

## Penetapan Kadar Asiatikosida Ekstrak Etanol 70 % Pegagan (*Centella asiatica*) menggunakan Metode LC-MS

Zulkarnaen\*, Alifia Putri F\*\*, Oktavia Eka P\*\*\*

### ABSTRAK

Asiatikosida merupakan komponen utama dalam tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang mempunyai khasiat obat terutama sebagai antiinflamasi yaitu *wound healing*. Pembuatan obat herbal pegagan diperlukan penetapan kadar. Proses penetapan kadar harus dilakukan standarisasi untuk menjamin keseragaman kandungan zat aktif sehingga keamanan, khasiat, dan mutu obat herbal dapat terjamin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar asiatikosida pada ekstrak etanol 70 % pegagan dengan menggunakan metode *liquid chromatography-mass spectra* (LC-MS). Pembuatan ekstrak pegagan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70 %. Uji kualitatif asiatikosida ekstrak etanol 70 % pegagan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Kemudian penetapan kadar asiatikosida menggunakan metode LC-MS termasuk validasi metode yaitu: linearitas, akurasi, presisi, selektivitas, LOD, dan LOQ. Penelitian ini menunjukkan Rf asiatikosida ekstrak pegagan pada uji KLT sebesar 0,2750. Kadar asiatikosida dengan metode LC-MS sebesar 0,232 %. Semua parameter validasi dalam penetapan kadar asiatikosida, linearitas mempunyai nilai korelasi hubungan (r) 0,999 dengan LOD 65,6361 ppb dan LOQ 218,7869 ppb. Akurasi (% recovery) 99,2867–105,5843 %, dan presisi (% koefisien variasi) 0,0613 – 0,2245 %.

Kata kunci: Asiatikosida, *Centella asiatica*, LC-MS, Pegagan.

## Determination of Levels asiatikosida 70 % Ethanol Extract of Gotu Kola (*Centella asiatica*) using LC-MS

### ABSTRACT

Asiaticoside is a major component in gotu kola (*Centella asiatica*), having mainly therapeutic action as a wound healing. Making gotu kola for herbal medicine required standardization process to ensure the uniformity of active substances, thus the safety, efficacy, and quality can be maintain. This reseach aimed to determine the levels of asiaticoside in 70 % ethanol extract of gotu kola by using liquid chromatography-mass spectra (LC-MS). Gotu kola was extracted by maceration process using 70 % ethanol. Next, qualitative test on asiaticoside of gotu kola extract was performed using thin layer chromatography (TLC). Then, the level of asiaticoside in gotu kola extract was assayed using LC-MS including validation methods there are linearity, accuracy, precision, selectivity, LOD, and LOQ. The results of this study showed Rf value of asiaticoside on TLC test was 0.2875. Asiaticoside levels with LC-MS method was 0,232 %. As well as the parameters of the assay validation in asiaticoside, the linearity of the relationship has a correlation value (r) with LOD 0.999 ppb and LOQ 65.6361 218.7869 ppb. Accuracy (% recovery) 99.2867 - 105.5843%, and precision (% coefficient of variation) 0.0613 - 0.2245%.

Keywords: Asiaticoside, *Centella asiatica*, LC-MS, Gotu kola.

\* Program Studi Farmasi, FKUB

\*\* Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi, FKUB

\*\*\* Laboratorium Farmasetika, FKUB

## PENDAHULUAN

Herbal telah banyak dikembangkan sebagai pengobatan di negara berkembang termasuk Indonesia. Menurut World Health Organization (WHO), 80 % masyarakat di dunia masih menggunakan herbal dan pengobatan tradisional. Di Indonesia pemanfaatan tanaman sebagai obat sudah mulai berkembang pesat seiring dengan pemikiran *back to nature*. Salah satu tanaman yang sering dijadikan obat adalah pegagan.<sup>1</sup>

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman yang banyak ditemukan di Indonesia. Secara turun temurun herba pegagan berkhasiat sebagai obat penyembuh luka, radang, reumatik, asma, wasir, tuberkulosis, lepra, disentri, demam, dan penambah darah. Fungsi lain dari pegagan adalah sebagai obat penenang dan antidepresan.<sup>2</sup> Di Indonesia, pegagan banyak terdapat di beberapa tempat, yaitu Cibodas, Cianjur, Banjaran, Cicurung, Bali, Bengkulu, Manoko, Ciwidey, Sumedang, Majalengka, Gunung Putri, Ungaran, Smukren, Boyolali, Karang anyar, Cilember, dan lain-lain.<sup>3</sup>

Asiatikosida merupakan komponen utama dari pegagan yang termasuk golongan saponin triterpen. Studi ilmiah menunjukkan bahwa asiatikosida berfungsi sebagai neuroprotektif untuk terapi penyakit Parkinson yaitu melawan neurotoksisitas yang diinduksi oleh 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP).<sup>4</sup> Bagian pegagan yang mengandung asiatikosida terdapat pada daun (82,6 %), batang (15,9 %), dan akar (1,5 %), sehingga digunakan sebagai herba.<sup>5</sup>

Untuk mendapatkan senyawa kimia yang diinginkan dalam suatu tanaman diperlukan proses ekstraksi.<sup>6</sup> Ekstraksi adalah proses untuk memisahkan bagian senyawa aktif tanaman yang berfungsi

sebagai obat menggunakan pelarut selektif melalui prosedur tertentu. Proses ekstraksi yang umum dilakukan adalah maserasi, perkolasi, infusa, digesti, dekoksi, refluks, dan Soxhlet. Dari berbagai ekstraksi tersebut, dipilih maserasi karena lebih mudah dan dapat menjaga kandungan senyawa tanaman yang tidak tahan panas.<sup>6</sup> Dalam pembuatan obat herbal sangat diperlukan proses standarisasi. Salah satunya adalah proses penentuan kadar zat aktif. Proses ini dilakukan untuk menjamin keseragaman kandungan zat aktif sehingga keamanan, khasiat, dan mutu obat herbal dapat terjamin.<sup>7</sup> Proses analisis kadar asiatikosida ekstrak pegagan menggunakan metode LC-MS.<sup>8</sup> Parameter validasi yang diuji yaitu akurasi, presisi, selektivitas, linearitas, limit deteksi, dan limit kuantitasi.<sup>9</sup>

## BAHAN DAN METODE

### Ekstraksi Pegagan

Sebanyak 400 g pegagan (diperoleh dari Balai Materia Medica, Batu) direndam dalam etanol 70 % teknis 2 liter (1:5). Setiap kali perendaman selama 24 jam disertai pengadukan dengan *overhead stirrer* selama 30 menit dengan kecepatan 500 rpm. Perendaman dilakukan sebanyak lima kali. Penguapan pelarut menggunakan rotavapor dan vacuum drying pada suhu 40 °C.

### Identifikasi Senyawa Asiatikosida dalam Ekstrak Pegagan Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Larutan standar asiatikosida 1 mg/1 ml metanol dan ekstrak pegagan 30 mg/3 ml metanol ditotolkan ke plat silika gel sebanyak 0,5 µl, kemudian diekspansi menggunakan eluen kloroform:asam asetat glacial:metanol:air (60:32:12:8). Setelah tereluasi sampai tanda batas jarak tempuh eluen disemprot dengan anisaldehid asam sulfat dan dipanaskan pada hot plate 100 °C selama 10 menit. Kemudian noda dilihat secara visual dan dengan UV 365 nm.

## Validasi Metode dan Penetapan Kadar Asiatikosida

Kondisi operasi yang dilakukan sebagai berikut: *autosampler* (merk = *thermo scientific*, *type* = *accela*, suhu = 10 °C, volume injeksi 2 µl), UPLC dengan gradient (merk = *thermo scientific*, *type* = *accela*, fase gerak = air + 0,1 asam format, asetonitril + asam format), kolom = *hypersil gold* (50 x 2,1 x 1,9 µM), MSMS (merk = *TSQ quantum acces max (triple quadrupole)*).

### 1. Linearitas

400 ppb, 600 ppb, 800 ppb, 1000 ppb, 2000 ppb, dan 4000 ppb larutan standar asiatikosida diambil dari 100 ppm larutan baku induk asiatikosida. Kemudian diukur kromatogramnya untuk mendapatkan nilai koefisien korelasi.

### 2. LOD dan LOQ

Dihitung berdasarkan kurva linearitas dengan rumus  $LOD = 3 (S_y/x)/b$ ,  $LOQ = 3 (S_y/x)/b$ .

### 3. Selektifitas

1000 ppb, 750 ppb, 500 ppb larutan standar asiatikosida diukur dengan pengulangan tiga kali, kemudian dilihat kemampuan memisahkan dan *retention time*.

### 4. Akurasi

1000 ppb, 750 ppb, 500 ppb larutan standar asiatikosida diukur dengan pengulangan tiga kali, kemudian dihitung % *recovery*.

### 5. Presisi

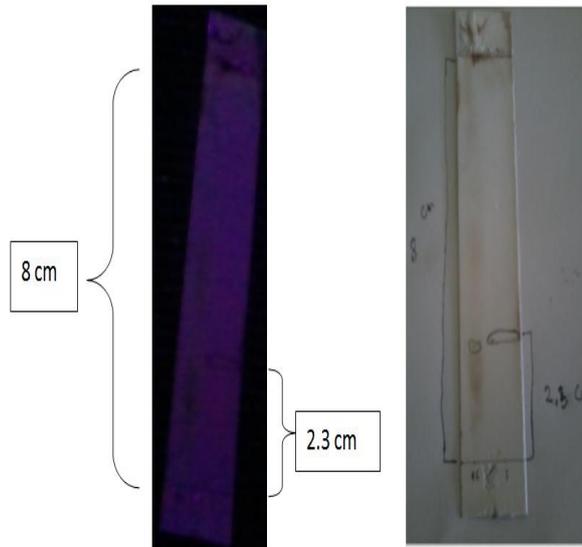
1000 ppb, 750 ppb, 500 ppb larutan standar asiatikosida diukur dengan pengulangan tiga kali, kemudian dihitung % Koefisien Variasi.

### 6. Penetapan Kadar

50 mg ekstrak kental dalam 5 ml metanol pro HPLC, diambil sebanyak 200 µl dan dilarutkan dengan metanol 1 ml, difilter dengan *syringe filter* 0,2 µl PTFE, kemudian diinjeksikan 20 µl. Diulangi sebanyak tiga kali.

## HASIL

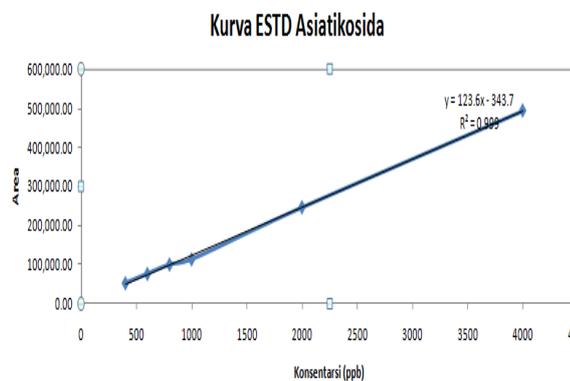
Maserasi 400 g serbuk simplisia herba pegagan dengan pelarut 2 liter (1:5) dalam lima kali proses perendaman didapatkan meserat sebanyak 6720 ml dan total ekstrak kental yang didapatkan sebesar 81,5525 g dengan prosentase rendemen 20,39 %. Uji KLT menunjukkan bahwa noda senyawa asiatikosida ekstrak terdapat pada  $R_f = 0,2750$  dan standar asiatikosida terletak pada  $R_f = 0,2875$ , menurut Wagner (1996), noda senyawa asiatikosida terletak pada rentang 0,2–0,35. Hasil tersebut menunjukkan senyawa asiatikosida secara kualitatif terdapat pada ekstrak etanol 70 % pegagan sehingga bisa dilakukan uji kuantitatif. Hasil uji KLT dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji KLT senyawa asiaticosida ekstrak pegagan

Untuk menetapkan kadar asiaticosida diperlukan proses validasi metode untuk menjamin keseragaman kandungan zat aktif sehingga keamanan, khasiat, dan mutu obat herbal dapat terjamin. Pada uji linearitas didapatkan persamaan regresi linier  $Y =$

$123.6x - 343.7$  dengan koefisien korelasi ( $r$ ) = 0,999. Syarat minimum untuk linearitas adalah 0,996, sehingga data yang diperoleh sudah linier. Kurva linearitas dari persamaan garis tersebut terdapat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva linearitas larutan standar asiaticosida

Uji batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan untuk mengetahui batas deteksi dan kuantitasi terendah dari sampel yang masih dapat menghasilkan data dengan akurasi dan presisi yang baik. Batas deteksi

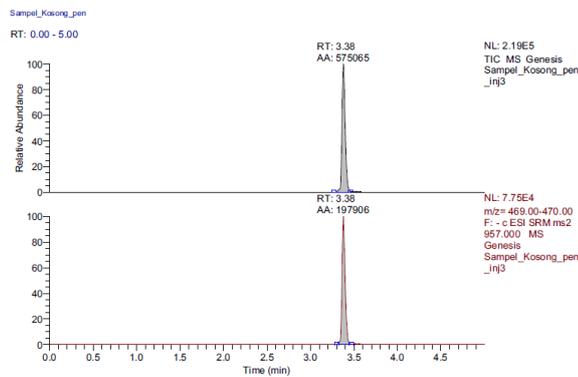
yang diperoleh dari hasil pengujian sebesar 65,6361 ppb dan batas kuantitasi 218,7869 ppb. Data mengenai uji batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji batas deteksi dan batas kuantitasi

Parameter	Nilai
Simpangan baku residual ( $S_y/x$ )	2705.956
Limit deteksi	65.6361 ppb
Limit kuantitasi	218.7869 ppb

Uji selektifitas dilakukan untuk mengetahui spesifisitas dari metode yang digunakan dalam menganalisis senyawa asiatikosida ekstrak egagan. Uji selektifitas pada metode ini sudah terwakili oleh detektor yang digunakan dan kemampuan

dalam mendeteksi senyawa asiatikosida pada *retention time* yang hampir sama yaitu 3,37–3,38 serta pemisahan asiatikosida dari pengotor. Data mengenai uji selektifitas dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kromatogram asiatikosida ekstrak pegagan

Syarat uji akurasi pada penelitian ini adalah nilai % perolehan kembali atau % *recovery* = 80–110 %. Hasil penelitian menunjukkan % *recovery* sampel 2 adalah

105,584 %, sampel 3 adalah 99,287 %, dan sampel 4 adalah 100,703 %. Hasil uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil rata-rata uji akurasi

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata luas area	Rata-rata perolehan kembali (%)
Sampel 2	589173.3333	105.5843
Sampel 3	594534.3333	99.2867
Sampel 4	601024.666	100.7034

Syarat hasil uji presisi adalah prosentase simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dengan nilai sama

dengan atau kurang dari 2,0 %. hasil uji presisi dapat dilihat pada Tabel 3. Kadar asiatikosida ekstrak pegagan dalam

penelitian ini sebesar 0,232 %. Hasil perhitungan kadar ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 3. Hasil rata-rata uji presisi

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata luas area	KV (%)
Sampel 2	589173.3333	0.061265
Sampel 3	594534.3333	0.11968
Sampel 4	601024.666	0.22452

Tabel 4. Hasil perhitungan kadar asiaticosida

Nama	Luas area	Konsentrasi terhitung ( $\mu\text{g/ml}$ )	Kadar dalam 5 ml (mg)	% kadar
Sampel ekstrak	575065	23261.997	0.116	0.232
	576990	23339.818		
	576289	23311.479		
Rata – rata	576114.67	23304.431		

## PEMBAHASAN

Penetapan kadar asiaticosida pada ekstrak pegagan dilakukan untuk mendapatkan kadar asiaticosida yang akan dijadikan dasar penetapan dosis ekstrak pegagan dengan tujuan terapi *wound healing* karena asiaticosida merupakan komponen utama yang mempunyai aktivitas anti inflamasi. Dalam proses penetapan kadar perlu dilakukan standarisasi untuk menjamin keseragaman kandungan zat aktif sehingga keamanan, khasiat, dan mutu obat herbal dapat terjamin. Uji kualitatif diperlukan untuk penetapan kadar, identifikasi dan memastikan adanya senyawa asiaticosida pada ekstrak pegagan. Menurut Septyaningsih (2010), uji kualitatif yang dapat dilakukan adalah pemilahan fitokimia dengan uji busa saponin pada tabung dan uji KLT. Uji KLT lebih dipilih karena uji tabung hanya dapat mengidentifikasi golongan senyawa, sedangkan uji KLT dapat mengidentifikasi senyawa marker yang diinginkan.<sup>10</sup> Standarisasi dalam proses

penetapan kadar yaitu melakukan validasi metode untuk mendapat metode yang terbaik dalam analisis kadar asiaticosida dalam ekstrak pegagan. Parameter yang dilihat adalah linearitas, akurasi, presisi, selektifitas, LOD, dan LOQ. Penetapan kadar asiaticosida dilakukan dengan instrument LC-MS karena dapat mendeteksi senyawa lebih spesifik yakni berdasarkan berat molekul suatu senyawa serta waktu analisis yang cukup singkat.<sup>8</sup> Hal yang pertama kali dilakukan adalah pembuatan ekstrak pegagan dengan menggunakan metode maserasi. Maserasi bertujuan untuk memisahkan senyawa aktif tanaman yang berfungsi obat serta menjaga kandungan senyawa yang tidak tahan panas.<sup>6</sup> Pada proses ini digunakan pelarut etanol 70 % karena bersifat polar yang dapat menarik senyawa organik, tidak toksik, serta titik didih cukup rendah 79 °C sehingga mudah untuk dihilangkan ketika larut dengan senyawa organik.<sup>11</sup> Maserasi dilakukan selama 24 jam (diulang empat kali) dan dilakukan pengadukan menggunakan

*overhead stirrer* untuk mendapatkan maserat yang optimal. Campuran disaring untuk memisahkan filtrat dan ampas, kemudian dirotavapor untuk menghilangkan pelarut serta dilakukan *vacuum drying* untuk menghilangkan kandungan air dalam ekstrak.<sup>6</sup> Hasil yang didapatkan dari proses maserasi 400 g serbuk simplisia herba pegagan dengan pelarut 2 liter (1:5) dalam lima kali proses perendaman didapatkan meserat sebanyak 6720 ml dan total ekstrak kental yang didapatkan sebesar 81,5525 g dengan persen rendemen 20,39 %. Hasil ini sejalan dengan penelitian Harwoko (2014), yaitu hasil ekstraksi ekstrak etanol 70 % pegagan sebesar 20,66 %. Uji kualitatif senyawa asiatikosida ekstrak etanol 70% pegagan dilakukan dengan uji KLT karena dapat mengidentifikasi dan memastikan senyawa marker (bukan golongan senyawa) yang diinginkan yaitu senyawa asiatikosida yang terkandung dalam ekstrak pegagan. Uji KLT menggunakan eluen kloroform:asam asetat glacial:metanol:air (60:32:12:8), pembuatan penampak noda anisaldehyd asam sulfat (anisaldehyd 0,5 ml, asam asetat glacial 10 ml, metanol 85 ml, dan asam sulfur 5 ml), eluen dan penampak noda tersebut digunakan untuk identifikasi asiatikosida.<sup>12</sup> Pembuatan eluen harus sangat tepat karena akan mempengaruhi kepolaran eluen dan mempengaruhi pemisahan senyawa yang terkandung dalam ekstrak.<sup>8</sup> Penampak noda harus dibuat baru untuk memberikan warna noda yang optimal. Setelah plat KLT tereluasi secara sempurna maka disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat yang dibuat dan dipanaskan dengan *hot plate* pada suhu 100 °C selama 7-10 menit untuk melihat noda berwarna cokelat keunguan sampai ungu secara visual. Selain itu, juga dilihat dengan sinar UV 365 untuk melihat noda berwarna ungu kebiruan, kemudian dapat dihitung Rfnya.<sup>12</sup> Uji kualitatif dengan KLT dilihat dari deteksi

noda dan nilai Rf. Uji kualitatif dengan KLT, dua senyawa dikatakan identik jika mempunyai nilai Rf yang sama jika diukur pada kondisi KLT (fase diam dan fase gerak) yang sama. Pada penelitian ini didapatkan nilai Rf standar asiatikosida adalah 0,2875 dan Rf senyawa asiatikosida dalam ekstrak adalah 0,2750, sedangkan rentang Rf asiatikosida menurut literatur adalah 0,2 – 0,35.<sup>12</sup> Hasil ini menunjukkan adanya senyawa asiatikosida pada ekstrak pegagan sehingga dapat dilakukan uji penetapan kadar asiatikosida pada ekstrak pegagan. Langkah selanjutnya adalah penetapan kadar asiatikosida ekstrak pegagan menggunakan metode LC-MS. Validasi metode dilakukan untuk memastikan metode tersebut akurat dan dapat digunakan sebagai metode penetapan kadar, sehingga kadar yang dihasilkan konsisten dan dapat dipercaya. Pada proses ini sampel diambil 200 µl dilarutkan dalam 1 ml metanol, kemudian difiltrasi dengan menggunakan filter 0.2 µm untuk meminimalkan adanya pengotor yang terdeteksi oleh detektor.<sup>8</sup> Parameter validasi yang dilakukan meliputi linearitas, limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ), selektivitas, akurasi, dan presisi.<sup>9</sup> Linearitas merupakan kemampuan metode analisis dalam memberikan respon yang secara langsung proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Dalam penelitian ini dibuat larutan standar asiatikosida 400 ppb, 600 ppb, 800 ppb, 1000 ppb, 2000 ppb, dan 4000 ppb. Hasil yang didapatkan adalah persamaan regresi linier  $Y = 123.6x - 343.7$  dengan koefisien korelasi ( $r$ ) = 0,999. Dari data tersebut uji linearitas memberikan nilai hubungan yang baik antara konsentrasi dan respon, sehingga kurva yang diperoleh dapat memenuhi persyaratan atau linier.<sup>9</sup> Penetapan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ). Batas deteksi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan

respon bermakna dibanding dengan blanko. Batas kuantitasi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi persyaratan akurasi dan presisi.<sup>9</sup> Hasil dari uji batas deteksi dan batas kuantitasi masing-masing secara berurutan adalah sebagai berikut 65,6361 ppb dan 218,7869 ppb. Selektifitas merupakan kemampuan untuk mengukur senyawa marker yang diinginkan secara tepat dan seksama dengan adanya komponen lain dalam matriks sampel seperti pengotor dan produk degradasi. Selektifitas ditunjukkan dengan adanya daya pisah antara senyawa yang diinginkan dengan senyawa lain. Cara memperoleh selektifitas bisa dengan menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama.<sup>8</sup> Pada penelitian ini senyawa asiaticosida dapat terpisah dengan baik dari senyawa-senyawa lainnya dengan menggunakan detektor *mass spectrometry* (MS), sehingga metode dapat mengukur senyawa marker yang diinginkan dengan tepat dan seksama. Uji akurasi dilakukan untuk mengetahui kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Nilai akurasi dihitung dari nilai perolehan kembali (% *recovery*) dengan cara konsentrasi sampel + baku yang diperoleh dikurangi dengan konsentrasi sampel (tanpa larutan baku) yang diperoleh kemudian dibagi konsentrasi larutan baku yang ditambahkan dan dikalikan dengan 100 %. Uji akurasi dilakukan pada tiga konsentrasi dengan pengulangan tiga kali pada masing-masing konsentrasi. Pengulangan dilakukan untuk membuktikan apakah detektor dapat mengukur dengan baik pada konsentrasi yang berbeda beda. Pada penelitian ini nilai persentase perolehan kembali sebagai berikut: sampel 2 rata-rata % R = 105,5843 %, sampel 3 rata-rata % R = 99,2867 %, dan sampel 4 rata-rata % R = 100,7034 %. Perolehan kembali yang dipersyaratkan untuk konsentrasi 100 ppb–1 ppm adalah

80–110 %, sehingga hasil untuk uji akurasi telah memenuhi persyaratan uji.<sup>9</sup> Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi atau keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Pada penelitian ini didapatkan nilai uji presisi sebagai berikut: penambahan konsentrasi larutan baku 0,5 ppm % KV = 0,0613 %, penambahan konsentrasi larutan baku 0,75 ppm % KV = 0,1197, penambahan konsentrasi larutan baku 1 ppm % KV = 0,2245. Kriteria presisi diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2 % atau kurang. Hasil ini menunjukkan bahwa uji presisi sudah memenuhi persyaratan uji (USP 32, 2009). Hasil dari parameter validasi metode analisis yang telah dilakukan secara keseluruhan memenuhi persyaratan yang ditetapkan untuk penetapan kadar asiaticosida ekstrak pegagan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode analisis dan penetapan kadar asiaticosida dapat dinyatakan konsisten dan dapat dipercaya atau valid. Pada penelitian ini dapat dihitung kadar asiaticosida pada ekstrak pegagan menggunakan metode LC–MS dengan replikasi sebanyak tiga kali sebesar 0,232 %.

## DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. *Traditional medicine*. (online). 2003. Diakses 28 Februari 2013. from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en>.
2. Musyarofah N, Susanto S, Aziz SA, Kartosono S. Respon Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) terhadap Pemberian Pupuk Alami di

- Bawah Naungan. *Bul Agron.* 2007. 35(3): 217 – 224.
3. Nurjanah N. Studi Karakter agronomi pada 17 Akses Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban). Skripsi. Bogor: Program Studi Agronomi IPB. 2008.
  4. Orhan IE. *Centella asiatica* (L.) Urban: from Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential. *Review Article. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2012.
  5. Kim WJ, Kim JD, Veriansyah B, Kim J, Oh SG, Tjandrawinata RR. *Extraction of Asiaticoside from Centella asiatica : Effects of solvents and extraction methods.* Korea: Institute of Science and Technology. Supercritical Fluid Lab. 2004
  6. Handa SW, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants.* Trieste: International Centre For Science And High Tchnology. 2008.
  7. Chaturvedi M, Manish K, Amit S, Alimuddin S. Recent Development in Novel Drug Delivery Systems of Herbal Drugs. *International Journal of Green Pharmacy.* 2011. 5(2): 87-95.
  8. Gandjar IG, Rohman A. *Kimia Farmasi Analisis.* Yogyakarta: Pustaka Pelajar. 2007.
  9. USP 32–NF 27. *United States Pharmacopeia and The National Formulary.* Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention. 2009.
  10. Septyaningsih D. Isolasi dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk). Skripsi. Surakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta. 2010.
  11. Ramadhan AE, Phaza HA. Pengaruh Konsentrasi Etanol, Suhu dan Jumlah Stage pada Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale* Rosc) Secara Batch. Skripsi. Semarang: Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro Semarang. 2010.
  12. Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography.* Atlas. 2<sup>nd</sup> Edition. Munchen: Springer. 1996. p 152. 300. 359.
  13. Rahman MN. Aktivitas Antibakteri Senyawa Hasil Biotransformasi Kurkumin oleh Mikrob Endofit Asal Kunyit. Skripsi. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian IPB. 2009.