

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian dan Analisis Data

5.1.1 Ekstraksi Herba Pegagan (*Centella asiatica*)

Dalam pembuatan ekstrak pada penelitian ini, digunakan metode maserasi. Proses ini, dimulai dengan penimbangan 1 kg serbuk simplisia herba Pegagan. Serbuk yang telah ditimbang tersebut dimasukkan ke dalam toples maserator, lalu ditambahkan 5 liter etanol 70%, dan diaduk selama 30 menit. Kemudian direndam selama 24 jam. Selanjutnya, hasil rendaman ekstrak disaring menggunakan kain flanel, sehingga didapatkan maserat. Tahap berikutnya adalah dilakukan remaserasi sebanyak 4 kali dengan pelarut etanol 70%. Seluruh hasil maserat ditampung dalam satu tempat. Perolehan maserat dari 400 gram serbuk simplisia herba Pegagan dapat dilihat pada Tabel 5.1 sebagai berikut.

Tabel 5.1 Hasil Maserasi Serbuk Simplisia Herba Pegagan

Maserasi / Remaserasi ke-	Jumlah Maserat
Maserasi	2500 ml
Remaserasi ke-1	3000 ml
Remaserasi ke-2	3950 ml
Remaserasi ke-3	4250 ml
Remaserasi ke-4	3000 ml
Total	16700 ml

Dilakukan proses penguapan pada maserat yang masih mengandung etanol 70% dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Ekstrak

kental yang didapatkan dari proses penguapan etanol dapat dilihat pada Tabel 5.2, sebagai berikut.

Tabel 5.2 Hasil Ekstrak Kental Serbuk Simplisia Herba Pegagan

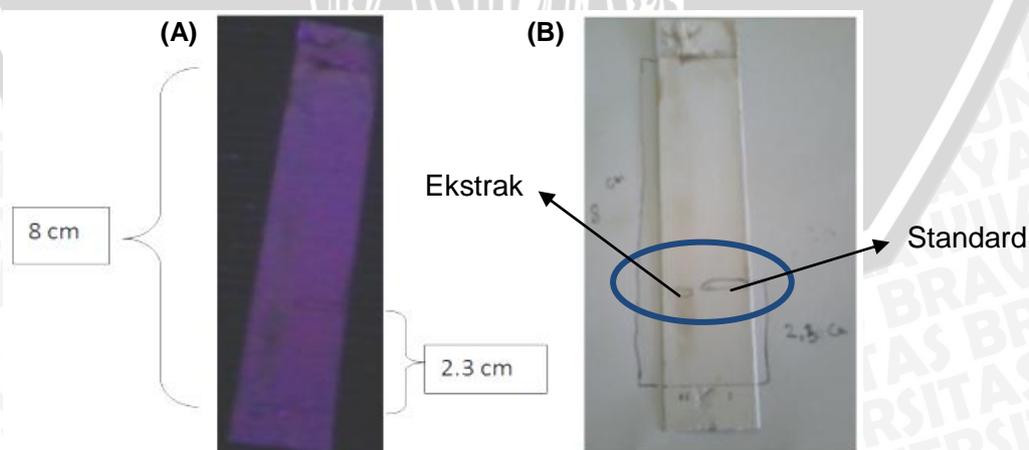
Rotav ke-	Jumlah Maserat	Ekstrak Kental
1	1500 ml	21, 783 gram
2	1500 ml	18, 9363 gram
3	1500 ml	20,9434 gram
4	1500 ml	20,7456 gram
5	1500 ml	23,7441 gram
6	1500 ml	19,0473 gram
7	1500 ml	18,8721 gram
8	1500 ml	21,9543 gram
9	1500 ml	18,3003 gram
10	1500 ml	18,6555 gram
11	1500 ml	21,3151 gram
12	200 ml	3,245 gram
Total		227, 5447 gram

Proses selanjutnya adalah dilakukan penguapan air dengan menggunakan *vacum drying* suhu 40°C untuk mendapatkan ekstrak kental dengan kandungan air minimum yang ditandai dengan berat ekstrak menjadi konstan. Total ekstrak kental dengan kandungan air minimum yang didapatkan sebanyak 221,4331 gram dengan % rendemen 22,14% yang diperoleh dari perhitungan sebagai berikut.

$$\begin{aligned}
 \% \text{ rendemen} &= (\text{ekstrak kental} / \text{serbuk simplisia kering}) \times 100\% \\
 &= (221,4331 \text{ gram} / 1000 \text{ gram}) \times 100\% \\
 &= 22,14321\%. \\
 &\approx 22,14\%.
 \end{aligned}$$

5.1.2 Uji Kualitatif Asiatikosida

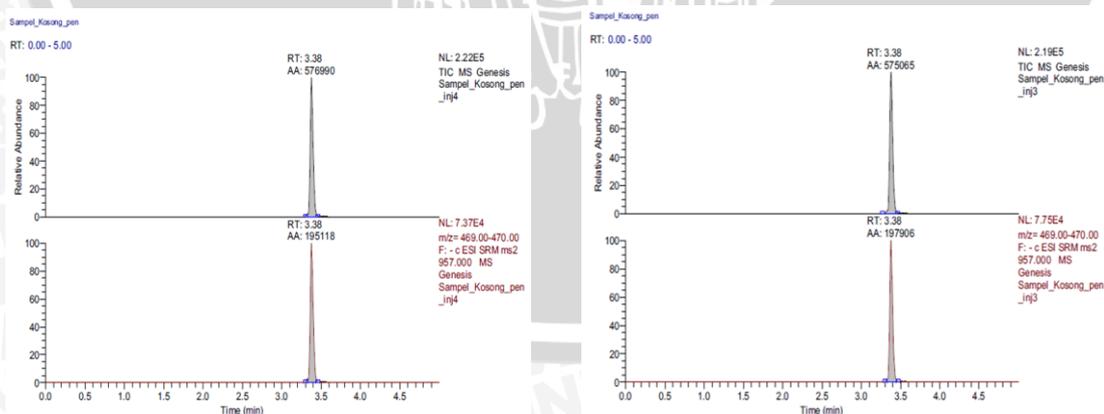
Pada uji kualitatif identifikasi senyawa fitokimia asiatikosida pada ekstrak simplisia herba Pegagan digunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Eluen yang digunakan pada fase gerak menggunakan perbandingan pelarut kloroform : asam asetat glasial : metanol : air (60 : 32 : 12 : 8). Plat KLT disemprot menggunakan penampak noda anisaldehyd asam sulfat yang dibuat dari campuran anisaldehyd 0,5 mL, asam asetat glasial 10 mL, metanol 85 mL, dan asam sulfur 5 mL. Kemudian, plat yang telah disemprot dipanaskan pada suhu 110°C hingga terlihat bercak warna. Pengamatan bercak warna pada KLT dilakukan pada UV-365 nm. Menurut Wagner dan Bladt (1996), penampakan noda senyawa asiatikosida terletak pada rentang 0.2 – 0.35 dengan warna coklat keunguan hingga ungu. Berdasarkan hasil uji KLT secara visual, penampakan noda dari senyawa asiatikosida ekstrak terletak pada *Retardation factor* (R_f) = 0,2750 (Gambar 5.1). Angka tersebut mendekati standard asiatikosida yang terletak pada R_f = 0,2875. Dengan hasil tersebut, secara kualitatif menyatakan senyawa asiatikosida terdapat pada ekstrak etanol 70% dari simplisia herba Pegagan.



Gambar 5.1 Plat Hasil KLT (A) UV-365 nm, (B) Visual.

5.1.3 Uji Kuantitatif Asiatikosida

Uji kuantitatif untuk mengetahui kadar asiatikosida dilakukan menggunakan metode *Liquid Chromatography - Mass Spectra/Mass Spectra* (LC-MS/MS). Spesifikasi kondisi operasi LC-MS/MS yang digunakan adalah : *autosampler* (suhu = 10°C, volume injeksi 2 µl), UPHLC dengan gradien (fase gerak = air + 0.1 asam format, asetonitril + asam format), kolom (50 x 2.1 x 1.9 µm), dan LC/MS/MS. Untuk memastikan presisi dan akurasi dari metode yang digunakan, dilakukan validasi metode. Dilarutkan sampel 200 µL dalam 1 ml metanol, kemudian difiltrasi menggunakan filter 0.2 mikron untuk meminimalkan adanya kontaminan. Kadar senyawa asiatikosida dari ekstrak etanol 70% simplisia herba Pegagan berdasarkan hasil spektrogram LC-MS/MS adalah sebesar 0.232% dengan berat molekul $m/z = 957,00$ yang dikalkulasikan untuk $m/z = 469,54 - 470,89$. Menurut Bermawie *et al.* (2008), kadar asiatikosida dalam Pegagan, berada pada kisaran 0,15% - 1,49%. Sehingga, secara kuantitatif kadar asiatikosida dalam ekstrak simplisia herba Pegagan memenuhi rentang.

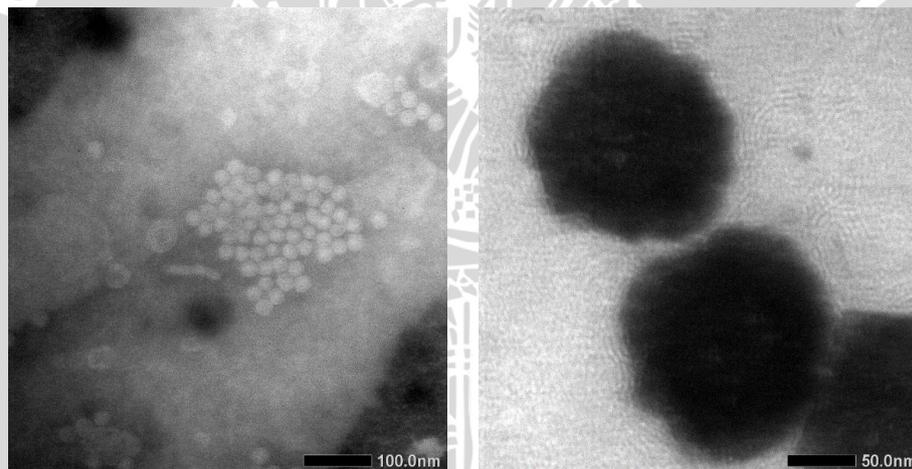


Gambar 5.2 Kromatogram LC dan Fragmentasi Spektra LC-MS/MS

Ekstrak Pegagan dan *Phytosome* Ekstrak Pegagan.

5.1.4 Evaluasi Morfologi dan Ukuran Partikel *Phytosome* Ekstrak Pegagan

Uji evaluasi morfologi dan ukuran partikel *phytosome* ekstrak Pegagan dilakukan dengan menggunakan alat *Transmission Electron Microscopy* (TEM) dengan perbesaran 10.000 kali. Hasil evaluasi menunjukkan bahwa distribusi ukuran partikel *phytosome* ekstrak Pegagan ± 100 nm, tersebar pada kisaran ukuran 50,0 – 100,0 nm dan memiliki morfologi membentuk satu lapisan lipid, sehingga dapat dikatakan tergolong ke dalam *Small Unilamellar Vesicle* (SUV) yang memiliki spesifikasi rentang ukuran liposom 20 - 100 nm (Anwekar *et al.*, 2011). Didapatkan pula rentang diameter *phytosome* ekstrak Peggan antara 1,39 – 2,06 μm .

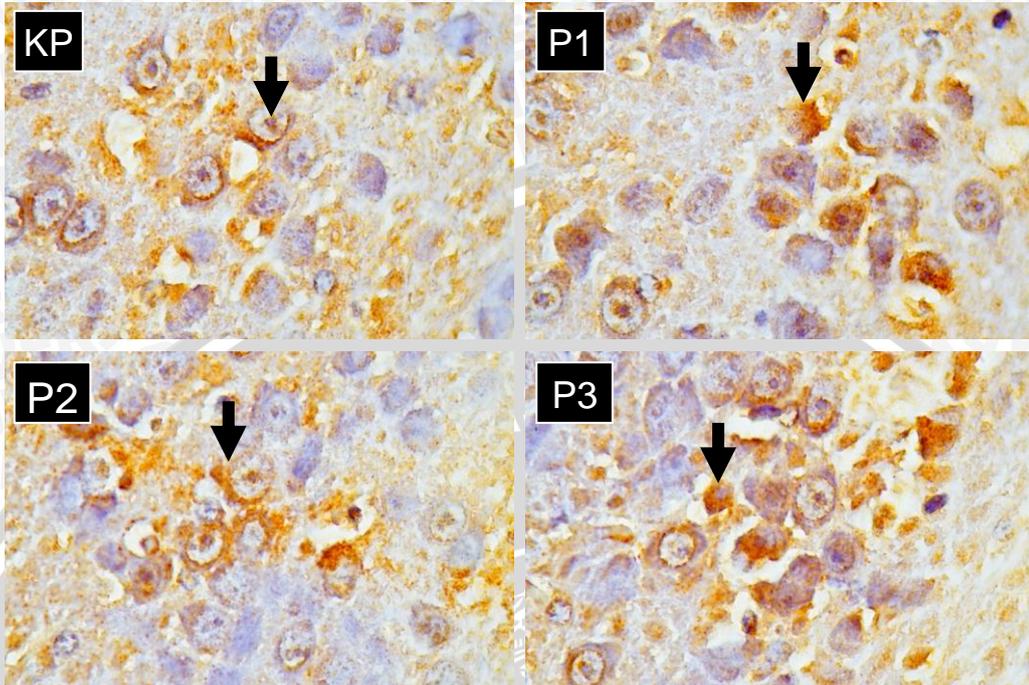


Gambar 5.3 Visualisasi Morfologi dan Ukuran Partikel *Phytosome*

Hasil Karakterisasi TEM

5.1.5 Distribusi Fosfolipid

Perhitungan distribusi fosfolipid dilakukan dengan pengamatan slide preparat menggunakan *software Scan dot Slide Olivya*. Gambaran histopatologi dari jaringan otak tikus pada semua kelompok dapat dilihat pada **Gambar 5.4**.

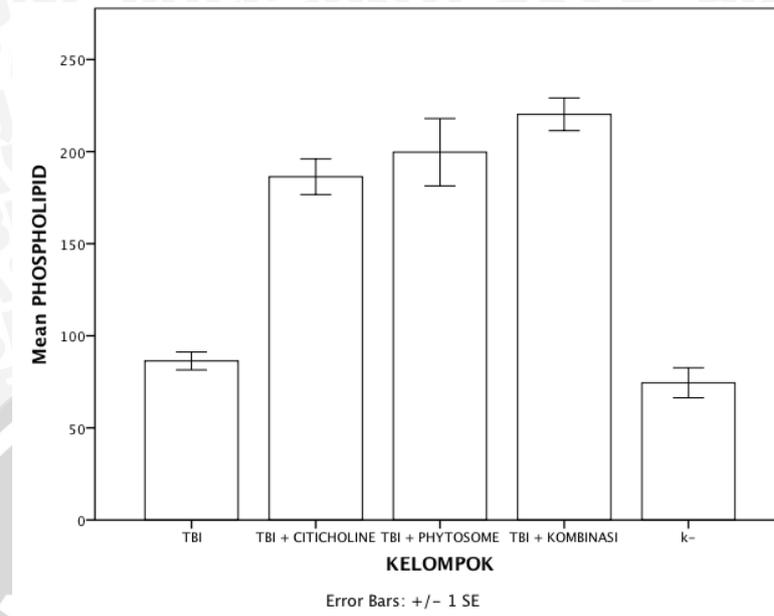


Gambar 5.4 Gambaran Histopatologi Distribusi Fosfolipid pada Jaringan Otak Menggunakan Pengecatan Imunohistokimia.

Tabel 5.3 Data Hasil Distribusi Fosfolipid pada Semua Kelompok

Tikus					
Variabel	Kelompok	X	SD	Min	P
Fosfolipid	KP	86,33	8,386	81	
	KN	74,50	16,361	55	
	P1	199,67	31,664	165	P < 0,05
	P2	186,33	16,773	167	P < 0,05
	P3	220,25	17,689	203	P < 0,05

Keterangan : KN (kontrol [-] : tidak diberi perlakuan) ; KP (kontrol [+] : diinduksi TBI); P1 (diinduksi TBI + *phytosome* ekstrak Pegagan 90mg/kgBB); P2 (diinduksi TBI + Citicoline 250mg/kgBB); P3 (diinduksi TBI + *phytosome* ekstrak Pegagan 90mg/kgBB + Citicoline 250mg/kgBB).



Gambar 5.5 Grafik Perbandingan Rerata Jumlah Distribusi Fosfolipid pada Semua Kelompok Tikus

Analisa untuk pengukuran hasil distribusi fosfolipid pada semua kelompok tikus kontrol dan kelompok tikus perlakuan dilakukan dengan menggunakan program *Statistical Product Service Solution (SPSS)* versi 20 dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Dilakukan beberapa tahap pengujian, yaitu uji normalitas, uji homogenitas, uji *One Way ANOVA*, dan uji *Pearson*.

Uji normalitas menunjukkan nilai ($p > 0,05$) menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Uji homogenitas menunjukkan nilai signifikansi ($p > 0,05$), menandakan bahwa persebaran data homogen, sehingga pengujian dapat dilanjutkan untuk uji komparatif dengan uji *One Way ANOVA*.

Uji *One Way ANOVA* terhadap distribusi fosfolipid menunjukkan nilai $p = 0,00$ ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa paling tidak terdapat 2 kelompok yang memiliki perbedaan signifikan. Hasil ini juga menunjukkan bahwa

pemberian terapi pada tikus model TBI memberikan pengaruh yang signifikan terhadap distribusi fosfolipid yang terpengaruh oleh variabel bebas. Oleh karena itu perlu dilanjutkan dengan uji *post hoc Tukey HSD* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji *post hoc* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 ($p < 0.05$) pada distribusi fosfolipid.

Perbedaan yang signifikan antara kontrol positif dengan kelompok perlakuan 1,2, dan 3 menunjukkan bahwa pemberian *phytosome* ekstrak Pegagan 90 mg/KgBB, Citicoline 250 mg/KgBB, dan kombinasi *phytosome* ekstrak Pegagan + Citicoline mampu memberikan efek peningkatan distribusi fosfolipid yang bermakna pada akson jaringan otak tikus yang diinduksi TBI.

