

Analisis kandungan bioaktif di dalam pegaga (Determination of bioactive compounds in pennywort)

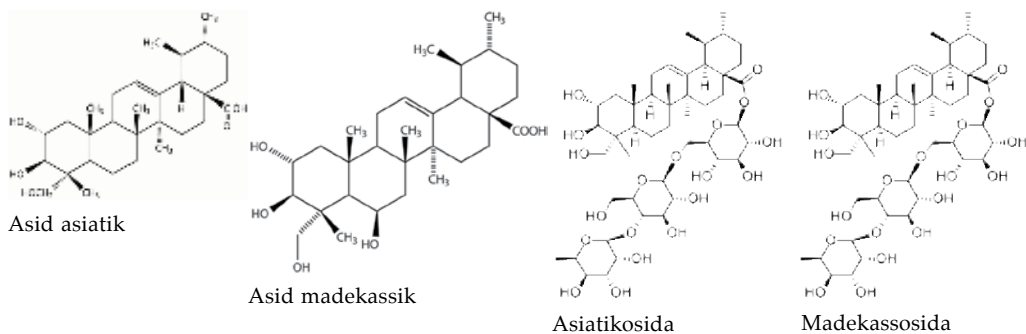
Sharizan Ahmad, Ariff Zaidi Jusoh, Jeeven Karruppan, Mohd Nazrul Hisham Daud, Hasnisa Hashim dan Nor Fadhilah Sapiee

Pengenalan

Pegaga atau nama saintifiknya *Centella asiatica* merupakan tumbuhan herba menjalar semusim atau dikenali sebagai tumbuhan herba malar hijau yang hidup melata di atas tanah, berbatang halus panjang dan daunnya berbentuk ginjal. Pegaga berasal daripada famili Apiaceae juga dikenali dengan nama tapak kuda, *indian pennywort* dan gotu kola. Ia boleh didapati tumbuh di kawasan tanah yang subur, lembap dan bersaliran baik. Terdapat beberapa varieti pegaga iaitu pegaga cina, pegaga nyonya berdaun lebar, pegaga Kelantan, pegaga renek, pegaga salad, pegaga gajah dan pegaga Brunei.

Di Malaysia, pegaga merupakan sejenis ulaman yang cukup popular kerana dikatakan mempunyai beberapa khasiat sebagai agen penyembuh luka, penyakit kulit, lelah, sengal badan, bahan antipenuaan, melancarkan peredaran darah, mengecutkan saluran peranakan, minuman penyejuk badan dan kecerdasan minda. Pelbagai produk minuman berasaskan pegaga dibangunkan dan mendapat perhatian pengguna di pasaran.

Kajian mengenai khasiat pegaga banyak dilakukan terutama di India kerana ia merupakan bahan utama dalam perubatan *ayurveda*, antaranya sebagai penyejuk badan dan awet muda. Dalam beberapa kajian saintifik yang telah dijalankan, beberapa sebatian kimia utama telah berjaya diasingkan dan dilakukan ujian klinikal bagi menentukan kesan terhadap penyakit. Sebatian kimia aktif utama yang terdapat di dalam pegaga ialah triterpenoid glikosida yang terdiri daripada madekassosida, asiaticosida, asid asiatic dan asid madekassik. Sebatian aktif ini ditunjukkan seperti dalam *Rajah 1*. Kumpulan ini terdiri daripada kumpulan pentasiklik triterpina yang kumpulan utamanya terdiri daripada asid β -amirin ursolik. Sebatian kimia triterpenoid glikosida



Rajah 1. Struktur sebatian kimia aktif dalam pegaga

(madekassosida, asiaticosida, asid asiatik dan asid madekassik) dianggap sebagai bahan farmakologi aktif yang bermanfaat untuk meningkatkan kesihatan manusia. Kajian lepas melaporkan sebatian ini telah mempamerkan aktiviti penyembuhan luka yang ketara. Kajian juga menunjukkan bahawa sebatian ini mampu menyingkirkan radikal bebas yang boleh digunakan untuk pencegahan arteriosklerosis, kanser, kencing manis dan artritis.

Kandungan sebatian kimia aktif yang terdapat di dalam pegaga perlu ditentukan bagi memastikan kualiti bahan mentah dan produk yang dibangunkan. Bahan kimia aktif tersebut boleh ditentukan dengan menggunakan beberapa kaedah, antaranya adalah kaedah analisis titrimetrik iaitu menentukan jumlah kandungan asid terpina. Kaedah ini tidak begitu tepat kerana beberapa proses sampingan seperti hidrolisis perlu dilakukan terhadap asid yang memberi kandungan yang kurang tepat. Kaedah yang ringkas dan murah menggunakan kromatografi lapisan nipis (TLC) juga boleh digunakan, tetapi kaedah ini hanya merupakan kaedah bagi penentuan secara kualitatif. Dalam kajian ini, penentuan kandungan sebatian aktif di dalam pegaga secara kualitatif dan kuantitatif ditentukan dengan menggunakan kaedah kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC).

Penyediaan dan pengekstrakan sampel pegaga

Sebanyak enam jenis sampel pegaga digunakan dalam kajian ini iaitu Pegaga Pasar Borong Selangor, Pegaga Nyonya Melaka, Pegaga Perlis, Pegaga Telong dan produk pegaga yang disembur kering. *Gambar 1* menunjukkan contoh pegaga daripada varieti Nyonya yang dikaji. Penyediaan ekstrak mentah dilakukan melalui dua kaedah iaitu kaedah rendaman (*cold extraction*) dan pemanasan menggunakan Soxhlet (*hot extraction*). Bagi kaedah rendaman, sebanyak 10 g sampel pegaga dimasukkan ke dalam kelalang Erlenmeyer yang bersaiz 500 ml. Sebanyak 400 ml pelarut dimasukkan ke dalam kelalang tersebut. Sampel dibiarkan selama 3 hari dan digoncang sekali-sekala sebelum diganti dengan pelarut yang baru.



Gambar 1. Contoh sampel pegaga yang dikaji

Bagi kaedah Soxhlet, proses pemanasan akan dilakukan selama 6 jam dan sebanyak 200 ml pelarut telah digunakan. Pelarut yang bercampur dengan bahan yang diekstrak kemudian dituras dan disejatkan sehingga kering di bawah tekanan rendah menggunakan peralatan *rotary evaporator*. Ekstrak mentah disimpan sejuk pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sebelum digunakan untuk analisis berikutnya.

Analisis sebatian kimia aktif di dalam pegaga

Kaedah kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) merupakan satu kaedah yang cepat dan tepat bagi penentuan sebatian kimia aktif di dalam pegaga. Dalam kajian ini, peralatan HPLC model Shimadzu, suntikan sampel secara automatik dan pengesan spektrofotometer PDA digunakan. Jarak gelombang yang digunakan ditetapkan pada 222 nm. Kolum pemisah adalah jenis *LiChrospher* 100 RP18-5 μm , 250 x 4 mm dan suhu turus pemisah ditetapkan pada $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sepanjang analisis dilakukan.

Asid madekassik, asid asiatik, madekassosida dan asiatikosida yang telah dipiawaikan diperolehi dari Extrasynthase, Genay France. Sampel piawai kemudiannya ditimbang dengan tepat dan dimasukkan ke dalam kelalang isi padu 100 ml. Larutan metanol dimasukkan ke dalam setiap kelalang bagi menyediakan larutan stok yang berkepekatan 500 mg/l dan seterusnya beberapa stok piawai yang berkepekatan 25, 50, 75 dan 125 mg/l telah disediakan.

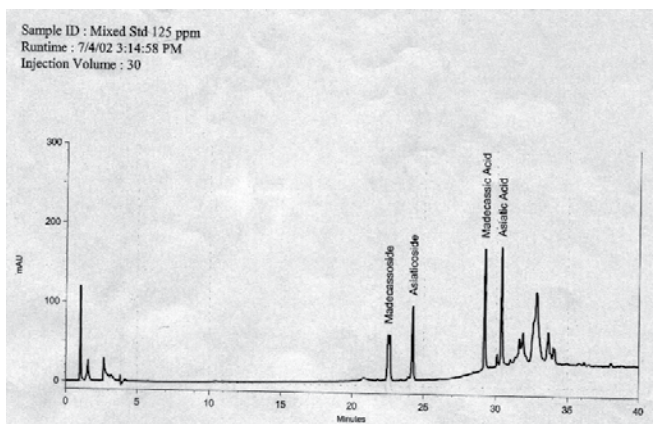
Untuk analisis HPLC, ekstrak mentah sampel pegaga ditimbang dengan tepat dan dimasukkan ke dalam botol sampel diikuti dengan 2 ml pelarut metanol. Kemudian sebanyak 300 μl larutan ekstrak mentah dimasukkan ke dalam botol sampel yang mengandungi 5 ml metanol. Larutan ekstrak mentah ini dituras menggunakan penuras membran *Gelman GHP Acrodisc* 13 mm yang bersaiz 0.45 μm dan sebanyak 10 μl telah digunakan untuk analisis.

Teknik gradien telah digunakan bagi tujuan pemisahan di mana fasa gerak yang digunakan terdiri daripada air dan asetonitril. Ringkasan komposisi fasa gerak ditunjukkan seperti dalam *Jadual 1*.

Dalam kaedah ini, penggunaan larutan penimbal tidak diperlukan walaupun diketahui bahawa prestasi kolum pemisah C_{18} adalah lebih baik jika berkeadaan berasid. Tanpa larutan penimbal, sebatian kimia aktif ini dapat dipisahkan dengan baik dan keadaan ini juga membolehkan jangka hayat kolum pemisah yang digunakan lebih lama. Penggunaan teknik gradien

Jadual 1. Komposisi fasa gerak bagi penentuan sebatian kimia aktif dalam pegaga

Masa (min)	Aliran pelarut (ml/min)	Pelarut A (Air, %)	Pelarut B (Asetonitril, %)
0 – 15	1	90 – 72	10 – 28
15 – 20	1	72 – 60	28 – 40
20 – 25	1	60 – 10	40 – 90
25 – 35	1	10	90



Rajah 2. Kromatogram bagi analisis larutan piawai campuran asid madekassik, asid asiatik, madekassosida dan asiatikosida

linear diperlukan kerana terdapat dua kumpulan utama di dalam sebatian aktif pegaga yang berbeza dari segi kekutuban. Bagi pemisahan asid triterpena (asid asiatik dan asid madekassik) kepolaran larutan fasa gerak perlu ditingkatkan, manakala bagi pemisahan kumpulan glikosida (madekassosida dan asiatikosida) kekutuban larutan fasa gerak perlu dikurangkan. *Rajah 2* menunjukkan kromatogram yang dihasilkan daripada

pengubahsuaian komposisi fasa gerak yang terdiri daripada asetonitril dan air. Masa analisis yang diperlukan ialah 1 jam. *Jadual 2* menunjukkan masa penahanan bagi setiap sebatian kimia aktif di dalam pegaga.

Perbandingan sebatian kimia aktif dalam beberapa jenis pegaga dan produk

Jadual 3 menunjukkan kandungan sebatian kimia aktif yang diekstrak daripada Pegaga Nyonya Melaka dengan menggunakan dua kaedah berbeza iaitu pengekstrakan menggunakan kaedah Soxhlet dan kaedah rendaman. Daripada data yang diperolehi, teknik pengekstrakan menggunakan Soxhlet menghasilkan kandungan sebatian kimia aktif yang paling banyak berbanding dengan kaedah rendaman. Kaedah Soxhlet akan membolehkan proses pengekstrakan berlaku secara berterusan dan dengan tenaga haba yang dibekalkan semasa pemanasan pelarut, keupayaan tenaga yang terdapat adalah tinggi untuk mengekstrak

Jadual 2. Masa penahanan (Rt) bagi sebatian kimia aktif di dalam pegaga

Komponen aktif	Masa penahanan (Rt)
Madekassosida	22.51
Asiatikosida	24.21
Asid madekassik	29.19
Asid asiatik	30.37

sebatian kimia yang terdapat di dalam pegaga. Bagi pengekstrakan sampel pegaga lain, teknik pengekstrakan menggunakan Soxhlet telah digunakan.

Jadual 4 menunjukkan kandungan madekassosida, asiatikosida, asid asiatik dan asid madekassik di dalam beberapa sampel pegaga yang diperolehi dari pelbagai lokasi. Data yang diperolehi

Jadual 3. Kuantiti sebatian kimia aktif di dalam pegaga hasil daripada dua kaedah pengekstrakan berbeza

Kaedah pengekstrakan	Madekassosida (mg/kg)	Asiatikosida (mg/kg)	Asid madekassik (mg/kg)	Asid asiatik (mg/kg)
Soxhlet	348.31	161.16	35.66	39.05
Rendaman	116.08	41.00	41.32	20.43

Jadual 4. Kuantiti madekassosida, asiatikosida, asid asiatik dan asid madekassik dalam beberapa sampel pegaga terpilih

Sumber	Madekassosida (mg/g)	Asiatikosida (mg/g)	Asid asiatik (mg/g)	Asid madekassik (mg/g)
Pegaga Pasar Borong Selangor	0.7	1.1	2.4	1.6
Pegaga Nyonya Melaka	5.6	2.0	2.2	1.1
Pegaga Perlis	4.0	3.5	3.3	1.1
Pegaga Telong, Kelantan	0.3	0.2	1.3	1.4
Pegaga diproses (<i>spray dry</i>)	–	–	0.12	0.09

menunjukkan bahawa Pegaga Nyonya Melaka mempunyai kandungan sebatian kimia aktif yang tinggi berbanding dengan pegaga yang ditanam peladang tempatan. Perbezaan ini mungkin disebabkan oleh faktor kawalan terhadap tanaman di mana kemungkinan faktor tanah dan pembajaan memainkan peranan yang penting. Bagi produk pegaga yang telah dihasilkan (*spray dry*), kandungan sebatian kimia aktif madekassosida dan asiatikosida tidak dapat dikesan dan kandungan asid asiatik dan madekassik terlalu rendah disebabkan faktor haba yang terlalu tinggi semasa proses penghasilan produk tersebut.

Kesimpulan

Penggunaan peralatan HPLC bagi menentukan kandungan madekassosida, asiatikosida, asid asiatik dan asid madekassik di dalam pegaga merupakan salah satu kaedah yang tepat dan cepat. Teknik pengekstrakan menggunakan kaedah Soxhlet pula lebih berkesan untuk mengekstrak sebatian kimia aktif ini di dalam pegaga berbanding dengan kaedah rendaman (*cold extraction*). Kajian ini menunjukkan bahawa kandungan sebatian kimia aktif tertinggi di dalam pegaga Thailand diikuti dengan Pegaga Nyonya dari Melaka dan pegaga tempatan lain.

Penghargaan

Penulis ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada Kerajaan Malaysia dan MARDI kerana memberi peruntukan kewangan (No. 1900301635) bagi menjayakan projek ini. Setinggi-tinggi penghargaan juga buat kumpulan penyelidik dan ahli-ahli kumpulan kerja yang terlibat secara langsung dan tidak langsung dalam kajian ini.

Bibliografi

- Ang, L.H., Ho, W.M., Ramli, M.O., Maimon, A., Chung, P.Y. dan Ng, L.T. (2000). The update of potentially toxic elements in some economically impotent plants and fish produced from ex mining sites in Bidor. Kertas kerja yang dibentangkan dalam The Malaysian Science Technology Congress 2000, 18 – 20 September 2000. Kota Kinabalu, Sabah
- Inamdar, P.K., Yeole, R.D., Ghorage, A.B. dan De Souza, N.J (1996). Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. *Journal Of Chromatography A* 742: 127 – 130
- Indu Bala, J. dan Ng, L.T. (2002). Herbs the green pharmacy of Malaysia. Serdang: Vinpress Sdn. Bhd.
- Indu Bala, J., Samiyah, M.N., Razali, A.R. dan Muthuvellu, C. (2001). Herba berpotensi di Malaysia. Serdang: MARDI
- Kim, C.K, Kim, J.H., Park, K.M., Oh, K.H., Oh, U. dan Hwang, S.J. (1997). Preparation and evaluation of titrated extract of *Centella asiatica* injection in the form of an extemporaneous micellar solution. *International Journal Of Pharmaceutics* 146: 63 – 70
- Rosalizan, M.S., Rohani, M.Y., Khatijah, I. dan Shukri, M.A. (2008). Physical characteristics, nutrient contents and triterpene compounds of ratoon crops of *Centella asiatica* at three different stages of maturity. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science* 36(1): 43 – 51
- Shukla, A., Rasik, A.M., Jain, G.K., Shankar, R., Kulshrestha, D.K. dan Dhawan, B.N. (1999). In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology* 65: 1 – 11
- Veerendra Kumar, M.H. dan Gupta, Y.K. (2002). Effects of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats. *Journal Of Ethnopharmacology* 79: 253 – 260

Ringkasan

Centella asiatica atau pegaga merupakan sejenis tanaman herba yang mempunyai pelbagai khasiat untuk kesihatan. Pengubahsuaian komposisi fasa gerak telah dijalankan bagi membangunkan kaedah penentuan kandungan madecassosida, asiaticosida, asid asiatik dan asid madecassik menggunakan peralatan kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC). Dua teknik pengekstrakan berbeza telah dijalankan, di mana kaedah Soxhlet menunjukkan hasil pengekstrakan sebatian kimia aktif yang lebih tinggi berbanding dengan kaedah rendaman. Pegaga yang diperoleh dari Thailand pula mengandungi sebatian kimia aktif yang tinggi berbanding dengan pegaga tempatan.

Summary

Centella asiatica or pennywort is a herbal plant which has many health benefits. Modification of the mobile phase composition was carried out to develop a method of determining the madecassoside, asiaticoside, asiatic acid and madecassic acid content using high-performance liquid chromatography (HPLC). Two different extraction techniques were conducted, in which the method of Soxhlet extraction showed higher active compounds as compared to cold extraction method. Pennywort from Thailand contained higher active compounds than the local pennywort.

Pengarang

Sharizan Ahmad

Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM 43400 Serdang, Selangor

E-mel: sharizan@mardi.gov.my

Arif Zaidi Jusoh, Jeeven Karruppan, Mohd Nazrul Hisham Daud, Hasnisa Hashim
dan Nor Fadhilah Sapiee

Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM 43400 Serdang, Selangor