ionik. *Farmaka*. Vol. 15. No. 1
- Abraham, D. J. (2003). *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery Sixth Edition, Volume 1: Drug Discovery*. John Wiley & Sons.
- Achmad. 2011. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Penerbit Karunika.
- Adriani. 2018. Prediksi Senyawa Bioaktif Dari Tanaman Sanrego (*Lunasia amara* Blanco) Sebagai Inhibitor Enzim Siklooksigenase-2 (COX-2) Melalui Pendekatan Molecular Docking. *Jurnal Ilmiah Pena*. Vol.1. No. 1
- Akar, Zeynep., Murat Küçük & Hacer Doğan. 2017. A new colorimetric DPPH scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. Vol. 32. No. 1
- Alfiantya, Putri Fitri, Oktavia Rahayu Adiningsih, Zulkarnaen. 2015. Phytosome Ekstrak Pegagan Sebagai Modulator Neuregulin-1 Pada Traumatic Brain Injury. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kedokteran Indonesia*. Volume 3. No 1.
- Amaliyah, Nur., Ngadiwiyana a, Purbowatiningrum Ria Sarjono dan Ismiyanto. 2018. Antibacterial Activity of Cinnamic Acid - Chitosan Encapsulation. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi* Vol 21. No 1. ISSN: 1410-8917
- Anissa, 2012. Kajian Setabolomik Rimpang Kunyit Menggunakan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa. *Skripsi*. Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Bogor
- al Bakri, Ahmad Abduraziq. 2009. *Tafsir Ath-Thabari*. Jakarta : Pustaka Azzam
- Barski, Oleg A., Srivinas M. Tipparaju, and Aruni Bhatnagar. 2009. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metab Rev*. Vol. 40. No. 4
- Blouis, M. S. 2010. Antioxidant Determinations By The Use Of a Stable Free Radical. *Nature*. Vol 20. No. 2.
- Bolton, E. E., Wang, Y., Thiessen, P. A., & Bryant, S. H. 2008. PubChem: Integrated platform of small molecules and biological activities. *Annual Reports in Computational Chemistry*. Vol. 4
- Cahyani, Aprilia Intan. 2017. Uji Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*) Dengan Metode DPPH (2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL). *Skripsi*.

- Chan, Owen and Robert S. Sherwin. 2012. Hypothalamic Regulation of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *American Diabetes Association*. Vol. 61. No. 3
- Debnath, S. Datta, D. Babu, M. Kumar, R. and Senthil, V. 2010. Studies on Preparation and Evaluation of Chitosan Nanoparticles Containing Cy tarabine. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. Vol. 3, Issue 2.
- Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. 2017. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Druglikeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Scientific Reports*. Vol.7
- Effendy. 2007. *Perspektif Baru Kimia Koordinasi Jilid I*. Malang: Banyu Media Publishing.
- Ernawati D. 2014. Pengoptimuman ekstraksi dan pemurnian asiatikosida dari pegagan (*Centella asiatica*). *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Faustino, Helio, Nuno Gil, Cecilia Baptista and Ana Paula Duarte. 2010. Antioxidant Activity of Lignin Phenolic Compounds extracted from Kraft and Sulphite Black Liquors. *Molecules* ISSN 1420-3049, 9308-9322.
- Febriany, S. 2010. Pengaruh Beberapa Ekstrak Tunggal Bangle dan Gabungannya yang Berpotensi Meningkatkan Aktivitas Enzim Lipase Secara In Vitro. *Skripsi*. Fakultas MIPA IPB. Bogor.
- Febriyanti, Alifia Putri., Siti Jazimah Iswarin, Tristy Digjayanti. 2016. Perbandingan Kadar Asiatikosida Dalam Ekstrak Etanol 70% Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) Dengan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sonikasi Secara LC-MS/MS. *JF FIK UINAM*. Vol.4 No.2
- Ferhad, Adibah, Auliyani Andam Suri, Astri Handayani, Sri Redjeki2, and Ria Kodariah. 2018. The Effect of Pegagan (*Centella Asiatica* (L.) Urban) Ethanol Extracts on Hippocampal PSD-95 Protein Expression in Male Wistar Rats. *Traditional Medicine Journal*. Vol 23. No 3
- Fitriyani, A., Winarti, L., Muslichah, S. dan Nuri. 2011. Uji Antiinflamasi Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* ruiz & Pav) pada Tikus Putih. *Majalah Obat Tradisional*: 16 (1), 34-42.
- Gerald, S., 2017. Antioxidants. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 61, 165-170.
- Ginting, Maris Kharisma. 2012. Validasi Metode LC-MS/MS Untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-Metil Hippurat, Asam 4-Metil Hippurat Dalam Urin Sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toluena, dan Xilena. *Skripsi*. Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Depok.

- Gohil, Kahsmira J., Jagruti A. Patel and Anuradha K. Gajjar. 2010. Pharmacological Review on *Centella asiatica*: A Potential Herbal Cure-all. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol 1.
- Grewal, Ajmer Singh. 2016. Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. Vol. 16.
- Hapsari, Widarika Santi. 2017. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Herba Pegagan dan Analisa Rendemen. *Urecol*. ISSN 2407-9189.
- Harborne, J. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Cetakan Keempat*. Penerjemah: Padmawinata, K. dan I. Soediro. Bandung: ITB.
- Hebbar, Srinivas. 2019. RP-HPLC Method Development and Validation of Asiatic Acid Isolated From the Plant *Centella asiatica*. *Int J App Pharm*. Vol 11. Issue 3.
- al Hifnawi, M. Ibrahim. 2009. *Tafsir Al Qurthubi*. Jakarta : Pustaka Azzam
- Hossain. 2016. A Secondary Research on Medicinal Plants Mentioned in the Holy Qur'an. *Journal of Medicinal Plants*, Vol 15. No. 59.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia, Volume II*. Jakarta : Yayasan Sarana Wana Jaya : Diedarkan oleh Koperasi Karyawan, Badan Litbang Kehutanan.
- Husniati dan Eva Oktarina. 2014. Sintesis Nano Partikel Kitosan dan Pengaruhnya Terhadap Inhibisi Bakteri Pembusuk Jus Nenas. *Jurnal Dinamika Penelitian Industri*. Vol. 25. No. 2
- Indra, Muhamad Rasjad., Eko Arisetijono Marhaendraputro., dan Rudi Rakhmad Hidayat., 2017. Immunogenitas Antibodi Beta Amyloid Poliklonal Sebagai Studi Awal Pengembangan Diagnosis Dini Penyakit Alzheimer. *MNJ*. Vol. 3. No. 1.
- Isnindar, Wahyuono, S., & Setyowati, E. P. 2011. Isolasi dan identifikasi senyawa antioksidan daun kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). *Majalah Obat Tradisional*. Vol. 16. No. 3.
- al-Jazairi, Syaikh Abu Bakar. 2008. *Tafsir Al-Qur'an Al Aisar*. Jakarta : Darus Sunnah
- al-Jazzairi, Syaikh Abu Bakar Jabir. 2008. *Tafsir Al-Quran Al-Aisar, Jilid 1*. Jakarta: Darus Sunnah
- Karinda, Monalisa, Fatimawali, Gayatri Citraningtyas. 2013. Perbandingan Hasil Penetapan Kadar Vitamin C Mangga Dodol Dengan Menggunakan Metode Spektrofotometri Uv-Vis Dan Iodometri. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*. Vol. 2 No. 01

- Kesornbuakao, Kittiya., dan Patchanee Yasurin. 2016. The Development of *Centella asiatica* Extract-Loaded BSA Nanoparticles Production to Improve Bioavailability. *Oriental Journal Of Chemistry*. Vol. 32. No. 5
- Kesuma, Dini. 2018. Uji in silico Aktivitas Sitotoksik dan Toksisitas Senyawa Turunan N-(Benzoil)-N'- feniltiourea Sebagai Calon Obat Antikanker. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. Vol. 1
- Khaira, Kuntum., 2010. Menangkal Radikal Bebas Dengan Anti-Oksidan. *Jurnal Sainstek*. Vol. 11. No. 2
- Khomdram S, Barthakur S, Devi GS. 2010. Biochemical and Molecular Analysis of Wild Endemic Fruits of the Manipur Region of India. *International Journal of Fruit Science*. Vol. 14. No. 3.
- Khotimah, Khusnul. 2016. Screening and Identification of Metabolites Secondary Phytochemicals Compounds Carpain In methanol extract of leaves of *Carica pubescens* Lenne & K. Koch with LC / MS (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry). *Thesis*. Department of Biology, Faculty of Science and Technology of the State Islamic University (UIN) Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Khusnawati, Nikmah Nur., Suwijo Pramono, Ediati Sasmito. 2015. Effect of 50% Ethanolic Extract of Pegagan Herb (*Centella asiatica* (L.) Urban) on Cell Proliferation of Lymphocytes in Balb/c Male Mice Induced By Hepatitis B Vaccine. *Trad. Med. J*. Vol. 20. No. 3.
- Killedar, Suresh, Harinath More, Gourav Shah, Suryakant Gaikwad. 2013. Phytochemical Screening and In-Vitro Antioxidant Activity of Memecylon umbellatum Root Extracts. *World Jurnal of Pharmacy and Pharmaceuical Sciences*. Vol. 2, No. 6
- Krismanita, Diva Natasya., Zilfikar Naftali, dan Rakhma Yanti Hellmi. 2017. Hubungan Lamanya Menderita Diabetes Melitus Dengan Terjadinya Peningkatan Ambang Pendengaran. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*. Vol. 6. No. 2
- Kristina, Natalini Nova., Edy Djauari Kusumah dan Putri Kalina Lailani. 2009. Analisis Fitokimia dan Penampilan Polapita Protein Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Hasil Konservasi In Vitro. *Buletin Littro*. Vol 20. No 1. Hal 11-20.
- Kurniasari, Desy dan Sri Atun., 2017. Pembuatan dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Etanol Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) Pada Berbagai Variasi Komposisi Kitosan. *Jurnal Sains Dasar*. Vol 6. No 1.
- Lachman, Jaromir., 2009. Major factors influencing antioxidant contents and antioxidant activity in grapes and wines. *International Journal of Wine Research*. Vol 1. No 1.

- Lenny, S. 2009. Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida. *Karya Ilmiah* .MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 23. No. 3
- Long, H.S., M.A. Stander, B.E. Van Wyk. 2012. Notes on the occurrence and significance of triterpenoids (asiaticoside and related compounds) and caffeoylquinic acids in *Centella* species. *South African Journal of Botany*. Vol. 82
- Luntungan, Aldian H., Lucia C. Mandey., Inneke F. M. Rumengan dan Pipih Suptijah., 2017. Pengaruh Penyalutan Nanokitosan Pada Kandungan Fenolik Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L). *J. Ilmu dan Teknologi Pangan*, Vol. 5 No. 2
- M. Abirami dan Sudharameshwari K., 2017. Study on Plant Extract Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles Using Combination of *Cardiospermum Halicacabum* and *Butea Monosperma* & Screening of Its Antibacterial Activity. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. Vol 9. No 5. ISSN: 0975-4873.
- Mangunwardoyo, W., Cahyaningsih, E., dan Usia, T. 2009. Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba Herba Meniran (*Phyllanthus niruri*, L.) *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Vol 7, no. 2. Hal: 57-63.
- Marliana, E. 2012. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Andong (*Cordyline fruticosa* [L] A. Cheval). *Jurnal Mulawarman Scientifie*, Vol 11. No 1. ISSN 1412-498X.
- Mohammed, M.A., Syeda, J.T.M., dan Wasan, K.M. 2017) An Overview Of Chitosan Nanoparticles and Its Applications in Non-Parental Drug Delivery. *Pharmaceutics*. Vol 9. No 53.
- Molyneux, P. 2013. The Use of the Stabel Free Radical Diphenylpicryl Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal Science and Technology*. Vol. 2. No. 1.
- Mosaad, Rehab M., Amany Samir, and Hassan M. Ibrahim. 2017. Median lethal dose (LD50) and cytotoxicity of Adriamycin in female albino mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol. 7. No. 3
- Mufsiroh, E. & Syarief, S.H. 2012. Uji aktivitas peredaman radikal bebas nanopartikel emas dengan berbagai konsentrasi sebagai material antiaging dalam kosmetik. *UNESA Journal of Chemistry*. Vol. 1. No.2.
- Nadia, Laode Muhamad Hazairin., Pipih Suptijah, dan Bustami Ibrahim. 2014. Produksi Dan Karakterisasi Nano Kitosan Dari Cangkang Udang Windu Dengan Metode Gelasi Ionik. *JPHPI*. Vol 17 No 2

- Ningsih, Nurmalia., Sedarwati Yasni., dan Sri Yuliani., 2017. Sintesis Nanopartikel Ekstrak Kulit Manggis Merah dan Kajian Sifat Fungsional Produk Enkapsulasinya. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol 28. No 1. ISSN : 1979-7788.
- Noviantari, Ni Putu., Lutfi Suhendra, dan Ni Made Wartini. 2017. Pengaruh Ukuran Partikel Bubuk dan Konsentrasi Pelarut Aseton Terhadap Karakteristik Ekstrak Warna *Sargassum polycystum*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. Vol. 5. No. 3
- Orhan, Ilkay Erdogan. 2012. Review Article : *Centella asiatica* (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID : 946259.
- Ozyurt, D, 2005, Determination Of Total Antioxidant Capacity By a New Spectrophotometric Method Based On Ce (IV) Reducing Capacity measurement. Diakses Tanggal 24 Juli 2019
- Prakash, A., Rigelhof, F., and Miller, E., 2001, Antioxidant Activity, Medalliaon Laboratories Analytical Progress, vol 10, No.2
- Prakash, Ved., Nishita Jaiswal and Mrinal Srivastava. 2017. A Review on Medicinal Properties of *Centella asiatica*. *Asian J Pharm Clin Res*. Vol 10. Issue 10.
- Pramono, S dan D, Ajiastuti. 2004. Standardization of pegagan extract (*Centella asiatica* (L.) Urban) based on asiaticoside content using TLC densitometric method. *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol. 15. No. 3.
- Pramono, S. 2005. Penanganan Pasca Panen dan Pengaruhnya Terhadap Efek Terapi Obat Alam. Seminar Pokjanas TOI XXVIII. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Bogor. Hal.1-6.
- Pratimasari, D, 2009,Uji Aktivitas Penangkap Radikal Buah *Carica papaya* L. Dengan Metode DPPH dan Penetapan Kadar Fenolik Serta Flavonoid Totalnya, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Purwaningsih, S. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komposisi Kimia Keong Matah Merah (*Cerithidea obtuse*). *Ilmu Kelautan*. Vol. 17. No. 1.
- Puttarak, Panupong., Piyameth Dilokthornsakul, Surasak Saokaew. 2017. Effects of *Centella asiatica* (L.) Urb. on cognitive function and mood related outcomes: A Systematic : Review and Meta-analysis. *Scientific Reports*.
- al-Qarni, ‘Aidh. 2007. *Tafsir Muyassar*. Jakarta : Qisthi Press Vol 7: 10646
- Rahayu, Mulyati., Siti Sunarti, Diah Sulistriani, dan Suhardjono P. 2006. Pemanfaatan Tumbuhan Obat secara Tradisional oleh Masyarakat Lokal di Pulau Wawonii, Sulawesi Tenggara. *Biodiversitas*. Vol. 7. No. 3

- Raj, L, F.A.A., Jonisha, R., dan Revathi, B. 2015. Preparation and Characterization of BSA and Chitosan Nanoparticles For Sustainable Delivery System for Quercetin. *Journal Of Applied Pharmaceutical Science*. Vol 5. No 7
- Rashmi, Venkatasubbaiah dan Konasur R. Sanjay. 2017. Green synthesis, characterisation and bioactivity of plant-mediated silver nanoparticles using *Decalepis hamiltonii* root extract. *IET Nanobiotechnol*. Vol. 11. No. 3
- Rismana, E. Kusumaningrum, S., Bunga, O., Nizar, dan Marhamah. 2014. Pengujian Aktivitas Antiacne KITOSAN Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana*). *Media Litbangkes*.
- Robinson, T. 2010. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB.
- Rohman dan Gandjar. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta
- Roy, Arpita and Navneeta Bharadvaja., 2017. Centella Asiatica: A Pharmaceutically Important Medicinal Plant. *Curr Trends Biomedical Eng & Biosci*. Vol 5. No 3: CTBEB.MS.ID.555661
- Roy, Dipankar Chandra., Shital Kumar Barman, Md. Munan Shaik. 2013. Current Updates on Centella asiatica: Phytochemistry, Pharmacology and Traditional Uses. *Medicinal Plant Research*. Vol.3, No.4, 20-36
- Rukmi, Isworo. 2009. Keanekaragaman Aspergillus Pada Berbagai Simplisia Jamu Tradisional. *Jurnal Sains dan Matematika*. Vol. 17. No 2.
- S. Pramono dan D. Ajiastuti. 2004. Standardisasi ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica*.(L.).Urban) berdasarkan kadar asiatikosida secara KLT-densitometri. *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol 15. No 3.
- Savitri, Evika Sandi. 2015. Uji Antifungi Ramuan Tradisional Madura “Subur Kandungan”. *Al-Kauniyah Jurnal Biologi*. Vol. 8. No.1
- Setiawan, Felicia Fraulein dan Enade Perdana I. 2015. Uji *In Silico* Senyawa 2,6-Dihidroksianquinon Sebagai Ligan Pada Reseptor Estrogen Alfa. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*. Vol. 12. No. 2
- Setyowati, E. P., dan Isnindar, Wahyuono, S. 2011. Isolasi dan identifikasi senyawa antioksidan daun kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). *Majalah Obat Tradisional*. Vol. 16. No. 3.
- Shah, Muhammad Raza., Ishtiaq. 2016. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors isolated from *Artemisia roxburghiana*. *J Enzyme Inhib Med Chem*. Vol. 31. No. 4
- Silalahi, J. 2009. *Makanan Fungsional*. Yogyakarta: Kanisius.

- Sihombing, Wahyu., Muslim Akmal, Sri Wahyuni. 2015. Efek Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap Perkembangan Sel Spermatid Tikus (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Medika Veterania*. Vol. 9. No. 1.
- Singh, Sakshi., Asmita Gautam, Abhimanyu Sharma and Amla Batra. 2010. *Centella asiatica* (L.): A Plant With Immense Medicinal Potential but Threatened. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. Volume 4. Issue 2. ISSN 0976 – 044X.
- Sirait, M. 2013. *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Sondari, Dewi., TunTedja Irawadi, Dwi Setyaningsih, dan Silvester Tursiloadi. Studi Awal Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen dan Kadar Asiaticoside Dari *Centella asiatica* (L) URB. *Jurnal Sains Materi Indonesia* Vol. 17, No. 3
- Sudha, P.N., T. Gomathi, dan S. Aisverya. 2015. Recent Research In The Applications Of Chitin, Chitosan, and Oligosaccharides. *Thiruvalluvar University*. India.
- Sumaryanto, A. 2009. Isolasi Karakterisasi Senyawa Alkaloid Dari Kulit Batang Tanaman Angsret (*Spathoda campanulata* Beauv) Serta Uji Aktivitas Biologisnya Dengan Metode Uji Brine Shrimp. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
- Sunarni, T., Pramono, S. & Asmah, R. (2007). Flavonoid antioksidan penangkap radikal dari daun Kepel (*Stelechocarpus burahol* (BL) Hook f. & Th.). *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol. 18. No. 3
- Sunarni, T, 2015, Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa kecambah Dari Biji Tanaman Familia Papilionaceae, *Jurnal Farmasi Indonesia*. Vol. 2. No. 2
- Sutardi. 2016. Bioactive Compounds in Pegagan Plant and Its Use for Increasing Immune System. *Jurnal Litbang Pertanian*. Vol.35. No. 3
- Syahrizal, D. 2013. Pengaruh proteksi vitamin C terhadap enzim transaminase dan gambaran histopatologis hati mencit yang dipapar plumbun. Tesis Universitas Sumatera Utara.
- Syed, F., Taj, R., Shaheen, N., Norin, M dan Khan, S. 2014. Latent natural product and their potential application as anti-infective agents. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Pakistan: University of Peshawar and Beijing University.
- Taurina, Wintari., Rafika Sari, Uray Cindy H. 2017. Optimization of Stirring Speed and Stirring Time Toward Nanoparticle Size of Chitosan-Siam Citrus Peel (*Citrus nobilis* L.var Microcarpa) 70% Ethanol Extract. *Trad. Med. J*. Vol. 22. No. 1.

- Tate, Barbara. 2012. Research Article Modulation of Gamma-Secretase for the Treatment of Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*. ID Article : 210756
- Thomas, G. 2013. *Fundamental of Medicinal Chemistry*. Sussex: John Wiley & Sons.
- Trauger, SA., Webb W and Siuzdak G. 2012. Peptide and Protein Analysis With Mass Spectrometry. *Spectroscopy*. Vol 16. No. 15
- Valenta, tomas., George Hausmann and Konrad Basler. 2012. The Many Faces and Function of β -catenin. *The EMBO Journal*. Vol. 31.
- Vieira, Marcello. N.N. Natalia M.L, and Sergio T.F. 2017. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): A Potential Target for Alzheimer's Therapy?. *Frontiers in Aging Neuroscience*. Vol. 9. No. 7
- Vogeser, SA. Webb W and Siuzdak G. 2016. Mass Spectrometri Methods in Clinical Diagnostic – State of The Art and Perspectives. *TrAC-Trend Anal. Chem*. Vol. 1. No. 4
- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandhi, Apt. Yogyakarta: UGM press.
- Wientarsih I, Prasetyo BF. *Diktat Farmasi dan Ilmu Resepsir*. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan IPB. 2006.
- Wijayadi, Linda Julianti., and Taty Rusliati Rusli. 2018. Characterized and synthesis of chitosan nanoparticle as nanocarrier system technology. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 508*. doi:10.1088/1757-899X/508/1/012143.
- Woodgett, J.R. 2015. *Physiological Roles of Glycogen Synthase Kinase-3: Potential as a Therapeutic Target for Diabetes and Other Disorders*. Kanada : CIHR.
- Wulandari, Ika Oktavia., Akhmad Sabarudin., D.J Djoko Herry Santjojo., 2016. Pembuatan Nanopartikel Kitosan-Fe₃O₄ secara Kopersipitasi Ex-Situ menggunakan Tripolyphosphate/Sulfat sebagai Crosslinker dan Karakterisasinya Menggunakan XRD. *Natural B*. Vol 3. No 6
- Yasurin, Patchaane., Malinee Sriariyanun, and Theerawut Phusantisampan. 2016. Review: The Bioavailability Activity of *Centella asiatica*. *KMUTNB Int J Appl Sci Technol*, Vol. 9, No. 1
- Yudhasasmita, Swara dan Andhika Puspito Nugroho. 2017. Sintesis dan Aplikasi Nanopartikel Kitosan Sebagai Adsorben Cd dan Antibakteri Koliform. *BIOGENESIS*. Vol 5. No 1. pISSN 2302-1616. eISSN 2580-2909.
- Zahara, Kulsoom., Yamin Bibi and Shaista Tabassum. 2014. Clinical and therapeutic benefits of *Centella asiatica*. *Pure Aool. Bio*. Vol. 3. No. 4.

Zulkarnaen, Alifia Putri F, dan Oktavia Eka P. 2017. Penetapan Kadar Asiatikosida Ekstrak Etanol 70 % Pegagan (*Centella asiatica*) menggunakan Metode LC–MS. *Majalah FK Universitas Brawijaya*.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



Lampiran 2. Preparasi Sampel

2.1. Ekstraksi Maserasi

Simplisia

- Ditimbang 100 gram simplisia pegagan dengan menggunakan neraca analitik
- Dimasukkan ke dalam botol 1 liter
- Ditambahkan 500 ml etanol 70% untuk merendam
- Diaduk menggunakan batang pengaduk agar tercampur rata
- Didiamkan selama 24 jam dalam kondisi gelap

Filtrat

Ampas

Dimaserase kembali dengan menggunakan pelarut yang sama selama 24 jam

Dilakukan penguapan pelarut dengan menggunakan *rotary evaporator*

Ekstrak

2.2. Sintesis Nanopartikel

Kitosan

- Ditimbang sebanyak 3 gram kitosan menggunakan neraca analitik
- Dilarutkan asam asetat glasial sebanyak 6 ml ke dalam aquades sambil dihomogenkan menggunakan stirrer dengan kecepatan 1000 rpm
- Ditambahkan dengan larutan STPP sebanyak 0,6 gram dalam aquades 120 ml.
- Dicampur kedua jenis larutan, kemudian ditambahkan kitosan dan dihomogenkan pada kecepatan 1000 rpm
- Ditambahkan ekstrak pegagan sebanyak 0,6 gram kedalam larutan kitosan, dihomogenkan kembali.
- Dilakukan proses homogenisasi kembali menggunakan disperser pada kecepatan 10.000 rpm selama 90 menit
- Dilakukan sonikasi menggunakan ultrasonicator pada frekuensi 20 kHz dan amplitude 80% selama 90 menit
- Disentrifugasi untuk memisahkan pelarut (*supernatant*) dengan sampel (*pellet*)
- Sampel diinkubasi di dalam freezer selama 24 jam
- Sampel dikeringkan menggunakan incubator pada suhu 50°C hingga kering
- Sampel digerus menggunakan mortar dan alu hingga halus

Nanopartikel

2.3. Analisis Senyawa Aktif Menggunakan LCMS

2.3.1 Pengenceran Sampel

Nanopartikel

- Dilarutkan dalam methanol pada konsentrasi 100 ppm kemudian divortex

Disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit

Didapatkan supernatan

Supernatan

2.3.2 Presipitasi Protein

Sampel

2 ml supernatant, ditambah 3 ml asetonitril, ditambah 0,2% asam format

Disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 30 detik

Didapatkan supernatan

Supernatant

2.3.3 Pemurnian Sampel Dengan SPE (Solid Phase Extraction)

Sampel

Sampel dimasukkan pada Sep-Pak C18 (1 cc, 100 mg) yang telah dikondisikan dengan 1 ml asetonitril : air (80:20)

Ditampung 0,5 ml larutan yang keluar

Ditambahkan 1 ml sampel ke dalam kolom Sep-Pak

Ditampung 0,5 ml larutan yang keluar

Ditambahkan 0,5 ml larutan asetonitril:air (80:20) ke dalam kolom sep-pak

Ditampung 0,5 ml larutan yang keluar

Ditambahkan 0,25 ml dengan konsentrasi 200 mM ammonium format dalam larutan asetonitril : metanol (50:50) ke dalam kolom sep-pak

Diambil 0,5 ml larutan yang keluar

Ditambahkan 0,2 ml larutan asetonitril : buffer (25:75) (25 mM ammonium format pH 4,5)

Larutan disaring dengan membrane filter, cellulose 0,45 μ m dan dilakukan degassing

Hasil Larutan

2.3.4 Persiapan Larutan

Hasil Larutan

- Botol dalam kondisi kering dan steril
- Larutan yang digunakan disaring menggunakan filter, cellulose acetate 0,45 μm dan juga degassing

Sampel Siap di Injeksi

2.3.5 Operasional LCMS

Operasional LCMS

- Dinyalakan CPU dan unit LCMS kemudian buka program LCMS solution
- Buka menu *Realtime Analysis* > *Open File* > *Open Method File* (Metode sudah diprogram sebelumnya), *File* > *New Method File* (Memprogram metode baru)
- Dipastikan larutan pada botol larutan dalam kondisi volume yang cukup, botol A selalu berisi air dan botol B berisi larutan organik
- Dinyalakan *heater* DL dan *Heat*, dan dipastikan selalu dalam kondisi *ON*.
- Dinyalakan NEBU, MS dan *LC Pump*, ditunggu hingga nilai *IG Vacuum* mencapai 6.10^{-4} pa dan kondisi siap
- Dinyalakan pompa LC dengan cara di-klik pada ikon pompa kemudian cek system formasi ion, klik plot. Jika ion tampak, maka plot dapat dihentikan
- Mengatur metode berupa parameter MS, Interface (ESI), LC program, dan lainnya. Jika semua sudah siap, klik *download* dan *save method*
- Klik *data acquisition* > *Start run*. Isi nama sampel, *sample ID*, *method file* dan set nama file dan volume injeksi > klik OK.
- Jika analisis sudah selesai, dinonaktifkan MS, NEB dan pompa LC
- Disimpan hasil *processing data* untuk keperluan lebih lanjut

Hasil Analisis

2.4. Analisis Potensi Senyawa Obat Menggunakan SwissADME

Senyawa Hasil LCMS

- Dicari *canonical SMILES (simplified molecular-input line-entry system)* berbagai macam senyawa dengan menggunakan basis data PubChem Compound
- Dimasukkan *canonical SMILES* pada kolom analisis pada aplikasi online SwissADME
- Dilakukan analisis mengenai senyawa-senyawa yang memenuhi persyaratan sebagai senyawa obat berdasarkan pendekatan Lipinski
- Dicari target penyerapan senyawa dalam tubuh dengan cara klik pada *Swiss Target Prediction*

Hasil Analisis

2.5. Analisis Antioksidan Menggunakan DPPH

2.5.1 Perhitungan ppm

a. Perhitungan konsentrasi DPPH 0,2 mM

$$0,2 \text{ mM} = \frac{Mg}{Mr} \times \frac{1000}{V}$$

$$0,2 \text{ mM} = \frac{x}{394} \times \frac{1000}{25}$$

$$0,2 \text{ mM} = \frac{40x}{394}$$

$$40 x = 0,2 \times 394$$

$$x = \frac{78,8}{40} = 1,97$$

b. perhitungan konsentrasi 100 ppm dari sampel (1 mg/L = 1 ppm)

$$\frac{2,5 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} = \frac{2500 \text{ } \mu\text{g}}{25 \text{ ml}} = 100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 100 \text{ ppm}$$

c. Pembuatan larutan uji (20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm)

$$\text{larutan 20 ppm} \Rightarrow N1.V1 = N2.V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{200}{100} = 2 \text{ ml}$$

$$\text{larutan } 40 \text{ ppm} \Rightarrow N_1.V_1 = N_2.V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 40 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{400}{100} = 4 \text{ ml}$$

$$\text{larutan } 60 \text{ ppm} \Rightarrow N_1.V_1 = N_2.V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 60 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{600}{100} = 6 \text{ ml}$$

$$\text{larutan } 80 \text{ ppm} \Rightarrow N_1.V_1 = N_2.V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 80 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{800}{100} = 8 \text{ ml}$$

$$\text{larutan } 100 \text{ ppm} \Rightarrow N_1.V_1 = N_2.V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 100 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{1000}{100} = 10 \text{ ml}$$

2.4.2 Pembuatan larutan stock

a. Larutan DPPH 0,2 mM

Analisis λ_{max}

Ditimbang DPPH sebanyak 1,97 mg kemudian dilarutkan dalam 25 ml etanol absolut

Dihomogenkan larutan menggunakan stirrer pada kecepatan 300 rpm.

Diukur absorbansi maksimal dengan mencampurkan 1,5 ml larutan DPPH dengan 1,5 ml etanol pada rentang 400-800 nm

Hasil

b. Larutan uji nanopartikel ekstrak pegagan

Larutan Uji NEP

- 12,5 mg NEP dilarutkan dalam 25 ml etanol
- Disaring kitosan menggunakan microfilter 0,2 μm hingga didapatkan senyawa aktif terlarut dengan konsentrasi 100 ppm
- Dibuat seri larutan uji sebesar 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm
- Sebanyak 1,5 ml dari masing-masing larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1,5 ml larutan DPPH pada masing-masing larutan uji
- Diinkubasi selama 30 menit dalam kondisi gelap
- Diukur menggunakan spektrofotometer pada $\lambda 517 \text{ nm}$

Data absorbansi

c. larutan uji ekstrak pegagan

Larutan Uji EP

- 2,5 mg EP dilarutkan dalam 25 ml etanol
- Dibuat seri larutan uji sebesar 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm
- Sebanyak 1,5 ml dari masing-masing larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1,5 ml larutan DPPH pada masing-masing larutan uji
- Diinkubasi selama 30 menit dalam kondisi gelap
- Diukur menggunakan spektrofotometer pada $\lambda 517 \text{ nm}$

Data absorbansi

d. larutan kontrol asam askorbat

Larutan Uji Asam Askorbat

- 2,5 mg Asam Askorbat dilarutkan dalam 25 ml etanol
- Dibuat seri larutan uji sebesar 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm
- Sebanyak 1,5 ml dari masing-masing larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1,5 ml larutan DPPH pada masing-masing larutan uji
- Diinkubasi selama 30 menit dalam kondisi gelap
- Diukur menggunakan spektrofotometer pada $\lambda 517$ nm

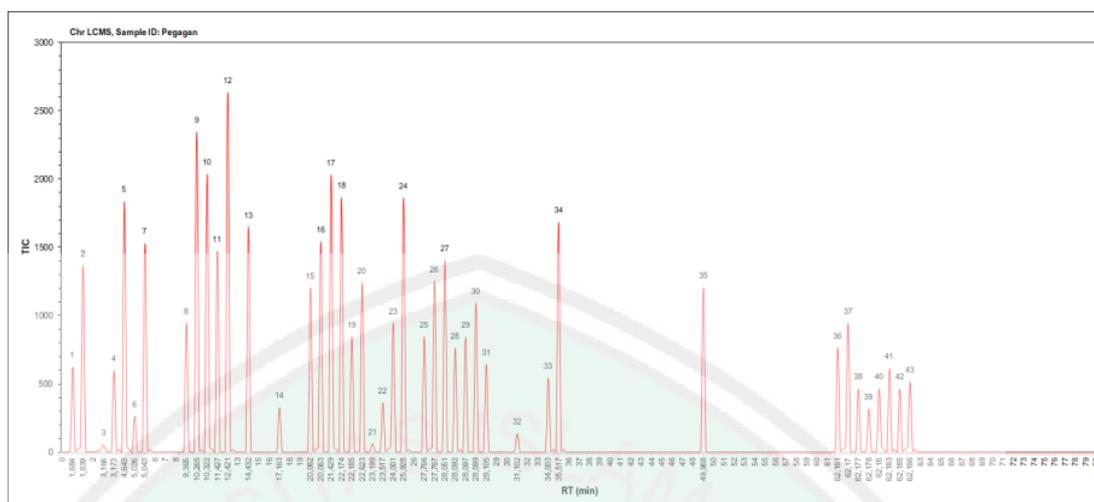
Data absorbansi

Lampiran 3. Hasil Uji LCMS

3.1. Hasil Kromatografi Ekstrak Pegagan



3.2. Hasil Kromatografi Nanopartikel Ekstrak Pegagan



Lampiran 4. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

4.1 Hasil Pengukuran Absorbansi

a. Nanopartikel Ekstrak Pegagan

Sampel (ppm)		Kontrol	Absorbansi				% Inhibisi
			1	2	3	Rerata	
Ulangan 1	20	0,931	0,8603	0,8603	0,8602	0,8603	7,593984962
	40		0,7435	0,7435	0,7434	0,7435	20,1396348
	60		0,6532	0,6530	0,6531	0,6532	29,83888292
	80		0,513	0,5131	0,513	0,513	44,89795918
	100		0,401	0,401	0,4011	0,401	56,92803437
Ulangan 2	20	0,931	0,86	0,8503	0,8606	0,8604	7,583243824
	40		0,7401	0,7402	0,7402	0,7402	20,49409237
	60		0,6532	0,6532	0,6532	0,6532	29,83888292
	80		0,5135	0,5137	0,513	0,5134	44,85499463
	100		0,4013	0,4015	0,4015	0,4014	56,88506982
Ulangan 3	20	0,931	0,8603	0,8603	0,8603	0,8603	7,693133047
	40		0,7435	0,7435	0,7433	0,7435	20,22532189
	60		0,6532	0,6530	0,6532	0,6532	29,91416309
	80		0,513	0,5131	0,5131	0,513	44,95708155
	100		0,4009	0,4011	0,4011	0,401	56,97424893

b. Ekstrak Pegagan

Sampel (ppm)		Kontrol	Absorbansi				% Inhibisi
			1	2	3	Rerata	
Ulangan 1	20	0,931	0,8793	0,88	0,8796	0,8797	5,510204082
	40		0,8213	0,8210	0,78210	0,7435	20,1396348
	60		0,7536	0,7533	0,7535	0,7534	19,07626208

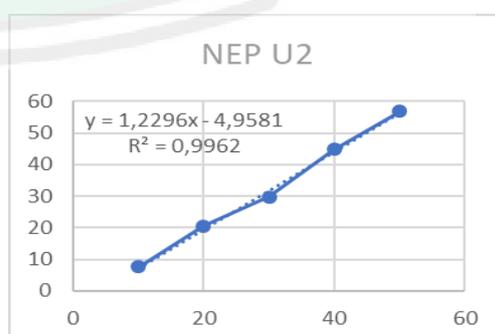
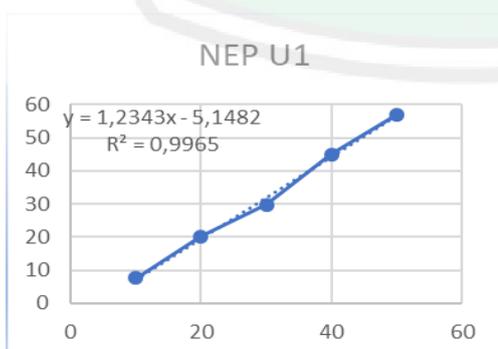
	80		0,6383	0,6380	0,6380	0,6381	31,46079484
	100		0,4953	0,4955	0,4955	0,4954	46,78839957
Ulangan 2	20	0,931	0,8790	0,8795	0,8795	0,8793	5,75562701
	40		0,8213	0,8215	0,8215	0,8214	11,96141479
	60		0,7536	0,7533	0,7533	0,7534	19,24973205
	80		0,6383	0,6378	0,6378	0,6380	31,61843516
	100		0,4955	0,4955	0,4955	0,4955	46,89174705
Ulangan 3	20	0,931	0,8787	0,8780	0,8780	0,8784	5,751072961
	40		0,8209	0,8210	0,8210	0,8210	11,90987124
	60		0,7529	0,7533	0,7534	0,7531	19,19527897
	80		0,6383	0,6382	0,6381	0,6382	31,52360515
	100		0,4954	0,4955	0,4955	0,4955	46,83476395

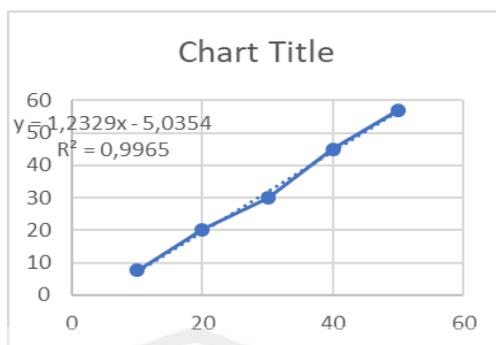
c. Asam Askorbat

Sampel (ppm)		Kontrol	Absorbansi				% Inhibisi
			1	2	3	rerata	
Ulangan 1	20	0,746	0,647	0,6472	0,6472	0,6471	13,25737265
	40		0,5836	0,5834	0,5833	0,5834	21,79624665
	60		0,445	0,4452	0,444	0,442	40,75067024
	80		0,331	0,3309	0,3308	0,3309	55,64343164
	100		0,2632	0,2632	0,2632	0,2632	64,71849866
Ulangan 2	20	0,749	0,6473	0,6472	0,6471	0,6472	13,59145527
	40		0,5837	0,5836	0,5835	0,5836	22,08277704
	60		0,4455	0,4453	0,4450	0,4452	40,56074766
	80		0,3313	0,3313	0,3312	0,3313	55,76769025
	100		0,2634	0,2636	0,2635	0,2635	64,81975968
Ulangan 3	20	0,748	0,6473	0,647	0,6468	0,647	13,5026738
	40		0,5833	0,5836	0,5834	0,5834	22,00534759
	60		0,4452	0,4451	0,445	0,4451	40,49465241
	80		0,3316	0,3318	0,3313	0,3316	55,6684492
	100		0,2629	0,2632	0,2634	0,2632	64,81283422

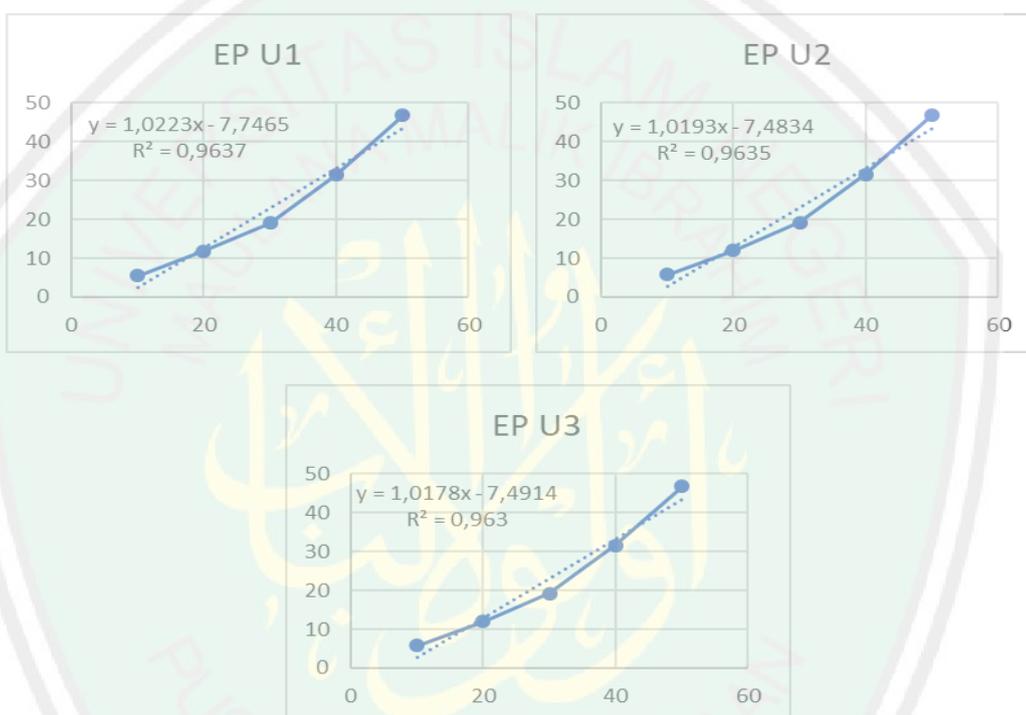
4.2. Kurva Standart

4.2.1. Persamaan Regresi Linier NEP

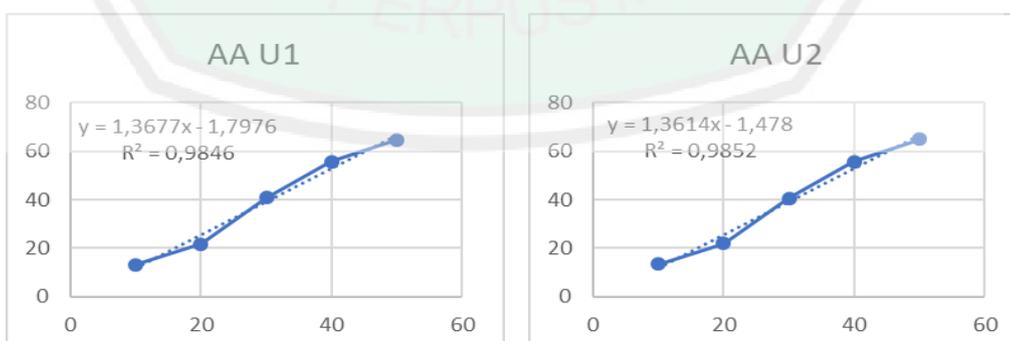


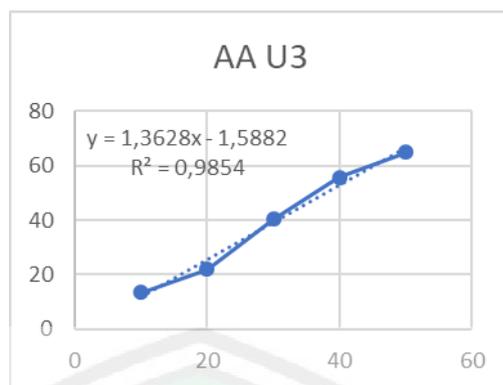


4.2.2. Persamaan Regresi Linier EP



4.2.3. Persamaan Regresi Linier Asam Askorbat (Kontrol)





Lampiran 5. Daftar *Canonical SMILES* berbagai Senyawa pegagan

No	Senyawa aktif	Canonical SMILES
1	umbelliferone	<chem>C1=CC(=CC2=C1C=CC(=O)O2)O</chem>
2	p-coumaric acid	<chem>C1=CC(=CC=C1C=CC(=O)O)O</chem>
3	ascorbic acid	<chem>C(C(C1C(=C(C(=O)O1)O)O)O)O</chem>
4	7-methoxycoumarin	<chem>COC1=CC2=C(C=C1)C=CC(=O)O2</chem>
5	caffeic acid	<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC(=O)O)O)O</chem>
6	myristicin	<chem>COC1=CC(=CC2=C1OCO2)CC=C</chem>
7	ferulic acid	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C=CC(=O)O)O</chem>
8	Apigenin	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O</chem>
9	Luteolin	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O</chem>
10	Kaempferol	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O</chem>
11	Quercetin	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O)O</chem>
12	Chlorogenic acid	<chem>C1C(C(C(C1(C(=O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)O)O</chem>
13	Kaempferol-3-arabinoside	<chem>C1C(C(C(C(O1)OC2=C(OC3=CC(=CC(=C3C2=O)O)O)O)C4=C(C=C(C=C4)O)O)O)O</chem>
14	β -sitosterol	<chem>CCC(CCC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CC=C4C3(CCC(C4)O)C)C)C(C)C</chem>
15	Kaempferol-7-rhamnoside	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2=CC(=C3C(=C2)OC(=C(C3=O)O)C4=CC=C(C=C4)O)O)O)O)O</chem>
16	Kaempferol-4'-rhamnoside	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2=C(OC3=CC(=CC(=C3C2=O)O)O)O)C4=CC=C(C=C4)O)O)O)O</chem>
17	Apigenin-7-O-glucoside	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)OC4C(C(C(O4)CO)O)O)O)O)O</chem>
18	Kaempferol-3-O-rhamnoside	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2=C(OC3=CC(=CC(=C3C2=O)O)O)O)C4=CC=C(C=C4)O)O)O)O</chem>
19	Quercetin-3-arabinoside	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2=C(OC3=CC(=CC(=C3C2=O)O)O)O)C4=CC(=C(C=C4)O)O)O)O)O</chem>
20	Quercetin-3-O-rhamnoside	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2=C(OC3=CC(=CC(=C3C2=O)O)O)O)C4=CC(=C(C=C4)O)O)O)O)O</chem>
21	Kaempferol-5-glucoside	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=C(C(=O)C3=C(O2)C=C(C=C3OC4C(C(C(O4)CO)O)O)O)O)O)O</chem>
22	Luteolin-4'-glucoside	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)OC4C(C(C(O4)COC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)O)O)O)O)O)O)O</chem>
23	Kaempferol-3-O-glucoside	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O)O</chem>
24	Luteolin-7-glucoside	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)OC4C(C(C(O4)COC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)O)O)O)O)O)O)O</chem>

25	Phylloquinone (Vit K)	<chem>CC1=C(C(=O)C2=CC=CC=C2C1=O)CC=C(C)CCCC(C)CCC(C)CCCC(C)C</chem>
26	Betulinic acid	<chem>CC(=C)C1CCC2(C1C3CCC4C5(CCC(C(C5CCC4(C3(CC2)C)C(C)C)O)C)C(=O)O</chem>
27	Quercetin-3-glucoside	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O)O)O</chem>
28	Asiatic acid	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC5C4(CC(C(C5(C)CO)O)O)C)C)C2C1C)C)C(=O)O</chem>
29	Madasiatic acid	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CC(C5C4(CC(C(C5(C)C)O)O)C)O)C)C2C1C)C)C(=O)O</chem>
30	Centellasapogenol A	<chem>CC1(CCC2(CCC3(C(=C2C1)CCC4C3(CCC5C4(CC(C(C5(C)CO)O)O)C)C)C)C(=O)O)C</chem>
31	Methyl asiataate	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC5C4(CC(C(C5(C)CO)O)O)C)C)C2C1C)C)C(=O)OC</chem>
32	Isothankunic acid	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CC(C5(C4(CCC(C5(C)CO)O)C)O)O)C)C2C1C)C)C(=O)O</chem>
33	Madecassic acid	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CC(C5C4(CC(C(C5(C)CO)O)O)C)O)C)C2C1C)C)C(=O)O</chem>
34	Brahmoside	<chem>CC1CCC2C(C13CC(C(O3)C4(CCC5C4(CCC(=O)C(O5)(C)C)C)C)O)(CCC(=O)C(O2)(C)C)C</chem>
35	Terminolic acid	<chem>CC1(CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CC(C5C4(CC(C(C5(C)CO)O)O)C)O)C)C2C1C)C)C(=O)O)C</chem>
36	β-carotene	<chem>CC1=C(C(CCC1)(C)C)C=CC(=CC=CC(=CC=CC=C(C)C)=CC=C(C)C=CC2=C(CCCC2(C)C)C)C</chem>
37	apigenin-7-O-rutinoside	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)OC4C(C(C(O4)CO)O)O)O)O</chem>
38	Kaempferol-7-rhamnoside-4'-glucoside	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2=CC(=C3C(=C2)OC(=C(C3=O)O)C4=CC=C(C=C4)OC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)O)O)O)O)O</chem>
39	apigenin-7-rutinoside-4'-transcaffate	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)OC4C(C(C(O4)CO)O)O)O)O</chem>
40	luteolin-7-O-rutinoside	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)OC4C(C(C(O4)COC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)O)O)O)O)O)O</chem>
41	Rutin	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OCC2C(C(C(C(O2)OC3=C(OC4=CC(=CC(=C4C3=O)O)O)C5=CC(=C(C=C5)O)O)O)O)O)O)O)O</chem>
42	Centellasaponin B	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CC(C5C4(CC(C(C5(C)CO)O)O)C)O)C)C2C1C)C)C(=O)OC6C(C(C(C(O6)COC7C(C(C(C(O7)CO)O)O)O)O)O)O)O</chem>
43	Asiaticoside F	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC5C4(CCC(C5(C)CO)O)C)C)C2C1C)C)C(=O)OC6C(C(C(C(O6)COC7C(C(C(C(O7)CO)OC8C(C(C(C(O8)C)O)O)O)O)O)O)O)O)O</chem>
44	Asiaticoside	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC5C4(CC(C(C5(C)CO)O)O)C)C)C2C1C)C)C(=O)OC6C(C(C(C(O6)COC7C(C(C(C(O7)C)O)OC8C(C(C(C(O8)C)O)O)O)O)O)O)O)O</chem>
45	Centellasaponin C	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CC(C5C4(CC(C(C5(C)C)O)O)C)O)C)C2C1C)C)C(=O)OC6C(C(C(C(O6)COC7C(C(C(C(O7)CO)OC8C(C(C(C(O8)C)O)O)O)O)O)O)O)O</chem>
46	Centellasaponin D	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CC(C5C4(CCC(C5(C)CO)O)C)O)C)C2C1C)C)C(=O)OC6C(C(C(C(O6)COC7C(C(C(C(O7)C)O)OC8C(C(C(C(O8)C)O)O)O)O)O)O)O)O</chem>
47	Centellasaponin A	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2C(OC(C(C2O)O)OCC3C(C(C(C(O3)OC(=O)C45CCC(CC4=C6CCC7C(C6(CC5)C)(CCC8C7(CC(C(C8(C)CO)O)O)C)C)(C)C)O)O)O)CO)O)O)O</chem>
48	Scheffufuroside B	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC5C4(CC(C(C5(C)CC=O)O)O)C)C)C2C1C)C)C(=O)OC6C(C(C(C(O6)COC7C(C(C(C(O7)CO)OC8C(C(C(C(O8)C)O)O)O)O)O)O)O)O</chem>

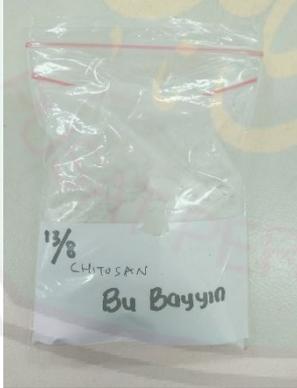
49	Asiaticoside B	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2C(OC(C(C2O)O)OCC3C(C(C(C(O3)OC(=O)C45CCC(CC4C6=CCC7C8(CC(C(C(C8C(CC7(C6(CC5)C)C)O)(C)CO)O)O)C)C)O)O)O)CO)O)O)</chem>
50	Asiaticoside A	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CC(C5C4(CC(C(C5(C)CO)O)C)O)C)C2C1C)C)C(=O)OC6C(C(C(C(O6)COC7C(C(C(C(O7)CO)OC8C(C(C(C(O8)C)O)O)O)O)O)O)O)</chem>

Lampiran 6. Hasil Analisis Senyawa Berdasarkan SwissADME

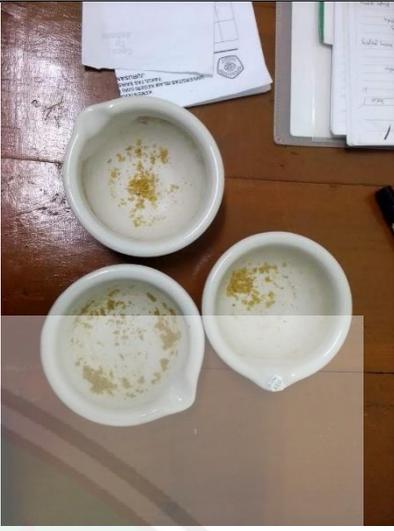
No	Senyawa	Hasil SwissADME	Keterangan
1	Asam askorbat	<p>ascorbic acid</p> <p>SMILES <chem>OCC(O)C(O)C(O)C(O)O</chem></p> <p>Physicochemical Properties</p> <p>Formula C₆H₈O₆</p> <p>Molecular weight 176.12 g/mol</p> <p>Num. heavy atoms 12</p> <p>Num. arom. heavy atoms 0</p> <p>Fraction Csp³ 0.50</p> <p>Num. rotatable bonds 2</p> <p>Num. H-bond acceptors 6</p> <p>Num. H-bond donors 4</p> <p>Molar Refractivity 35.12</p> <p>TPSA 107.22 Å²</p>	<p>Lipopolisitas : -1.64</p> <p>Ukuran : 176,12 g/mol</p> <p>Polaritas : 107,22 Å²</p> <p>Insolubilitas : 0,23</p> <p>Insaturasi : 0,50</p> <p>Fleksibilitas :</p> <p>Aseptor H : 6</p> <p>Donor H : 4</p>
2	Myristicin	<p>myristicin</p> <p>SMILES <chem>C=CCc1cc(OC)cc2c1)OCO2</chem></p> <p>Physicochemical Properties</p> <p>Formula C₁₁H₁₂O₃</p> <p>Molecular weight 192.21 g/mol</p> <p>Num. heavy atoms 14</p> <p>Num. arom. heavy atoms 6</p> <p>Fraction Csp³ 0.27</p> <p>Num. rotatable bonds 3</p> <p>Num. H-bond acceptors 3</p> <p>Num. H-bond donors 0</p> <p>Molar Refractivity 53.10</p> <p>TPSA 27.69 Å²</p>	<p>Lipopolisitas : 2,94</p> <p>Ukuran : 192,21 g/mol</p> <p>Polaritas : 27,69</p> <p>Insolubilitas : -3,00</p> <p>Insaturasi : 0,27</p> <p>Fleksibilitas :</p> <p>Aseptor H : 3</p> <p>Donor H : 0</p>
3	Asam ferulic	<p>ferulic acid</p> <p>SMILES <chem>COc1cc(C=CC(=O)O)ccc1O</chem></p> <p>Physicochemical Properties</p> <p>Formula C₁₀H₁₀O₄</p> <p>Molecular weight 194.18 g/mol</p> <p>Num. heavy atoms 14</p> <p>Num. arom. heavy atoms 6</p> <p>Fraction Csp³ 0.10</p> <p>Num. rotatable bonds 3</p> <p>Num. H-bond acceptors 4</p> <p>Num. H-bond donors 2</p> <p>Molar Refractivity 51.63</p> <p>TPSA 66.76 Å²</p>	<p>Lipopolisitas : 1,51</p> <p>Ukuran : 194,18 g/mol</p> <p>Polaritas : 66,70</p> <p>Insolubilitas : -2,11</p> <p>Insaturasi : 0,10</p> <p>Fleksibilitas :</p> <p>Aseptor H : 5</p> <p>Donor H : 4</p>

2	 <p>Maserasi menggunakan <i>shacker</i></p>	5	 <p>Penguapan pelarut menggunakan <i>Rotary evaporator</i></p>
3	 <p>Filtrasi maserat menggunakan kertas saring</p>	6	 <p>Ekstrak yang diperoleh</p>

7.2. Sintesis Nanopartikel

No	Gambar Pengamatan	No	Gambar Pengamatan
1	 <p>Kitosan</p>	7	 <p>Homogenisasi 10.000 rpm (Disperser)</p>

2	 <p>Asam Asetat Glisial</p>	8	 <p>Sampel sebelum di sentrifugasi</p>
3	 <p>STPP</p>	9	
4	 <p>Homogenisasi STPP</p>	10	 <p>Sampel sebelum diinkubasi</p>

5	 <p>Homogenisasi Kitosan</p>	11	 <p>Sampel setelah diinkubasi</p>
6	 <p>Sampel Homogen (stirer)</p>	12	 <p>Penyimpanan sampel pada alfo</p>

7.3. Proses Analisis Antioksidan

No	Gambar Pengamatan	No	
1	 <p>DPPH</p>	3	 <p>Larutan Stok 100 ppm</p>

2		4	 <p>Seri Larutan Uji</p>
<p style="text-align: center;">5</p>  <p>Pencampuran larutan sampel dan DPPH</p>			





KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Realsyah Ramadhan
NIM : 15620122
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil T.A 2019/2020
Pembimbing : Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si
Judul Skripsi : Aktivitas Antioksidan dan Potensi Obat Oral Senyawa Nanopartikel Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) Tersulut Kitosan Secara In Silico Berdasarkan Hasil Analisis LCMS

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	2 Mei 2019	Konsultasi Judul dan Bab 1	
2	18 Mei 2019	Konsultasi Bab 1	
3	27 Mei 2019	Konsultasi Bab 1 dan Bab 3	
4	29 Juli 2019	Konsultasi Bab 1 – Bab 3	
5	5 Agustus 2019	Penambahan Literatur Pada Bab 1 dan Bab 3	
6	15 Agustus 2019	Konsultasi Metode dan Rancangan Penelitian Antioksidan	
7	26 Agustus 2019	Konsultasi Analisis LCMS	
8	10 Oktober 2019	Konsultasi Hasil Analisis LCMS	
9	14 Oktober 2019	Konsultasi Analisis Antioksidan	
10	17 Oktober 2019	Konsultasi Pembahasan LCMS	
11	20 November 2019	Konsultasi Skripsi	
12	19 Desember 2019	Konsultasi Revisi Skripsi	
13	23 Desember 2019	Acc Skripsi	

Pembimbing Skripsi,

Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M. Si
NIP. 1967 1113 199402 2 001



Malang,2019

..... di Jurusan,

....., M.Si., D.Sc

NIP. 19810201 200901 1 019

