

**Penghambatan Enzim Asetilkolinesterase dari Ekstrak Herba Pegagan
(*Centella asiatica* (L.) Urb), Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.)
dan Kombinasinya**

**Inhibition of Acetylcholinesterase by Extracts of Gotu Kola (*Centella asiatica* (L.)
Urb), Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves, and Their Combinations**

Yonathan Tri Atmodjo Reubun^{1*}, Shirly Kumala¹, Siswa Setyahadi^{1,2}, Partomuan
Simanjuntak^{1,3}

¹Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila

Jl. Raya Lenteng Agung, Srengseng Sawah, Jakarta Selatan 12460, Indonesia

²Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

Kawasan PUSPIPTEK Serpong, Tangerang Selatan 15314, Indonesia

³Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

Jl. Raya Bogor KM 46 Cibinong, Bogor 16911, Indonesia

*Corresponding author email: jonathanreubun90@gmail.com

Received 19-11-2020

Accepted 29-01-2021

Available online 28-02-2021

ABSTRAK

Penyakit Alzheimer (*Alzheimer Disease*, AD) adalah suatu penyakit dimana terjadinya kerusakan otak yang ditandai dengan penurunan dari perhatian, memori, dan kepribadian. AD merupakan salah satu akibat dari gangguan fungsi asetilkolin. Dalam hal ini, Asetilkolinesterase (AChE) merupakan enzim yang berfungsi sebagai katalisator pada pemecahan asetilkolin (ACh) menjadi bentuk yang tidak aktif yaitu asetat dan kolin. Pengukuran aktivitas enzim AChE dapat menggambarkan akumulasi ACh dalam tubuh dimana pada hasil ini menunjukkan pada penderita AD dengan adanya aktivitas AChE yang lebih besar. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas dalam pengobatan AD melalui penghambatan AChE oleh ekstrak *Centella asiatica* L. Urb, ekstrak *Moringa oleifera* Lam. dan kombinasinya. Herba pegagan dan daun kelor yang diperoleh masing-masing diekstraksi dengan menggunakan etanol 96% dengan metode maserasi. Maserat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan menggunakan metode *freeze drying*. Kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak diuji menggunakan metode skrining fitokimia standar. Uji aktivitas penghambatan AChE dilakukan menurut metode Ellman yang didasarkan pada hidrolisis reaksi substrat ATCh oleh AChE dengan DTNB yang menghasilkan warna kuning dan diukur serapannya pada panjang gelombang 410 nm. Hasil pengujian penghambatan AChE menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak herba pegagan dan ekstrak daun kelor 1:1 memberikan penghambatan terbaik dengan nilai IC₅₀ sebesar 217,588 ppm. Sementara itu, kontrol positif *eserin* dengan nilai IC₅₀ sebesar 5,010 ppm.

Kombinasi ekstrak herba pegagan dan daun kelor diduga mempunyai efek positif dalam pengobatan penyakit alzheimer melalui mekanisme aksi penghambatan AChE.

Kata kunci: Alzheimer, asetilkolinesterase, herba pegagan, daun kelor, metode Ellman

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a disease related to brain damage characterized by decreased attention, memory, and personality. AD is caused by impaired acetylcholine function. Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme functioning as a catalyst for the breakdown of acetylcholine (ACh) into inactive forms, i.e., acetate and choline. Higher AChE activity indicated the accumulation of ACh in the body of patients with AD. The purpose of this study was to determine the activity in the treatment of AD through AChE inhibition by extracts of gotu kola (Centella asiatica L. Urb), moringa (Moringa oleifera Lam.) leaves, and their combinations. The gotu kola herbs and moringa leaves were extracted using 96% ethanol by maceration method. The obtained maserate was concentrated using a rotary evaporator and further freeze dried. The extract obtained was then subjected to a phytochemical screening test and an AChE inhibitory activity test based on the Ellman's method, which is based on the hydrolysis of the ATCh substrate reaction by AChE with DTNB that gives a yellow color measured at a wavelength of 410 nm. The results showed that the combination of gotu kola hersb and moringa leaves extracts in a ratio of 1: 1 exerted the best inhibition with an IC_{50} of 217.588 ppm. Meanwhile, Eserin as the positive control showed an IC_{50} of 5.010 ppm. Hence, the combination of gotu kola and moringa leaves extracts might be beneficial for the treatment of Alzheimer's disease by the mechanisms of inhibiting AChE.

Key words: Alzheimer, acetylcholinesterase, gotu kola, moringa, Ellman's method

Pendahuluan

Penyakit Alzheimer adalah kerusakan otak yang ditandai dengan penurunan dari perhatian, memori, dan kepribadian. Fungsi kognitif pada penderita penyakit Alzheimer tidak hilang pada satu saat. Fungsi pertama yang menurun adalah perhatian dan memori. Perubahan kepribadian sering muncul ketika penderita menjadi kurang spontan, lebih apatis, dan menarik diri. Alzheimer disebabkan kerusakan atau kematian sel otak dan belum dapat disembuhkan hingga saat ini, bersifat progresif dan berlangsung dalam waktu

yang lama. Biasanya seseorang mulai terdiagnosis pada umur 60 tahun namun individu muda pun dapat mengalaminya. Hal ini dapat menyebabkan keadaan vegetatif total dan kemudian kematian (Yulanri, 2018).

Alzheimer merupakan salah satu akibat dari gangguan fungsi asetilkolin. Dalam hal ini, asetilkolinesterase (AChE) merupakan enzim yang berfungsi sebagai katalisator pada pemecahan asetilkolin (ACh) menjadi bentuk yang tidak aktif yaitu asetat dan kolin. Pengukuran aktivitas enzim AChE dapat menggambarkan akumulasi ACh dalam

tubuh dimana pada hasil ini menunjukkan pada penderita Alzheimer dengan adanya aktivitas enzim asetilkolinesterase yang lebih besar. Adapun senyawa yang dapat menghambat dari aktivitas enzim AChE ini menggambarkan bahwa adanya potensi sebagai batas dasar dari pembuatan obat Alzheimer (Kitphati, 2012).

Kegunaan donepezil, rivastigmine, dan galanthamine dalam pengobatan pasien dengan penyakit Alzheimer telah dilakukan studi analisis. Pada studi tersebut penghambat AChE contohnya adalah donepezil, galanthamine dan rivastigmine mampu menstabilkan atau memperlambat penurunan fungsi kognitif, perilaku, dan perubahan menyeluruh dibandingkan dengan pemberian obat placebo. Tidak ada bukti yang jelas tentang adanya perbedaan efikasi dari ketiga obat ini (Ratu, 2016).

Ilkay Erdogan Orhan melakukan penelitian terhadap aktivitas penghambatan AChE dari herba pegagan (*Centella asiatica* L. Urb.) dimana pada hasil pengujian penghambatan AChE dengan metode Ellman menunjukan bahwa ekstrak etanol 96% menunjukan adanya penghambatan AChE (Orhan, 2012). Penelitian terhadap aktivitas penghambatan AChE dari daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) mendapatkan hasil bahwa pengujian AChE dengan metode Ellman menunjukan bahwa ekstrak etanol daun kelor mempunyai daya hambat AChE dengan pengukuran IC₅₀. Kandungan senyawa yang terdapat

pada herba pegagan adalah asiatikosida, sedangkan pada daun kelor terdapat quersetin dimana senyawa ini diduga mempunyai efikasi terhadap pengobatan AD (Rhee, 2011).

Berdasarkan data penelitian tersebut maka perlu dilakukan penelitian tentang aktivitas dari ekstrak herba pegagan, ekstrak daun kelor serta kombinasi 1:1 secara *in vitro* sebagai penghambatan AChE. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan aktivitas penghambatan AChE pada model penyakit AD.

Metode Penelitian

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain *rotary evaporator* (IKA), *freeze drying* (New Brunswick), ELISA reader (ELx 800), Shaker (Innova 40), peralatan gelas, micro pipet (Eppendorf).

Bahan

Bahan uji yaitu herba pegagan yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, Jawa Tengah serta di determinasi di Balai Pengembangan Tanaman Obat dan Obat tradisional, Tawangmangu, Jawa Tengah. Simplisia daun kelor diperoleh dari Moringa Organik Indonesia, Blora, Jawa Tengah serta dilakukan determinasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor, Jawa Barat. Bahan kimia yang digunakan, yaitu etanol 96%, aseton, asam klorida (HCl) 25%, aquadest, etil asetat, natrium asetat (CH₃COONa) 0,5%, aluminium

klorida (AlCl_3), metanol, asam asetat (CH_3COOH), pereaksi Dragendorf, pereaksi Bauchardat, natrium hidroksida (NaOH), asam sulfat (H_2SO_4), besi (III) klorida (FeCl_3), kloroform (CCl_3), DTNB ((5,5'-ditiobis-(asam 2-nitrobenzoat); ATCh (asetiltiokolin); AchE (asetilkolinesterase); eserin.

Jalannya penelitian

1. Ekstraksi herba pegagan

Ekstrak herba pegagan dihaluskan dengan grinding pada mesh 80. Setelah itu, simplisia di ekstraksi dengan menggunakan maserasi. Simplisia seberat 1.000 direndamkan dengan etanol 96% selama 24 jam dan disaring. Maserasi dilakukan sebanyak delapan kali hingga diperoleh filtrat yang sudah tidak mengandung zat aktif. Hasil maserasi lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental dikeringkan dengan metode *freeze dry* untuk mendapatkan ekstrak yang stabil dan kemudian dihitung rendemennya (%).

2. Ekstraksi daun kelor

Ekstrak daun kelor diekstraksi dengan menggunakan maserasi. Simplisia seberat 1.000 direndamkan dengan etanol 96% selama 24 jam dan disaring. Maserasi dilakukan sebanyak sebelas kali hingga diperoleh filtrat yang sudah tidak mengandung zat aktif. Hasil maserasi lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental dikeringkan dengan metode *freeze dry* untuk

mendapatkan ekstrak yang stabil dan kemudian dihitung rendemennya (%).

3. Penapisan fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia pada ekstrak yang dibuat, meliputi: uji alkaloid, uji flavonoid, uji terpenoid uji steroid, uji fenolik, dan saponin (Rasyadi, 2018; MMI, 1995). Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menimbang ekstrak sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 mL air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dipakai untuk uji alkaloid, diambil 3 tabung reaksi, lalu ke dalamnya dimasukkan 0,5 mL filtrat. Masing-masing tabung reaksi pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer akan terbentuk endapan berwarna putih atau kuning. Tabung reaksi kedua ditambahkan 2 tetes pereaksi Bauchardat akan terbentuk endapan coklat. Tabung reaksi ketiga ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorf akan terbentuk endapan putih. Sampel dikatakan mengandung alkaloid jika terjadi endapan atau kekeruhan pada paling sedikit dua dari tiga percobaan di atas. Identifikasi saponin dilakukan dengan menimbang ekstrak sebanyak 0,5 g dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat selama 10 detik. Jika berbusa dan tidak hilang dengan ditambahkan asam klorida 2N menunjukkan adanya

kandungan saponin. Identifikasi tanin dilakukan dengan menimbang ekstrak sebanyak 1 g, dididihkan selama 3 menit dalam 100 mL air suling lalu didinginkan dan disaring. Larutan diambil 2 mL ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin. Identifikasi senyawa fenolik dilakukan dengan menambahkan natrium hidroksida pada ekstrak. Ekstrak yang mengandung senyawa fenolik ditunjukkan dengan timbulnya warna merah. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menambahkan sebanyak 10 g ekstrak ke dalam 10 mL air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, ke dalam 5 mL filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida pekat dan 2 mL amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Sampel disebut mengandung flavonoid jika terjadi warna merah pada lapisan amil alkohol. Identifikasi glikosida dilakukan dengan penambahan asam asetat glasial lalu ditambahkan besi (III) klorida dan ditambahkan asam sulfat pekat dan dikocok. Ekstrak dikatakan mengandung senyawa glikosida ditunjukkan dengan timbulnya cincin warna ungu. Identifikasi triterpenoid/steroid dilakukan dengan melakukan maserasi pada sebanyak 1 g ekstrak selama 2 jam dengan pelarut non polar n heksana sebanyak 20 mL dan disaring. Filtratnya diuapkan di dalam

cawan uap. Tambahkan 3 tetes pereaksi Liebermann-Burchard ditambahkan ke dalam sisa filtrat. Timbulnya warna hijau menandakan adanya kandungan senyawa steroid dan warna merah atau ungu yang dikatakan mengandung senyawa triterpenoid.

4. Pengujian aktivitas penghambatan AChE.

Pengujian aktivitas penghambatan AChE dengan Metode Ellman. Pengujian ekstrak menggunakan substrat ATCh, indikator warna DTNB, dan enzim AChE. Sebagai pembanding digunakan donepezil HCl. Dalam satu kuvet pengujian dibutuhkan 400 µl larutan DTNB, 25 µl AChE, 475 µl larutan dapar fosfat, dan ditambahkan 100 µl ATChCl. Absorbansi diukur dalam panjang gelombang 412 nm setelah inkubasi 2 menit (Ellman, 1961).

Hasil dan Pembahasan

Hasil maserasi simplisia herba pegagan. dengan pelarut etanol 96% diperoleh ekstrak kental sebanyak 333,4 g dengan rendemen sebesar 33,68%. Setelah itu ekstrak kental herba pegagan dilakukan *freeze drying* sehingga diperoleh ekstrak sebanyak 123,9 g dengan rendemen sebesar 12,51%. Pada maserasi daun kelor dengan menggunakan pelarut etanol 96% diperoleh ekstrak kental sebanyak 467,12 g dengan rendemen sebesar 46,71%. Setelah itu ekstrak kental daun kelor dilakukan *freeze drying* sehingga

diperoleh ekstrak sebanyak 152,39g dengan rendemen sebesar 15,24%.

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa (*class of compound*) yang terkandung di dalam ekstrak yang diperoleh dari pegagan dan daun kelor. Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol 96% pegagan dan daun kelor memiliki kemampuan untuk menarik kandungan senyawa flavonoid, tanin, saponin, terpenoid, steroid, dan alkaloid. Hal ini bisa terjadi karena pelarut etanol 96% dapat menarik komponen senyawa polar yaitu flavonoid, tanin, dan saponin juga komponen senyawa nonpolar yaitu alkaloid, terpenoid dan steroid sehingga

Pada hasil penapisan fitokimia didapatkan bahwa pada ekstrak herba pegagan mengandung senyawa kimia seperti alkaloid, saponin, tanin, fenolik, flavonoid, glikosida, steroid, dan triterpenoid. Senyawa utama yang terdapat pada herba pegagan adalah senyawa triterpenoid yang dikenal dengan asam asiatika, asam madekasik, asiaticosida, madekasosid, asam madasiatik, asam betulnik, asam tankunik, dan asam isotankunik (Orhan, 2012). Pada ekstrak daun kelor ditemukan beberapa kandungan kimia seperti alkaloid, saponin, tanin, fenolik, flavonoid, glikosida, dan steroid. Senyawa utama yang terdapat pada daun kelor adalah senyawa flavonoid yang dikenal sebagai kuersetin. Selain itu terdapat juga kandungan seperti asam sinamat, fitosterol, vanilin, katekin, dan epikatekin (Nwidu, 2018).

pelarut etanol 96% dapat dikatakan sebagai pelarut universal dimana dapat menarik berbagai senyawa yang terdapat pada suatu simplisia. Hasil uji penapisan fitokimia ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia

Kandungan senyawa	Ekstrak pegagan	Ekstrak daun kelor
Alkaloid	+	+
Saponin	+	+
Tanin	+	+
Fenolik	+	+
Flavonoid	+	+
Glikosida	+	+
Triterpenoid	+	-
Steroid	+	+

Pengujian aktivitas penghambatan AChE dilakukan dengan menggunakan *microplate reader*. Hasil pengujian aktivitas penghambatan AChE oleh ekstrak pegagan, daun kelor, dan kombinasinya ditunjukkan pada Tabel 2.

Satuan standar yang digunakan dalam pengujian inhibisi AChE adalah IC_{50} untuk menentukan aktivitas inhibisi ekstrak, fraksi maupun senyawa (Ratu, 2017). Penghambat AChE adalah pendekatan yang paling efektif untuk mengobati gejala kognitif dari penyakit alzheimer ini. Enzim ini berpartisipasi dalam neurotransmisi kolinergik dengan menghidrolisis asetilkolin sehingga tidak aktif dan mengakhiri proses neurotransmisi. Enzim ini menarik karena dapat menjadi target untuk desain obat yang rasional dan untuk mekanisme dengan basis penghambatan dalam hidrolisis neurotransmitter asetilkolin (ACh) (Aisen, 2012). AChE

yang terdapat dalam CNS mengkatalis hidrolisis ACh menjadi kolin dan asetat, ACh dilepaskan dalam sinaptik, di mana mengaktifkan kedua reseptor kolinergik *postsynaptic* dan *presynaptic*, yaitu

nikotinic dan muskarinic, yang bekerja untuk peningkatan transmisi kolinergik, sehingga menghasilkan perbaikan kognitif (Ali, 2012).

Tabel 2. Hasil uji aktivitas penghambatan AChE

Sampel Uji	Persamaan Regresi	Nilai IC ₅₀ (ppm)
Eserin	$y = 5.0196x + 24.851$	5.010
Ekstrak etanol herba pegagan	$y = 0.0146x + 20.631$	2011.575
Ekstrak etanol daun kelor	$y = 0.0443x + 13.685$	819.7517
Kombinasi ekstrak 1:1	$y = 0.0568x + 37.641$	217.588
Kombinasi ekstrak 1:2	$y = 0.0288x + 5.9241$	1530.4
Kombinasi ekstrak 1:3	$y = 0.0376x + 10.882$	1040.372
Kombinasi ekstrak 2:1	$y = 0.0111x + 27.496$	2027.387

Pada Tabel 2, satuan standar yang digunakan adalah IC₅₀ untuk menentukan aktivitas penghambatan ekstrak dapat dijadikan sebagai obat Alzheimer. Pada penelitian ini ekstrak

yang dipilih adalah kombinasi 1:1 herba pegagan dan daun kelor dipilih karena mempunyai nilai IC₅₀ terkecil yaitu sebesar 217,588 ppm.

Kesimpulan

Pada hasil penelitian ini didapatkan bahwa kombinasi 1:1 ekstrak herba pegagan dan ekstrak daun kelor mempunyai aktivitas penghambatan Alzheimer Secara *In Vitro* Dengan Penghambatan Enzim Asetilkolinesterase (Ache) Oleh Ekstrak Etanol Kulit Buah Petai (*Parkia speciosa* Hassk.). Palembang: Universitas Sriwijaya.

AChE sebesar IC₅₀ 217,588 ppm, dibandingkan dengan kontrol positif eserin sebesar IC₅₀ 5,010 ppm.

Daftar Pustaka

Kitphati, W., Wattanakamolkul, K., Lomarat, P., Phanthong, P., Anantachoke, N., Nukoolkam. 2012, Anticholinesterase of essential oil and their constituents from Thai medicinal plants purified and selular enzymes, *JAASP*, 1: 58 – 62.

Ratu, A.P. 2016. Isolasi dan identifikasi senyawa aktif fraksi etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) sebagai penghambatan asetilkolinesterase. *Tesis*. Jakarta: Universitas Pancasila.

Orhan, I.E. 2012. *Centella asiatica* (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential. Turkey. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 1-8.

- Rhee, I.K., van de Meent, M., Ingkaninan, K., and Verpoorte, R. 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thinlayer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*. 9(15): 217-223.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., and Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase inhibitor activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88-95.
- Silverman, R.B. 2002. The Organic Chemistry of Enzyme Catalysed Reaction. *Academic Press*. 563-84.
- Wetwitayaklung, P., Limmatvapirat, C., Phaechamud, T., dan Keokitichai, S. 2007. Kinetics of acetylcholinesterase inhibition of *Quisqualis indica* Linn. flower extract. *Silpakorn University Science and Technology Journal*. 1(2): 20-7.
- Rasyadi, Y. 2018. Formulasi sediaan kumur dari ekstrak daun sukun *Artocarpus atilis* (Parkinson ex F.A.Zorn) Fosberg. *Chempublish Journal*, 3(2):76-84.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Materia Medika Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1995.
- Nwidu L.L, Elmorsy E, Aprioku J.S, Siminialayi I, Carter W.G. 2018. In vitro anticholinesterase and antioxidant activity of extracts of *Moringa oleifera* plants from River State, Niger Delta, Nigeria. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Journal*. 5(3): 71.
- Ratu A.P. 2017. Aktivitas dan Kinetika Inhibisi Asetilkolinesterase oleh Fraksi Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.). *5th urecol proceeding*. 856-861.
- Aisen P.S, Cummings J, Schneider L.S. 2012. Symptomatic and nonamyloid/tau based pharmacologic treatment for alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2(3): 1-21.
- Ali R, Sheikh I, Jabir N.R, Kamal M.A. 2012. Comparative Review of Decade's and Neuroregeneration. *American Journal of Neuroprotection and Neurodegeneration*. 4(2): 136-44.